

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Cintia de Lima Rossi

ESTUDO DA PRESSÃO ARTERIAL E MANIPULAÇÃO RENAL DE SÓDIO EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS PELA

ADMINISTRAÇÃO DE ESTREPTOZOCINA: Implicações do sistema

nitroxidérgico.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de mestre em
Biologia funcional e molecular na área de
Fisiologia.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)

Cintia Lima Rossi

e aprovada pela Comissão Julgadora.

25/02/01



Orientador: Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TI UNICAMP
	R 735 1
V.	Ex.
TOMBO BC/	44488
PROC.	16-392/01
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	16/05/01
N.º CPD	

CM-00155188-2

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

R735e **Rossi, Cintia de Lima**
 Estudo da pressão arterial e manipulação renal de sódio em ratos diabéticos induzidos pela administração de estreptozocina: implicações do sistema nitroxidérgico/Cintia de Lima Rossi. - Campinas, SP. [s.n.], 2000.
 106f: illus.

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

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

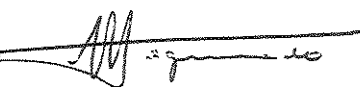
Campinas, 21 de fevereiro

Banca Examinadora

Prof. Dr. JOSÉ ANTÔNIO ROCHA GONTIJO (Orientador)



Prof Dr. JOSÉ FRANCISCO FIGUEIREDO



Profª. Dra. CARLA ROBERTA OLIVEIRA CARVALHO



Prof. Dr. EVERARADO MAGALHÃES CARNEIRO

Dedicatória:

Para meu filho Arthur que trouxe à minha vida um novo brilho .

Para meu esposo Alexandre pelo amor e dedicação.

Para os meus pais Wagner e Angelina pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gontijo, pela excelente orientação e paciência,

À minha amiga Adriana, pela amizade e por ter guiado os meus passos nas dosagens e demais técnicas desenvolvidas na tese,

Ao meu amigo José Eduardo, pelo incentivo constante,

À Helen, Renata, Leda, Micheloto, Patricia e demais colegas do laboratório, pela amizade e pequena dicas,

À querida D. Neide e Adriana, pela ajuda alegre de toda hora,

Ao Adilton, Marina, Rosana, Ana e demais funcionários do Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental, pelas contribuições com boa vontade.

À Conceição, pela ajuda no laboratório de dosagens,

À D. Lourdes, por ter cuidado com carinho do material de dosagens,

Ao CNPq, pelo suporte financeiro

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	vii
Lista de tabelas e figuras.....	x
Resumo.....	xi
Summary.....	xiii
Introdução.....	1
Objetivos.....	16
Materiais e Métodos.....	17
Resultados.....	25
Discussão.....	64
Conclusões	74
Referências Bibliográficas.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE: enzima de conversão da angiotensina

AngII: angiotensina II

Ccr: *Clearance* de creatinina

Cl⁻: cloreto

CLi⁺: *Clearance* lítio

CNa⁺: *Clearance* de sódio

CO: animais controles

CO+L-NAME: animais controles tratados com L-NAME

CR1: quimiorreceptor 1

CR2: quimiorreceptor 2

CRs: quimiorreceptores

DM: animais diabéticos estreptozocina-induzidos

DM+L-NAME: animais diabéticos estreptozocina- induzidos tratados com L-NAME,

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

FPR: fluxo plasmático renal

IV: via intravenosa

K⁺: potássio

KCL: cloreto de potássio

Li⁺: lítio

L-NAME: *N*^w –nitro-L-arginina-metil ester

L-NMA: N monometil L-arginina

mRNA: RNA mensageiro

MRs: mecanoreceptores

MRv: mecanoreceptores ureteropelvico

Na⁺ /K⁺ - ATPase: transporte ativo de Na⁺ K⁺

Na⁺: sódio

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintetase

NOSb: isoforma de óxido nítrico sintetase encontrada no cérebro

NOSe: isoformas de óxido nítrico sintetases endoteliais vasculares

NOSi: isoformas de óxido nítrico sintetases encontrada em macrófagos frente a estímulos imunológicos

PAS: Pressão Arterial Sistólica

Pgc: pressão hidráulica glomerular

PGE₂: prostaglandina E₂

PKC: proteína quinase C

PUF: pressão de ultrafiltração

RFG: taxa de filtração glomerular

STZ: estreptozocina

TGF-β: fator de crescimento tumoral β

UNa⁺ V: Excreção Urinária de Sódio

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela e Figura 1 – Valores médios de Peso Corporal dos Grupos I e II	26
Tabela e Figura 2 – Valores médios de Peso Corporal dos Grupos III e IV.....	27
Tabela e Figura 3 – Valores médios de Volume Urinário dos Grupos I e II	29
Tabela e Figura 4– Valores médios de Volume Urinário dos Grupos III e IV	30
Tabela e Figura 5- Valores plasmáticos de Glicose dos Grupos I e II	32
Tabela e Figura 6- Valores plasmáticos de Glicose dos Grupos III e VI.....	33
Tabela e Figura 7- Valores médios de <i>Clearance</i> de Creatinina: Grupos I e II.....	35
Tabela e Figura 8- Valores médios de <i>Clearance</i> de Creatinina: Grupos III e IV.....	36
Tabela e Figura 9 – Fração de Excreção de Sódio: Grupos I e II.....	38
Tabela e Figura 10 – Fração de Excreção de Sódio: Grupos III e IV.....	39
Tabela e Figura 11 – Fração de Excreção Proximal de Sódio: Grupos I e II.....	41
Tabela e Figura 12 - Fração de Excreção Proximal de Sódio: Grupos III e IV.....	42
Tabela e Figura 13 - Fração de Excreção Pós Proximal de Sódio: Grupos I e II.....	44
Tabela e Figura 14 - Fração de Excreção Pós Proximal de Sódio: Grupos III e IV....	45
Tabela e Figura 15 – Valores médios de <i>Clearance</i> de Sódio: Grupos I e II.....	47
Tabela e Figura 16 – Valores médios de <i>Clearance</i> de Sódio: Grupos III e IV.....	48
Tabela e Figura 17 – Valores médios de <i>Clearance</i> de Lítio: Grupos I e II.....	50
Tabela e Figura 18 – Valores médios de <i>Clearance</i> de Lítio: Grupos III e IV.....	51
Tabela e Figura 19 – Excreção Urinária de Sódio: Grupos I e II.....	53
Tabela e Figura 20 - Excreção Urinária de Sódio: Grupos III e IV.....	54
Tabela e Figura 21 – Fração de Excreção Urinária de Potássio: Grupos I e II.....	56

Tabela e Figura 22 – Fração de Excreção Urinária de Potássio: Grupos III e IV.....	57
Tabela e Figura 23 – Proteinúria: Grupos I e II.....	59
Tabela e Figura 24 – Albuminúria: Grupos I e II.....	60
Figura 25 – Pressão Arterial Média: Grupos I, II,III e IV.....	62
Tabela 25 - Pressão Arterial Média: Grupos I, II,III e IV	63

RESUMO

O diabetes mellitus é uma doença metabólica, caracterizada por uma ação insuficiente da insulina, seja pela ausência deste hormônio ou pela resistência a sua atividade. De acordo com estas características o diabetes mellitus pode ser classificado como Diabetes Mellitus Insulino Dependente ou diabetes tipo 1 e, Diabetes Mellitus Não Insulino Dependente ou tipo 2. Inúmeras alterações funcionais e histológicas são observadas em diversos órgãos como consequência evolutiva desta doença. Alterações glomerulares e vasculares renais são exaustivamente descritas, entretanto pouco se conhece a respeito da função tubular no diabetes mellitus clínico ou experimental.

O objetivo do presente trabalho foi definir e caracterizar alguns parâmetros funcionais do néfron e modificações da pressão arterial relacionados ao desenvolvimento da nefropatia diabética e sua possível relação com a atividade do sistema nitroxidérgico. O estudo funcional renal foi estimado através do *clearance* de creatinina endógena e do *clearance* de lítio, para avaliação da filtração glomerular e do manuseio tubular de sódio, respectivamente. Todos os procedimentos foram realizados em ratos Wistar-Hannover, acordados, não-restritos em gaiolas metabólicas individuais.

Os principais resultados observados mostram que o desenvolvimento do diabetes mellitus experimental, induzido por estreptozocina, promoveu um significativo acréscimo na excreção renal de sódio, estudada seja sob a forma de carga excretada ou relacionada à filtração glomerular como fração de excreção. A elevação na excreção urinária de sódio ocorreu já na primeira semana após a indução do diabetes-experimental. A natriurese foi acompanhada por uma significativa elevação da caliurese. O sítio de rejeição de sódio

identificado pelo estudo através do *clearance* de lítio ficou restrito aos segmentos mais distais do néfron (FEPPNa, fração de excreção pós-proximal), não havendo aparentemente participação dos segmentos proximais. As modificações observadas no manuseio tubular de sódio, ocorreu independentemente de modificações significativas da filtração glomerular e da pressão arterial. Não conseguimos também demonstrar uma participação efetivo do sistema nitroxidérgico, através de seu bloqueio com L-NAME, sobre os fatores que precocemente, modificam a reabsorção de sódio neste modelo experimental.

Assim, concluímos que modificações tubulares precoces relacionadas ao transporte tubular de sódio, podem ocorrer em animais diabéticos, tratados com estreptozocina, independentemente de modificações significativas na pressão arterial, na filtração glomerular ou na atividade da NO sintetase.

SUMMARY

The role of the kidney in the control of hydrosaline homeostasis in patients or experimental models with diabetes mellitus has been strikingly demonstrated by several studies. Recently, growing evidence suggesting that precocious tubular dysfunction may precede glomerular modifications and influence directly the renal function and cardiovascular homeostasis. However, no data are available that examine in details the sodium and potassium tubule handling changes at time-dependent fashion in models of streptozotocin-induced diabetes mellitus (DM). Also, we hypothesized that a possible nitroxidergic contribution may modulate the renal function and consequently changing the urinary sodium excretion. To test this hypothesis, we investigated the effects of streptozotocin-induced diabetes mellitus on tubule sodium handling of unanesthetized, unrestrained rats and their controls, by lithium clearance. Also, to examine the influence of nitroxidergic system inhibition on renal function rats were assigned randomly to one of four groups: (1) control rats, (2) streptozotocin-induced (STZ) DM rats, (3) L-NAME treated rats and (4) STZ-induced DM, L-NAME treated rats. In the current studies, we demonstrated that diabetic rats treated with streptozotocin showed a substantial and time-related increase in the urinary output of sodium (Control FENa^+ , first week: 0.127 ± 0.009 %; forth week: 0.132 ± 0.02 % and STZ-induced DM FENa^+ , first week: 0.244 ± 0.05 %; forth week: 0.529 ± 0.009 %) and potassium (Control FEK^+ , first week: 0.085 ± 0.01 %; forth week: 0.118 ± 0.03 % and STZ-induced DM FEK^+ , first week: 0.118 ± 0.01 %; forth week: 0.276 ± 0.02 %), and did not confirm the hypothesis that the renal ion excretion in STZ-induced DM, L-NAME treated

rats is, at least in part, related to changes in NOS activity (L-NAME FENa⁺, first week: 0.459 ±0.07 %; forth week: 1.190 ±0.25 % and STZ-induced DM L-NAME- treated FENa⁺, first week: 0.732±0.20 %; forth week: 1.797±0.22 %). In addition, we showed that renal sodium handling changes occurred by increasing post-proximal tubule sodium rejection (FEPPNa⁺) despite an unchanged glomerular filtration rate (C_{Cr}) in the proportion of the sodium load filtered and arterial blood pressure. Thus, the observed increase in renal sodium and potassium excretion may be due to the inability of renal tubules to handle the electrolytes, with a promoted disruption in glomerotubular balance. Together, these findings may suggest that a possible precocious misleading of post-proximal tubular segment of nephron without any change of glomerular filtration rate or hemodynamic dysfunction in STZ-induced rats. Further studies are required to investigate and understand this tubular involvement in dysfunctional diabetes-tubular kidney interaction.

1- INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diabetes Mellitus é uma doença metabólica, caracterizada por ação insuficiente da insulina, seja pela ausência desse hormônio ou pela resistência periférica a sua atividade. De acordo com essas características o diabetes mellitus pode ser classificada como Diabetes Mellitus Insulino Dependente ou diabetes tipo 1 e Diabetes Mellitus Não Dependente de Insulina ou tipo 2.

Diabetes tipo 1 é considerada uma doença autoimune, onde anticorpos e principalmente linfócitos T provocam lesões nas ilhotas de Langerhans, seguidos por uma atrofia das células β , após um estágio de inflamação reversível (BACH 1994). Diabetes tipo 2 é caracterizado basicamente por resistência tissular insulínica, associado ou não a uma deficiência na secreção de insulina, à relativa superprodução de glicose no fígado ou a uma redução na captação periférica de glicose (BECK-NIELSEN 1995).

De modo geral os sintomas clássicos do diabetes são hiperglicemia, poliúria, polidipsia, hipovolemia e anormalidades metabólicas. Complicações a longo prazo são detectadas como neuropatia, retinopatia, nefropatia, resistência diminuída a agentes infecciosos, alterações funcionais de certas proteínas como resultado de glicosilações.

O estado de hiperglicemia por si contribui para a progressão de micro e macroangiopatias (HARRIS 1987), 40% dos pacientes apresentam micro e macroalbuminúria, 15% apresentam retinopatia, e 50% são hipertensos (HANSEN 1995). A frequência, gravidade e a velocidade das complicações diabéticas são diretamente proporcionais ao grau de hiperglicemia (DAHL-JORGENSEN et al., 1986).

1.1 - NEFROPATIA DIABÉTICA

ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MORFOLÓGICAS

Muitos estudos tem demonstrado a contribuição do desenvolvimento hipertensivo sistêmico e glomerular para a evolução clínica da nefropatia em pacientes de diabetes melitus insulino-dependente (MONGENSEN et al., 1985), acompanhado de um aumento na excreção urinária de proteínas e a uma queda da função renal.

A nefropatia diabética é uma das mais importantes complicações do diabetes mellitus. Dados estatísticos mostram que cerca de 40% dos pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e 10 – 30% dos pacientes com diabetes do tipo 2 acabam desenvolvendo lesões renais irreversíveis após um período médio de 15 anos (BREYER J.A, 1992). A nefropatia diabética tem uma evolução bastante lenta, manifestando-se após vários anos de duração do diabetes. Inicialmente (fase I) não se observam alterações morfológicas significativas no tecido renal desses pacientes (MONGENSEN et al.,1975). No entanto, os rins aumentam rapidamente de tamanho, enquanto ocorre um aumento do fluxo plasmático renal (FPR) e da taxa de filtração glomerular (RFG). As alterações hemodinâmicas observadas nesta fase

podem ser reproduzidas em animais de laboratório. Nestes, tal como em humanos, pode ser verificado um aumento acentuado do tamanho renal e da taxa de filtração glomerular (RFG) (HOSTETTER et al.,1981). Ocorre também um aumento no fluxo plasmático glomerular e da pressão hidráulica glomerular (Pgc). Obviamente, não existem dados sobre a Pgc no diabetes humano, sendo no entanto possível que ela esteja igualmente elevada nestes pacientes. Tampouco no diabetes experimental observam-se lesões glomerulares dignas de nota nessa fase inicial. Após um período de 10 a 15 anos, os pacientes diabéticos susceptíveis apresentam lesões glomerulares avançadas e caminham de forma irreversível para a insuficiência renal crônica. Em ratos diabéticos, cujo tempo de vida não ultrapassa os 3 anos, essas lesões avançadas não podem ser vistas. No entanto, lesões focais e segmentares nítidas são observadas nesses animais a partir de 1 ano de diabetes.

As causas da nefropatia diabética não estão estabelecidas. Diversos mecanismos são propostos, como alterações hemodinâmicas glomerulares, aumento do volume glomerular, sobrecarga mesangial e acúmulo de lípidos, entre outros. Vários estudos sugerem que certas alterações da microcirculação renal exercem um papel chave na gênese da glomerulose do diabetes (ZATZ, 1985 –1986; ANDERSON 1989; FUJIHARA et al., 1992). Dentre essas alterações hemodinâmicas a hipertensão glomerular parece desempenhar o papel mais importante. Estudos de Zatz e colaboradores com ratos diabéticos mostram que manobras experimentais que limitam tais alterações hemodinâmicas previnem o aparecimento de lesões renais (ZATZ, 1985 e1986). Em um destes estudos (ZATZ, 1985) a administração de uma dieta hipoproteica promoveu uma normalização da Pgc, além de prevenir as lesões glomerulares subsequentes. Em outra série de experimentos (ZATZ, 1986), os mesmos autores mostram que a administração crônica de um inibidor da enzima conversora da angiotensina I, o enalapril, levou a resultados

semelhantes, ou seja, normalizou a Pgc e a preveniu das lesões glomerulares. Fujihara e colaboradores (FUJIHARA et al., 1992) estudaram ratos diabéticos que foram divididos em três grupos: o primeiro não recebeu tratamento, o segundo recebeu o antipertensivo hidralazina e o terceiro foi tratado com enalapril. Nos ratos que não receberam tratamento antihipertensivo a Pgc estava bastante elevada. Após um ano de diabetes esses ratos desenvolveram lesões glomerulares em proporção apreciável. Os ratos tratados com hidralazina tiveram um comportamento semelhante, apesar de uma redução na pressão arterial sistêmica (mas não na Pgc). Em contraste, o grupo que recebeu enalapril mostrou uma normalização da Pgc e ausência de esclerose glomerular ao fim de 12 meses de diabetes.

Considerando-se as inúmeras evidências experimentais apontando para o importante papel da hemodinâmica glomerular na gênese da nefropatia diabética, muitos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de se entender os mecanismos responsáveis pela vasodilatação renal associado ao diabetes mellitus. Há evidências que uma série de agentes vasorrelaxantes pode promover vasodilatação renal e aumento do RFG nos pacientes diabéticos, incluindo o hormônio de crescimento (CHRISTIANSEN et al., 1981), o glucagon (PARVING et al., 1977), a própria glicose (APPIANI et al., 1990) ou a produção de cininas e prostaglandinas (HARVEY et al., 1992). Além disso, a expansão de volume extracelular verificada em diabéticos (BROCHER-MORTENSEN et al., 1973) pode estar associada a uma hiperfunção renal, em parte talvez em decorrência do aumento dos níveis circulantes do fator natriurético atrial (ORTOLA et al., 1987). Mas recentemente, surgiu a possibilidade de que a hiperfiltração do diabetes seja consequência da atividade de um fator relaxante endotelial, óxido nítrico (NO).

Sabe-se que o endotélio vascular produz uma série de compostos vasoativos, incluindo o Fator Relaxante Dependente do Endotélio (EDRF), cuja existência foi demonstrada por Furchgott e Zawadzki em 1980 (FURCHGOTT et al.,1980) e que demonstrou-se depois, ter características químicas e biológicas idênticas às do óxido nítrico (NO). Considerado atualmente como uma das mais potentes substâncias vasodilatadoras endógenas, o óxido nítrico é sintetizado pelo endotélio vascular utilizando a L-arginina como precursora, sendo sintetizado também pelas células endoteliais glomerulares, exercendo assim influência na hemodinâmica renal (BAYLIS ET AL.,1992; ZATZ et al.,1991). Evidências obtidas nos últimos anos utilizando inibição aguda da síntese de NO indicam que este composto relaxa a microcirculação e participa intensamente da regulação momento a momento da pressão arterial. Este efeito é particularmente evidente na microcirculação renal, já que estudos recentes mostraram que a inibição aguda ou crônica do NO promove severa vasoconstrição renal (BAYLIS ET AL.,1992; ZATZ et al.,1991;RIBEIRO et al., 1992).

As alterações tubulares renais no diabetes mellitus são pouco conhecidas. A excreção urinária de proteínas de baixo peso molecular e proteinúria tubular tem sido considerada como um indicativo da capacidade de reabsorção das células do túbulo proximal (VIAU et al., 1986b). Estudos morfológicos demonstram que a queda na capacidade de reabsorção de albumina está relacionada com a altura da borda em escova no túbulo proximal . Uma vez que a albumina é reabsorvida no túbulo proximal por processos endocíticos, a diminuição da borda em escova pode representar uma diminuição na capacidade de reabsorção desta proteína (TUCKER et al., 1993). Em ratos diabéticos

estreptozocina-induzidos foi observado uma vacuolização, a presença de corpos mielóides, e a dilatação e a formação de vesículas no retículo endoplasmático em células do túbulo proximal (WEIL et al., 1976).

Kaneda et al., (1992) demonstraram um crescimento mitocôndrial em ratos diabéticos-induzidos por estreptozocina. Esta anormalidade pode ser a causa da redução no transporte ativo em células do túbulo proximal. Além disso, foi evidenciado que em estágios iniciais do diabetes há uma redução na atividade $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase na borda basolateral de células tubulares (LABORDE et al., 1988). Estas alterações podem estar envolvidas com proteinúria e albuminúria previamente referidos.

Por outro lado, observações tem demonstrado a participação do sorbitol, de fosfoinositídeos, do antiporte sódio/hidrogênio e da bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase na patogênese de complicações diabéticas. O desenvolvimento hipertensivo, por exemplo, em alguns modelos experimentais está associado a um aumento do volume extracelular e ao aparecimento de um inibidor circulante da bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase (GREENE et al., 1987).

Acredita-se que através da inibição da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase a contratilidade dos vasos sanguíneos e do coração aumente, elevando a pressão arterial (HUOT et al., 1983). A atividade do antiporte Na^+/H^+ apresenta-se elevada em leucócitos e fibroblastos de pacientes diabéticos insulino-dependentes (NGLL et al., 1990 e KINSELLA et al., 1980).

O pH intracelular, o volume e crescimento celular são regulados pelo trocador Na^+/H^+ . Adicionalmente a estas funções, este trocador tem um papel fundamental na

reabsorção tubular de Na^+ e na extrusão apical de H^+ através da membrana luminal do túbulo proximal (KINSELLA et al., 1980). Sabe-se que a atividade do antiporte Na^+/H^+ sofre influência da formação intracelular de 1,2-diacilglicerol e da proteína quinase C (BAUFIC et al., 1990). A Ativação da proteína quinase C através da síntese do 1,2-diacilglicerol, em condições de hiperglicemia pode estimular a produção da matrix extracelular (KREISBERG et al., 1995).

Pollock et al., (1991) demonstraram que o transporte de sódio e o balanço túbulo-glomerular encontram-se alterados em ratos diabéticos estreptozocina induzidos. Segundo ele o transporte de sódio em ratos diabéticos estava aumentado em comparação com controles e, a taxa de filtração glomerular em estudos utilizando preparação do néfron isolado medidos nas porções distais do túbulo proximal e porções iniciais do túbulo distal também apresentam um significativo aumento nos ratos diabéticos.

Estudos realizados durante a infusão de manitol demonstraram que a diurese osmótica isoladamente não pode explicar as mudanças do balanço tubulo-glomerular e do transporte de sódio observados em diabéticos. Tais evidências sugerem que a hiperfiltração ocorrida nos estágios iniciais do diabetes, podem estar associadas com o aumento da reabsorção de sódio independente do cotransporte de Na^+ - glucose e da diurese osmótica.(POLLOCK et al., 1991)

De modo geral a nefropatia diabética é caracterizada por várias alterações morfológicas, como espessamento da membrana basal glomerular e expansão do mesangio, devido ao acúmulo de proteínas nas células mesangiais. Hiperglicemia estimula a síntese de

fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV em culturas de células mesangiais (AYO et al., 1990 e 1991).

1.2 - PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

Recentemente demonstrou-se que o Óxido Nítrico (NO) está envolvido com a nefropatia do diabetes devido às alterações ocorridas nos mecanismos bioquímicos provocadas pelo estado de hiperglicemia (PFEISCHIFTER et al., 1995).

A elevada excreção urinária de nitratos e nitritos nos ratos diabéticos sugere que a produção de NO está bastante elevada nesses animais. Os resultados desse estudo sugerem que a atividade do NO está aumentada e que este composto pode estar mediando, ao menos em parte, a hiperfiltração glomerular associada ao diabetes mellitus. A produção excessiva de NO em ratos diabéticos é aparentemente paradoxal, tendo em vista o fato de que esses animais apresentam hipertensão glomerular (HOSTETTER et al., 1981), conforme descrito previamente. Isto pode estar sugerindo que o efeito vasorrelaxante do óxido nítrico é mais pronunciado na arteríola aferente do que na eferente. Outra possibilidade é a que ocorra um efeito simultâneo de um vaso constritor na arteríola eferente como por exemplo, a angiotensina II (ANDERSON et al., 1993). Em concordância, observações experimentais mostram que em ratos diabéticos a resistência da arteríola aferente é sempre menor que na eferente (FUJIHARA, 1992; ZATZ, 1985; ZATZ, 1986). Consistentemente, os estudos morfológicos de Kimura e colaboradores (KIMURA et al., 1993) mostraram que em ratos diabéticos há uma vaso dilatação das arteríolas aferentes enquanto o diâmetro das eferentes permanecem praticamente inalterados. Isto favorece um aumento do FPR e uma

transmissão da pressão arterial sistêmica aos capilares glomerulares, o que poderia ajudar a explicar a elevada Pgc nesses animais.

Se o excesso de produção de óxido nítrico leva à vasodilatação e talvez a hiperfiltração, a inibição crônica do NO tem efeitos funestos sobre a pressão arterial e a estrutura renal (RIBEIRO et al.,1992). Observações experimentais recentes indicam que a inibição crônica do óxido nítrico agrava as lesões renais em modelos experimentais associados à esclerose glomerular. Estudos desenvolvidos por Fujihara e colaboradores (FUJIHARA et al., 1995) mostraram que na ablação renal, um modelo clássico de glomeruloesclerose, a inibição crônica do óxido nítrico pelo L-NAME agrava acentuadamente as lesões estruturais renais. A ablação renal está associada a uma hipertrofia e hiperfiltração glomerulares além de hipertensão glomerular acentuada, aparentemente relacionada ao desenvolvimento subsequente de lesões de esclerose glomerular (ANDERSON et al.,1985). O tratamento crônico com L-NAME provocou drástico aumento da pressão hidráulica glomerular e agravou a glomeruloesclerose, enquanto o tratamento concomitante com Losartan (inibidor da AII) promoveu uma diminuição da Pgc e dos níveis de glomeruloesclerose. Outro estudo desenvolvido pelos mesmos autores mostrou que o tratamento crônico com L-NAME associado a uma sobrecarga salina promove um agravamento acentuado das lesões glomerulares (FUJIHARA et al., 1994).

O óxido nítrico é uma molécula mensageira formada a partir de L-arginina através da ação enzimática de várias óxido nítrico sintetases (NOS) (BAYLIS et al., 1996). No rim foi encontrado três isoformas diferentes: NOSb, isoforma encontrada no cérebro; NOSe,

isoformas endoteliais vasculares e NOSi, encontrada em macrófagos frente a estímulos imunológicos (KARLSEN et al., 1995).

Estudos recentes tem demonstrado que em mamíferos a atividade do NOS apresenta várias funções fisiológicas. A NOSe está relacionada com o relaxamento dos vasos sangüíneos, ajudando a manter a pressão arterial, NOSb participa do estabelecimento da plasticidade neural a longo prazo, necessária para a formação de memória. Além disso NOSi é responsável por parte da atividade citotóxica não específica de macrófagos que auxilia na defesa contra bactérias e células tumorais (PFEILSCHIFTER et al., 1995).

Estudos recentes mostram a participação do óxido nítrico na hemodinâmica renal através de modelos de inibição desta molécula mensageira, alguns dos inibidores mais usados são N monometil L-arginina (L-NMA) e nitro L-arginina metilester (L-NAME). Vários trabalhos tem demonstrado que a inibição de NO causa aumento da resistência da arteríola aferente e eferente (ZATZ et al., 1991), queda do fluxo pasmático glomerular, aumento da pressão sangüínea glomerular (Pcg) levando a um aumento da pressão sangüínea, além dessas alterações o coeficiente de ultrafiltração glomerular está reduzido (DENG & BAYLIS, 1993; ZATZ et al 1991), provavelmente devido a contração das células mesangiais (RAIJ & BAYLIS1995).

Outras observações mostram que o óxido nítrico modula a excreção renal de sódio, bem como regula os mecanismos hemodinâmicos. (ROMERO et al., 1992). Reduções na função excretória de sódio frente a inibidores do óxido nítrico (L-NAME) tem sido investigada. A inibição do óxido nítrico pode aumentar a reabsorção tubular de sódio,

devido a um efeito direto no transporte ou pela redução do fluxo sanguíneo medular, ou ainda por redução na pressão hidrostática intersticial. Evidências mostram que o óxido nítrico pode provocar uma queda no fluxo sanguíneo papilar, quando são realizadas infusões de L-NAME diretamente no interstício medular renal (MATTSON et al., 1992).

Tais dados indicam que o óxido nítrico pode ter um papel na circulação medular renal (MATTSON et al., 1992). De acordo com Ohishi et al., (1992) o óxido nítrico exerce influência no segmento preglomerular e posglomerular. Alterações na pressão arterial renal pode provocar mudanças na síntese e liberação de óxido nítrico por células endoteliais. De acordo com Majid et al., (1993) este pode ser o mecanismo responsável pela modulação das curvas de pressão-diurese e pressão-natriurese. Tem sido observado ultimamente que secreção de catecolaminas podem liberar e modular a ação do óxido nítrico em resposta a infusão de doadores de óxido nítrico

Estudos adicionais mostram que óxido nítrico encontra-se muito aumentado em modelos de diabetes induzidos por estreptozocina, contribuindo para hiperfiltração no diabetes (BANK et al., 1993). Estudo *in vitro* demonstram que esse excesso de óxido nítrico provocaria relaxamento da arteríola aferente, mas não teria efeito sobre a arteríola eferente (RAIJ & BAYLIS 1995). Esse fato talvez possa explicar a hipertensão do capilar glomerular em indivíduos diabéticos mesmo com superprodução de óxido nítrico.

O sistema renina- angiotensina pode estar relacionado com o desenvolvimento de hipertensão em modelos de inibição aguda de óxido nítrico. Quando ocorre efetiva inibição do sistema renina angiotensina pela administração de antagonistas de angiotensina II a

hipertensão arterial encontra-se atenuada e muitas alterações morfológicas e funcionais decorrentes do tratamento com L-NAME são prevenidas (RIBEIRO et al., 1992). Estudos realizados com enalapril, inibidor da enzima conversora de angiotensina II, demonstram que a vasoconstrição potente gerada pela angiotensina II foi bloqueada, além disso o enalapril evita a degradação da bradicinina. A bradicinina por sua vez promove a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais (ERLICH et al., 1996).

1.3 - CLEARANCE DE LÍTIO

O clearance de lítio tem sido largamente usado em muitas pesquisas científicas, por ser considerado um método com a finalidade de avaliar a manipulação da carga filtrada de sódio e água ao longo do túbulo proximal. (THONSEM et al., 1969).

Transporte de Lítio no Túbulo Proximal.

Greger (1990) assumiu que o lítio é livremente filtrado pelos glomerulos e reabsorvido ao longo dos túbulos proximais paralelamente ao sódio. A reabsorção pode se dar de duas maneiras, podendo ser reabsorvido através da membrana celular (via transcelular) ou entre as células tubulares (via paracelular); o mecanismo básico de reabsorção pode ser muito semelhante ao do sódio. O lítio pode ser transportado pelo antiporte Na^+/H^+ , acreditando-se que o lítio possa ser trocado por prótons e inibir a ligação e a interação do sódio neste sítio de ligação (KINSELLA & ARONSON , 1981). O transporte de lítio através da Na^+/K^+ -ATPase parece pouco provável, uma vez que este transportador tem pouca afinidade com este íon (DUNHAM et al., 1977). Acredita-se que a maior parte da reabsorção do lítio do néfron proximal se dê através da via paracelular, uma vez que estes sítios são muito permeáveis a difusão de íons de baixo peso molecular (

FRÖMTER, 1977). Um aumento na concentração transluminal de Cl^- pode criar um gradiente elétrico favorável a eletrodifusão paracelular de lítio e sódio; além disso a maior parte do lítio pode ser reabsorvida por arrastamento por solventes (GREGER, 1990). Embora as vias de reabsorção de lítio e sódio sejam muito parecidas não se pode sugerir que um aumento na reabsorção tubular de sódio reflita uma maior reabsorção de lítio, no entanto, pode se dizer que o lítio é um bom traçador para o sódio nos túbulos proximais (GREGER, 1990). Estudos realizados em diversas situações experimentais tem sido empregados para validar o lítio como marcador do transporte hidrosalino nos tubulos convolutos proximais. Sugere-se que a excreção fracional de água e lítio sejam proporcionais nos tubulos convolutos proximais (THOMSEN & SHIRLEY, 1997).

Transporte de Lítio na Alça Ascendente de Henle

O transporte do lítio pela via transcelular no ramo ascendente espesso de Henle pode envolver o transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (KINNE et al., 1985). Acredita-se também, que o lítio possa ser transportado do lumem para dentro da célula por canais de K^+ , entretanto estes canais apresentam uma permeabilidade seletiva para os íons lítio. O transporte de lítio através da membrana basolateral neste ramo do néfron parece estar relacionada com um cotransporte de KCl e com a Na^+/K^+ -ATPase (GREGER, 1990). A reabsorção do lítio pela via paracelular depende da magnitude da voltagem transepitelial luminal. Quando ocorre inibição do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ através de diuréticos de alça a voltagem transepitelial é abolida (GREGER, 1985).

A reabsorção de lítio nos segmentos retos dos tubulos proximais e alça de Henle tem sido estimados juntos por serem estruturas de difícil acesso às técnicas de

micropunção. No segmento reto do tubulo proximal a reabsorção de lítio ocorre em paralelo com a água, enquanto que não há reabsorção de lítio no segmento descendente da alça de Henle. No seguimento ascendente da alça de Henle pode haver reabsorção de lítio, mas não de água (THOMSEN & SHIRLEY, 1997).

Algumas substâncias podem alterar a reabsorção de lítio no segmento da alça de Henle, especialmente diuréticos; inibidores da síntese de prostaglandinas e agentes antidiuréticos com o DDAVP. Significante redução da fração de excreção de lítio ocorre com a administração de DDAVP, em homens e ratos anestesiados com reposição de sódio (KIRCHNER et al., 1989; BOER et al., 1988). Estas alterações ocorrem sem mudanças na carga proximal. Tais agentes aumentam a reabsorção de lítio preferencialmente nos segmentos distais do néfron. O clearance de lítio para avaliar a carga no proximal torna-se ineficaz na presença destes agentes (KIRCHNER, 1990).

Transporte de Lítio pelos ductos coletores

Devido a grande variedade celular encontrada nesta porção do néfron o transporte de lítio tem sido estudado nas células principais dos ductos coletores. Acredita-se que o transporte nas células principais dos ductos coletores seja realizado por canais de Na^+ , presentes na membrana luminal da célula (PALMER, 1988). Dietas pobres em sódio podem levar a um aumento da reabsorção do lítio nesta parte do néfron. Quando os canais de Na^+ das células principais são bloqueados pela amilorida, ocorre um aumento no clearance de lítio em situações de depleção de sódio (THOMSEN et al., 1986).

Vários estudos tem sido implementados no sentido de tornar o clearance de lítio um método adequado para estimar a função tubular de maneira inquestionável, como por

exemplo técnicas de micropunção e uso de agentes diuréticos. Em algumas situações o clearance de lítio deve ser analisado com cuidado, como por exemplo durante excreção reduzida de sódio, durante a ingestão de dietas pobres em potássio, inibidores de síntese de prostaglandinas, DDAVP ou diuréticos de alça. De qualquer forma em estudos crônicos o clearance de lítio tem sido considerado melhor do que as técnicas de micropunturas, uma vez que a anestesia e condição cirúrgica podem ser prejudiciais (THOMSEN & SHIRLEY 1997).

Portanto, todas as evidências mostram uma relação entre a síntese de óxido nítrico e a nefropatia diabética. O presente trabalho tem como objetivo definir a participação dessa molécula vasodilatadora sobre a manipulação hidro-salina renal em animais diabéticos insulino-dependente, induzidos por estreptozocina, através do clearance de lítio.

2- OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivos definir e caracterizar alguns parâmetros envolvidos com a nefropatia diabética e sua possível relação com o sistema nitro-oxidérgico, bem como os níveis pressóricos sistêmicos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a função renal, manuseio tubular de sódio e pressão média arterial em animais diabéticos induzidos por estreptozocina e animais normais (controles).

- 2- Avaliar a função renal, manuseio tubular de sódio e pressão média arterial em animais diabéticos induzidos por estreptozocina e animais normais (controles), ambos tratados com inibidor da óxido nítrico sintetase.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.0 - ANIMAIS UTILIZADOS

Os experimentos foram realizados em ratos machos Wistar Hannover, com idade acima de 8 semanas, pesando entre 160 a 180g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB,UNICAMP), SP. À partir do desmame (21-25 dias após o nascimento), os animais foram alimentados com ração padronizada para ratos Labina-Purina, cuja concentração de Na^+ (61.3 ± 9 mEq/kg rato) e K^+ (113 ± 4 mEq/Kg rato), consideradas como normossódica e normopotássica.

3.2.0 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados quatro grupos experimentais assim definidos: Grupo I com animais controles (CO); Grupo II: animais diabéticos estreptozocina-induzidos (DM), a fim de se analisar apenas o comportamento hidro-salino. O Grupo III foi seguido com animais controles (CO+L-NAME) e Grupo IV: diabéticos estreptozocina-induzidos (DM+L-NAME), tratados com L-NAME, com a finalidade de verificar a participação do óxido nítrico sobre balanço hidro-salino. Todos os grupos foram observados por um período de 28 dias em gaiolas individuais, sob condições constantes de temperatura e luminosidade, com acesso livre à ração e água. Após o período de 5 dias de aclimação os protocolos experimentais se iniciavam com a indução do Diabetes Mellitus

3.2.1 - Números de Animais por Grupo Experimental

3.2.1.1 - Grupos I e II- Animais Não-Tratados

Este grupo de animais teve início com 22 animais, sendo que 10 destes foram utilizados como controles (CO) e 12 diabéticos-induzidos (DM). Aos 21 dias de experimento o grupo CO apresentou um número de 9 animais e com 28 dias este grupo foi reduzido para oito animais. Não houve alteração no número de animais do grupo DM.

3.2.1.2 - Grupo III e IV – Animais Tratados com L-NAME

No início do experimento foram agrupados 10 animais controles (CO+L-NAME) e oito animais diabéticos (DM+L-NAME). No décimo quarto dia de protocolo o número de animais do grupo DM+L-NAME caiu para 7 e os animais controles permaneceram com o mesmo número. Aos vinte e um dias de experimento os grupos CO+L-NAME e DM+L-NAME apresentaram respectivamente 9 e 7 animais.

No final do experimento o número de CO+L-NAME e DM+L-NAME eram respectivamente 7 e 6 animais.

3.3.0 - PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE *DIABETES MELLITUS*

Os animais foram anestesiados com éter etílico, e em seguida inoculados com injeção única via intravenosa (I.V.) de estreptozocina (Sigma, Chemical, Co. San Louis, USA), na dose de 65mg/kg, dissolvida em tampão citrato 0,01M, acertando-se o pH para próximo a 4.5. A administração foi realizada em menos de cinco minutos após a diluição da droga. Antes da injeção os animais permaneceram por 10 horas em jejum. O

desenvolvimento do diabetes foi acompanhado pela presença de glicosúria, somente aqueles que apresentassem valores de glicosúria ≥ 4 cruces (++++), permaneciam no grupo experimental. A glicemia com valores acima de 350mg/dl foi também utilizada como fator de inclusão no grupo experimental. O grupo controle recebeu administração intravenosa em dose única do veículo, tampão citrato 0,01M.

3.4.0 - INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE

Para se avaliar o papel do óxido nítrico na função tubular renal, todos os animais, controles e diabéticos, receberam também por via oral durante todo o período de seguimento N^w –nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME, Sigma Chemical Co). L-NAME foi administrado através de uma sonda orogástrica, na dose de 60mg/Kg/dia.

3.5.0 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 - Características Ponderais, Pressóricas e Balanço Hidro-Salino, Ingestão Hídrica e de Ração Sólida dos Grupos Estudados

Os animais foram colocados em gaiolas plásticas individuais para seguimento durante todo estudo, exceto durante as coletas em gaiolas metabólicas.

3.5.2 - Peso Corporal Diário

Durante todo o protocolo experimental o peso corporal foi determinado diariamente pela pesagens em balança de tração. A ingestão diária de ração e água foram definidas diariamente também gravimetricamente.

As coletas urinárias de 15 horas foram obtidas para determinar semanalmente as concentrações urinárias de sódio, potássio e a proteinúria e pressão arterial. Os ratos permaneciam em gaiolas metabólicas durante o período de 15 horas, recebendo água *ad libitum* e em jejum para ração sólida. A urina foi coletada através de funis de aço inoxidável que drenavam para tubos cônicos graduados.

3.5.3 - Medida de Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A PAS foi medida pela plestimografia de cauda (Programmed Electro-Sphyngomanometer, Pe-300, Narco Bio-Systems, USA) utilizando a técnica descrita por Lovenberg (1987).

3.6.0 - ESTUDO DA FILTRAÇÃO GLOMERULAR DO MANUSEIO TUBULAR DE SÓDIO

O estudo da função renal foi estabelecido através das análises do *clearance* de creatinina endógeno e *clearance* de Lítio, nos tempos 7 , 14 21 e 28 dias em animais controles ou tratados com L-NAME, ou após a indução do Diabetes Mellitus.

O *clearance* de creatinina foi utilizado como método para estimar a taxa de filtração glomerular.

O *clearance* de lítio (GARCIA, GONTIJO & FIGUEIREDO, 1991) foi utilizado como método mais adequado para estimar a manipulação tubular proximal de sódio em animais não restritos, íntegro e vigís. Os animais receberam cloreto de lítio na dose de 0,06mEq/100g de peso corporal, por gavagem, no mínimo 12 e no máximo 14 horas antes do início dos experimentos.

Os ensaios tiveram início pela manhã e cada animal era colocado em gaiolas metabólicas individuais sem restrição de movimentos, em jejum para ração sólida e ingerindo água *ad libitum*.

O período experimental era de 120 minutos no total e os animais receberam sobrecarga hídrica de 10% do peso corporal, através da gavagem, para obtenção do fluxo urinário regular e estável. Este procedimento foi realizado em dois estágios: o primeiro, constituída de volume de água correspondente a 5% do peso corporal, chamada de Primeira sobrecarga hídrica (1ª SH), seguida de outra, de igual volume, após 60 minutos, chamada de Segunda sobrecarga hídrica (2ª SH). Após 20 minutos, iniciava-se a coleta urinária por período de 2 horas. No fim de cada experimento, amostras de sangue eram coletadas via vasos da cauda, sob anestesia com éter etílico. Aos 28 dias o *clearance* era acompanhado de sacrifício dos animais e o sangue era coletado por punção cardíaca.

3.6.1 - Dosagem de Lítio, Sódio, Potássio, Creatinina, Proteinúria Albuminúria e Glicemia

As concentrações plasmáticas e urinárias de lítio (Li), sódio (Na) e potássio (K) eram realizadas por fotometria de chama, e os resultados eram expressos em mEq/l. As concentrações de creatinina e proteínas foram determinadas espectrofotometricamente pelas técnicas de picrato alcalino e sulfasalicilato respectivamente. A concentração de albumina

foi estimada pela técnica de radioimunoensaio com duplo anticorpo durante todo o estudo (Diagnostic, Los Angeles, CA, USA). Este método tem uma sensibilidade de 0,3 µg/ml, e nossos coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio de 2,7 e 3,5%, respectivamente. Os níveis plasmáticos glicêmicos foram determinados pelo método de reação ezimático, glicose oxidativo. (Lab Test).

3.6.2 - Fórmulas utilizadas

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

3.6.2.1 - *Clearance* de creatinina (Ccr), lítio (CLi⁺) e de sódio (CNa⁺)

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

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

3.6.2.2 - Fração de Excreção de Sódio (FENa⁺)

$$FENa^+ = CENa^+ / CFNa^+ \times 100 (\%),$$

Onde: U é a concentração urinária de Na⁺; Pcr é a concentração plasmática de Na⁺ e Ucr é a concentração urinária de creatinina.

3.6.2.3 - Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEPNa⁺)

$$FEPNa^+ = CLi^+ / CCr \times 100 (\%)$$

Onde: CLi⁺ é o *clearance* de lítio e CCr é o *clearance* de creatinina

3.6.2.4 - Fração de Excreção Pós-Proximal de Sódio (FEPPNa⁺)

$$\text{FEPPNa}^+ = \text{CNa}^+ / \text{CLi}^+ \times 100 (\%)$$

Onde: CNa⁺ é o *clearance* de sódio e CLi⁺ é o *clearance* de lítio

3.6.2.5 - Excreção Urinária de Sódio (UNa⁺ V)

UNa⁺ V, onde UNa⁺ é a concentração urinária de sódio (em mEq/ml) e V o volume urinário (em ml) por minuto.

3.6.2.6 - Fração de Excreção de Potássio (FEK⁺)

$$\text{FEK}^+ = \text{U}_{\text{K}^+} \text{V} / \text{CF}_{\text{K}^+}$$

Onde: U_K⁺ é a concentração urinária de potássio (em mEq/ml). V o volume minuto (μl) e, CF_K⁺ a multiplicação do Ccr (μl/min) pela concentração plasmática de K⁺ em mEq/ml.

3.7.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente em microcomputador, após estatística descritiva dos dados quando foram calculados as médias, erros padrões das médias e desvios padrões. Os grupos foram analisados entre si utilizando-se análise de variância – uma via. Quando diferenças estatísticas entre os grupos eram detectadas, procedia-se testes

de contrastes para os diferentes tempos (dias) experimentais utilizando-se o Teste de Bonferroni.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade de sua casualidade era inferior a 5% ($p < 0,05$).

4 - RESULTADOS

4. 1.0 - Caracterização Geral dos Grupos

4.1.1- Peso Corporal

As Tabelas 1, 2 e Figuras 1, 2 abaixo mostram respectivamente valores médios de peso corporal dos animais dos Grupos I (animais controles CO e diabéticos DM) e II (animais controles tratados CO+L-NAME e diabéticos tratados CO + LNAME) , em relação ao tempo de duração dos experimentos, que foi de 28 dias. Em ambos os grupos experimentais foi observado uma queda progressiva e significativa no peso corporal dos animais DM e DM + L-NAME em relação aos grupos CO e CO+L-NAME respectivamente ao longo dos 28 dias experimentais. Não houve porém, diferença significativa entre valores basais de peso corporal, obtidos antes do início do protocolo experimental, e valores obtidos após a indução do Diabetes dos animais DM e DM + L-NAME.

Peso Corporal - Grupos I e II

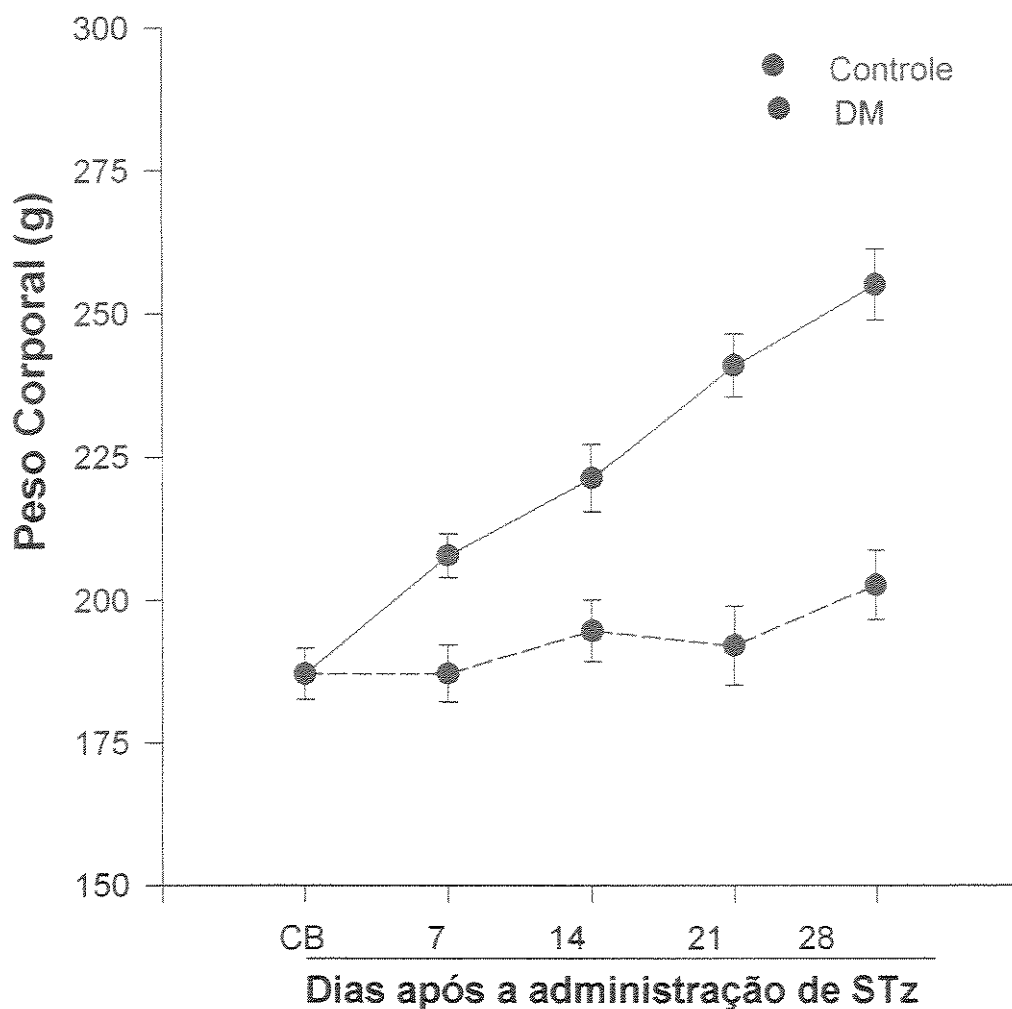


Figura 1: Peso corporal dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em g, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparados com animais controles (CO).

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	187 $\pm$ 4,53	207,8 $\pm$ 3,85	221,3 $\pm$ 5,93	240,8 $\pm$ 5,52	255 $\pm$ 6,21
(n)	11	12	12	12	12
DM	187 $\pm$ 4,53	187,1 $\pm$ 5,02*	194,5 $\pm$ 5,47*	192,4 $\pm$ 6,91*	202,6 $\pm$ 6,11*

Tabela1: Valores médios de peso corporal dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em g, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparados com animais controles (CO).

Peso Corporal - Grupos III e IV

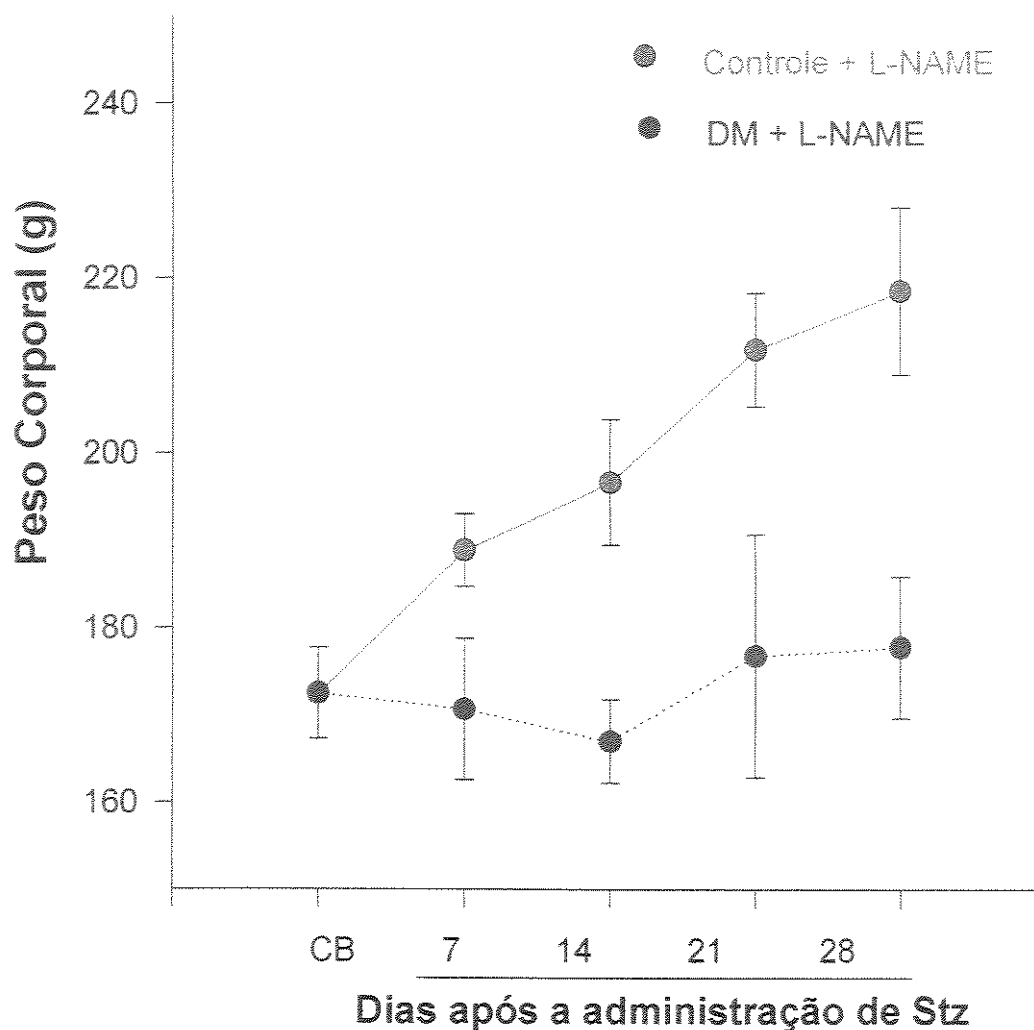


Figura 2: Peso corporal dos animais do Grupo III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em g, como média $\pm$ EPM.* $P < 0,05$ quando comparados com animais controles (CO).

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+ L-Name	172,5 $\pm$ 5,2	188,9 $\pm$ 4,21	196,7 $\pm$ 7,21	211,8 $\pm$ 6,46	218,5 $\pm$ 9,59
(n)	18	8	7	7	6
DM+L-Name	172,5 $\pm$ 5,2	170,7 $\pm$ 8,10*	167 $\pm$ 4,85*	176,8 $\pm$ 13,9*	177,8 $\pm$ 8,13*

Tabela 2: Valores médios de peso corporal dos animais do Grupo III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em g, como média $\pm$ EPM.* $P < 0,05$ quando comparados com animais controles (CO).

4.1.2 - Volume Urinário

Quando comparados os ratos CO com ratos DM (Tabela 3 e Figura 3) e ratos CO+L-NAME com DM+L-NAME (Tabela 4 e Figura 4), observou-se que não há diferença entre estes grupos, quanto ao volume urinário. Entretanto, há uma queda marcante do volume urinário dos animais DM nos dias 7 e 28, quando comparados com os valores basais (CB). Os animais CO também apresentaram queda significativa do seu volume urinário em relação ao CB a partir do décimo quarto dia até o final do experimento. No sétimo dia de experimento foi verificado uma queda no volume urinário dos animais DM+L-NAME em relação ao CB e queda significativa dos ratos CO+L-NAME em relação ao CB somente no final do experimento (28º dia).

Volume urinário - Grupos I e II

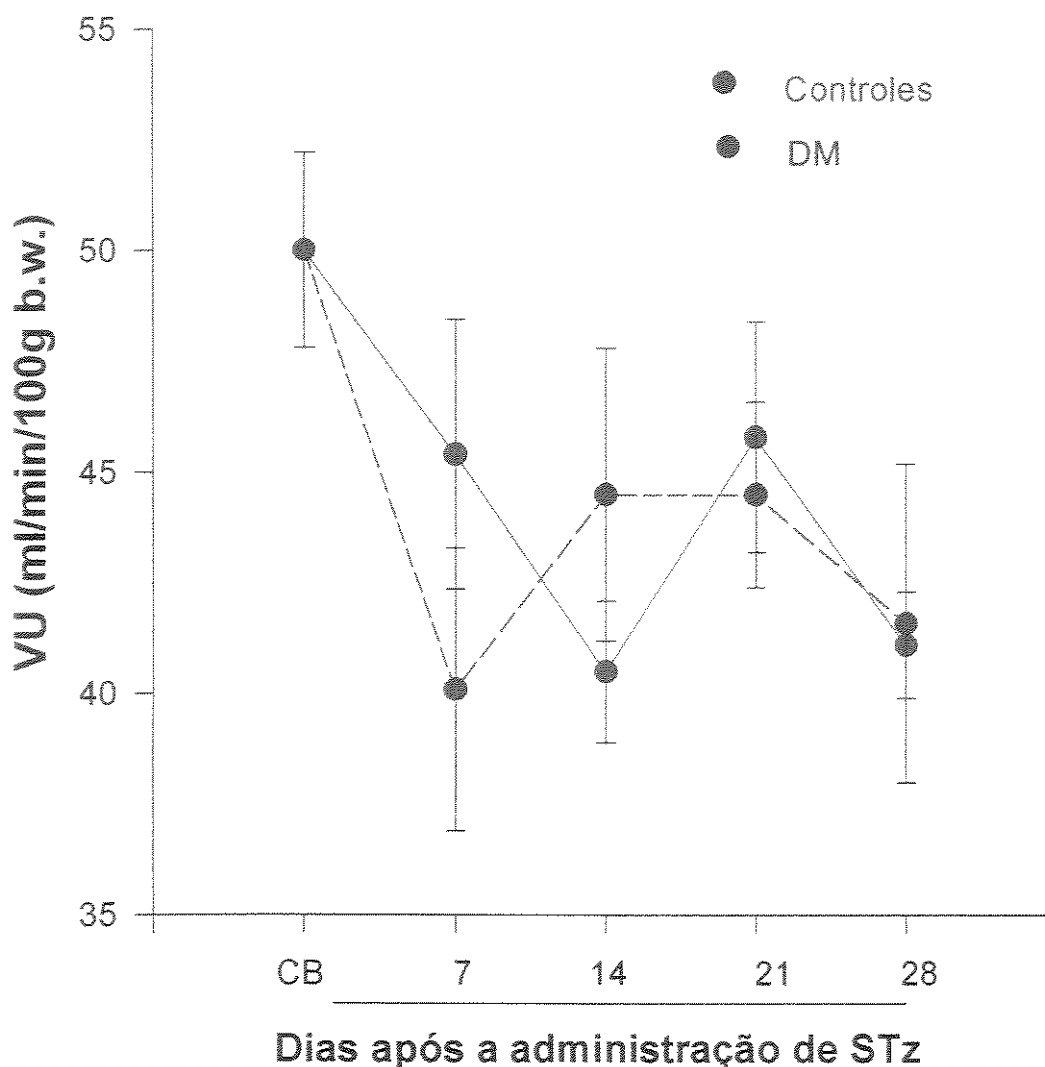


Figura 3: Volume urinário dos animais do Grupo I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em ml/min/100g/rato , como média $\pm$ EPM. *P<0,05 quando comparados ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	49,9 $\pm$ 2,16	45,4 $\pm$ 3,04	40,4 $\pm$ 1,63*	45,8 $\pm$ 7,97*	41,1 $\pm$ 1,17*
(n)	11	12	12	12	12
DM	49,9 $\pm$ 2,16	40,1 $\pm$ 3,22*	44,4 $\pm$ 3,33	44,5 $\pm$ 2,12*	41,6 $\pm$ 3,61*

Tabela 3: Valores médios de volume urinário dos animais do Grupo I ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em ml/min/100g/rato , como média $\pm$ EPM. *P<0,05 quando comparados ao CB.

Volume urinário - Grupos III e IV

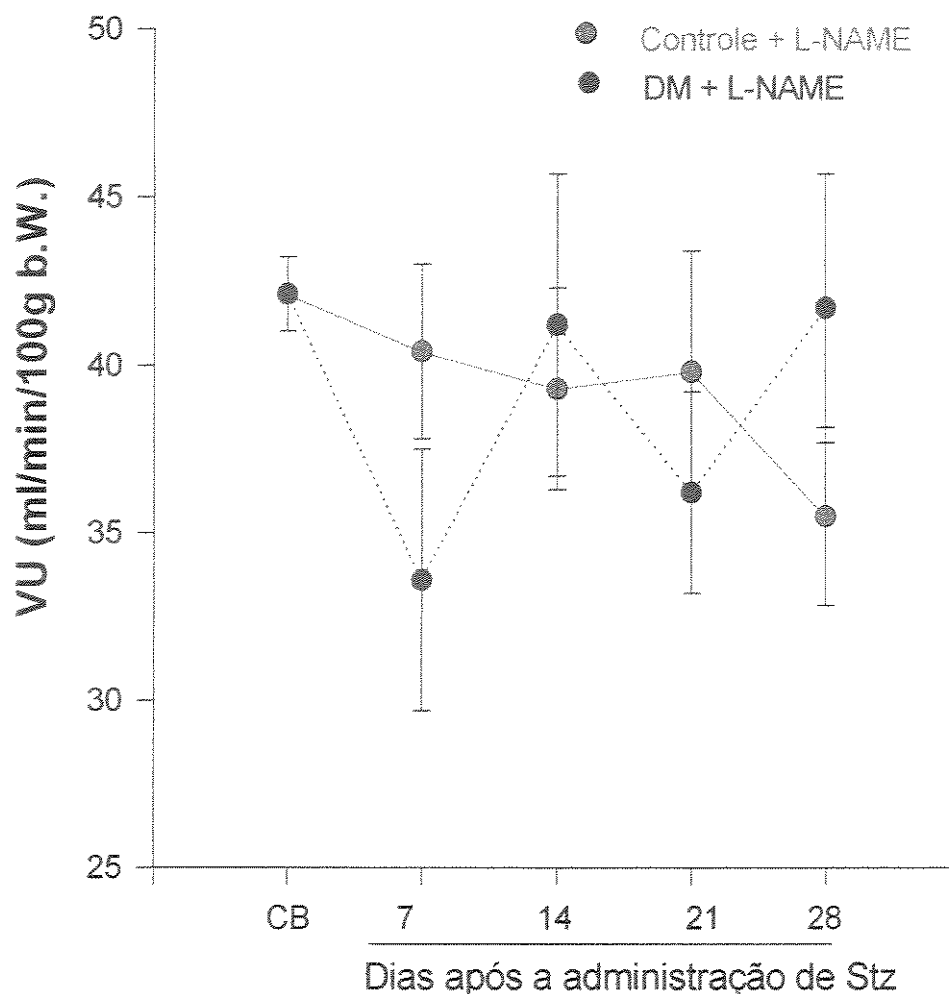


Figura 4: Valores médios de volume urinário do Grupo III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em ml/min/100g/rato, como média $\pm$ EPM. *P<0,05 quando comparados ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+ L-Name	42,1 $\pm$ 1,12	40,4 $\pm$ 2,63	39,3 $\pm$ 3,03	39,8 $\pm$ 3,66	35,5 $\pm$ 2,65*
(n)	18	8	7	7	6
DM+L-Name	42,1 $\pm$ 1,12	33,6 $\pm$ 3,91*	41,1 $\pm$ 4,52	36,2 $\pm$ 2,97	41,6 $\pm$ 4,07

Tabela 4: Valores médios de volume urinário do Grupo III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em ml/min/100g/rato, como média $\pm$ EPM. *P<0,05 quando comparados ao CB.

4.1.3 – Glicemia

Após a indução do diabetes, por estreptozocina, o grupo II apresentou um aumento significativo da glicemia, quando comparado ao grupo I e ao valor basal. Este aumento permaneceu durante todo o período experimental. À partir do sétimo dia até o vigésimo oitavo dia, houve uma queda dos níveis glicêmicos nos animais do grupo I, quando comparados ao valor basal. (Figura 5 e Tabela 5).

Houve um aumento significativo da glicemia, nos animais DM+L-NAME, logo após a administração de estreptozocina, quando comparados aos animais CO+LNAME. A glicemia permaneceu alta nos animais DM+L-NAME nos dias 7 e 14, no 21º dia, houve uma queda da glicemia, valor este que tornou a se elevar no 28º dia do experimento. Os animais do grupo III apresentam valores glicêmicos iguais ao valor basal durante todo o período experimental. (Figura 6 e Tabela 6).

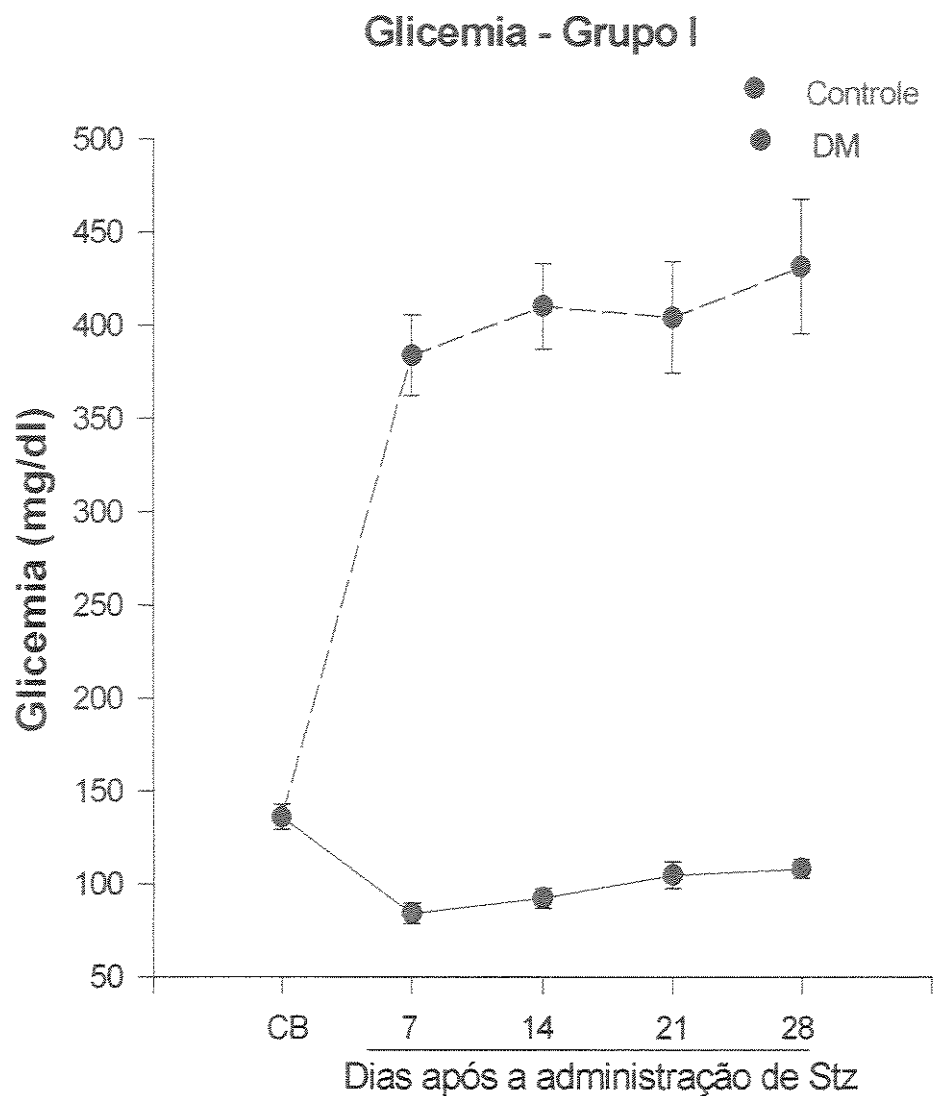


Figura 5: Glicemia dos animais do Grupo I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mg/dl, como média $\pm$ EPM.* $P < 0,05$ quando comparados ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	136,1 $\pm$ 6,7	84,0 $\pm$ 5,6*	92,3 $\pm$ 5,4 *	104,9 $\pm$ 7,2*	108,2 $\pm$ 5,1*
(n)	11	12	12	12	12
DM	136,1 $\pm$ 6,7	383,8 $\pm$ 21,6*	410,2 $\pm$ 22,9*	404,2 $\pm$ 29,8*	431,5 $\pm$ 36,2*

Tabela 5: Valores médios de glicemia dos animais do Grupo I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mg/dl, como média $\pm$ EPM.* $P < 0,05$ quando comparados ao CB.

Glicemia - Grupos III e IV

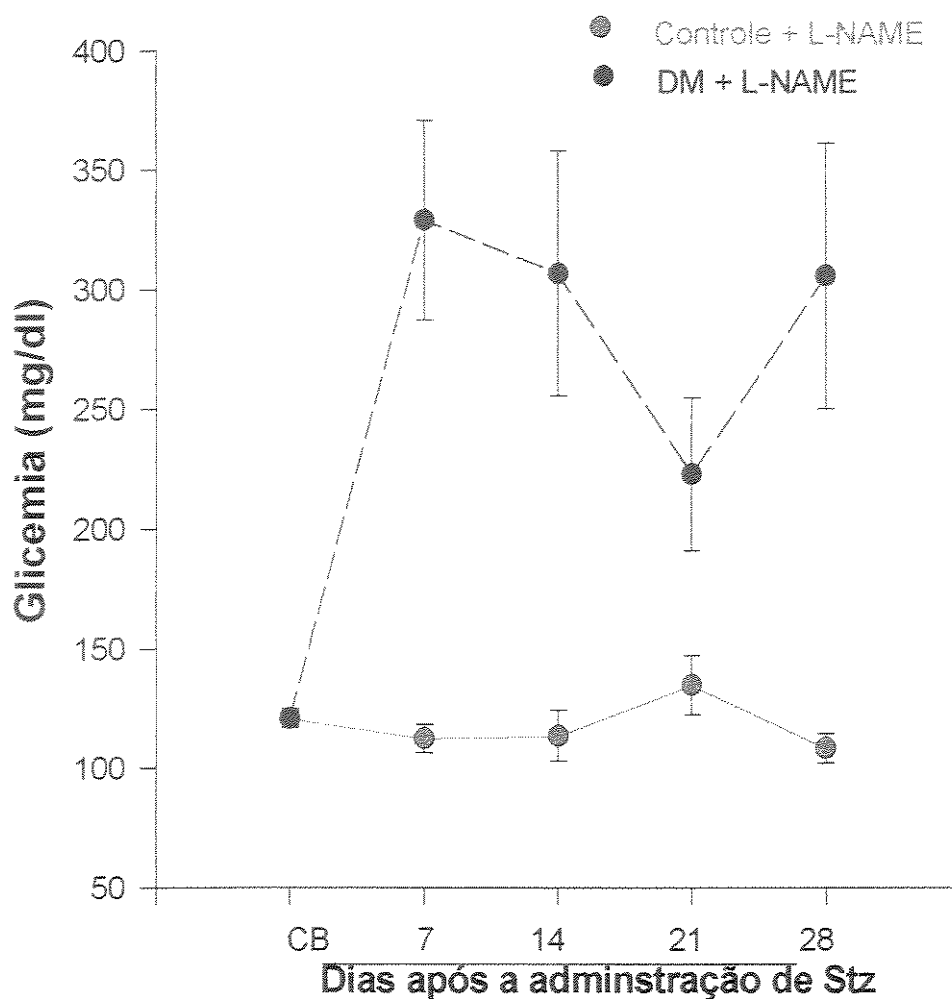


Figura 6: Glicemia do Grupo III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mg/dl, como média $\pm$ EPM.* $P < 0,05$ quando comparados ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+ L-Name	120,8 $\pm$ 3,8	112,4 $\pm$ 6,0*	113,6 $\pm$ 10,7	134,8 $\pm$ 12,3	108,4 $\pm$ 6,2*
(n)	18	8	7	7	6
DM+L-Name	120,8 $\pm$ 3,8	329,1 $\pm$ 41,7*	306,9 $\pm$ 51,2*	223,1 $\pm$ 32,0*	305,9 $\pm$ 55,5*

Tabela 6: Valores médios de glicemia do Grupo III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados mg/dl, como média $\pm$ EPM.* $P < 0,05$ quando comparados ao CB.

4.2.0 - Estudo Funcional Renal

4.2.1 - *Clearance* de Creatinina

Os animais DM apresentaram uma queda acentuada do *clearance* de creatinina por volta do 21º dia permanecendo até o 28º dia de experimento, quando comparados com valores basais, não havendo portanto, diferença significativa entre animais DM e CO (Tabela 7 e Figura 7).

Nos Grupos III e IV, foi observado diferença significativa entre animais DM+L-NAME e CO+L-NAME somente no início do protocolo experimental (7º dia), onde ocorre um aumento do *clearance* de creatinina dos animais CO+L-NAME. Nos dias 14 e 21 os animais CO+L-NAME e DM+L-NAME apresentam *clearance* de creatinina iguais ao valor basal, porém em ambos grupos de animais, no 28 dia de experimento, apresentaram uma queda marcante na filtração glomerular (Tabela 8 e Figura 8).

Clearance de Creatinina - Grupos I e II

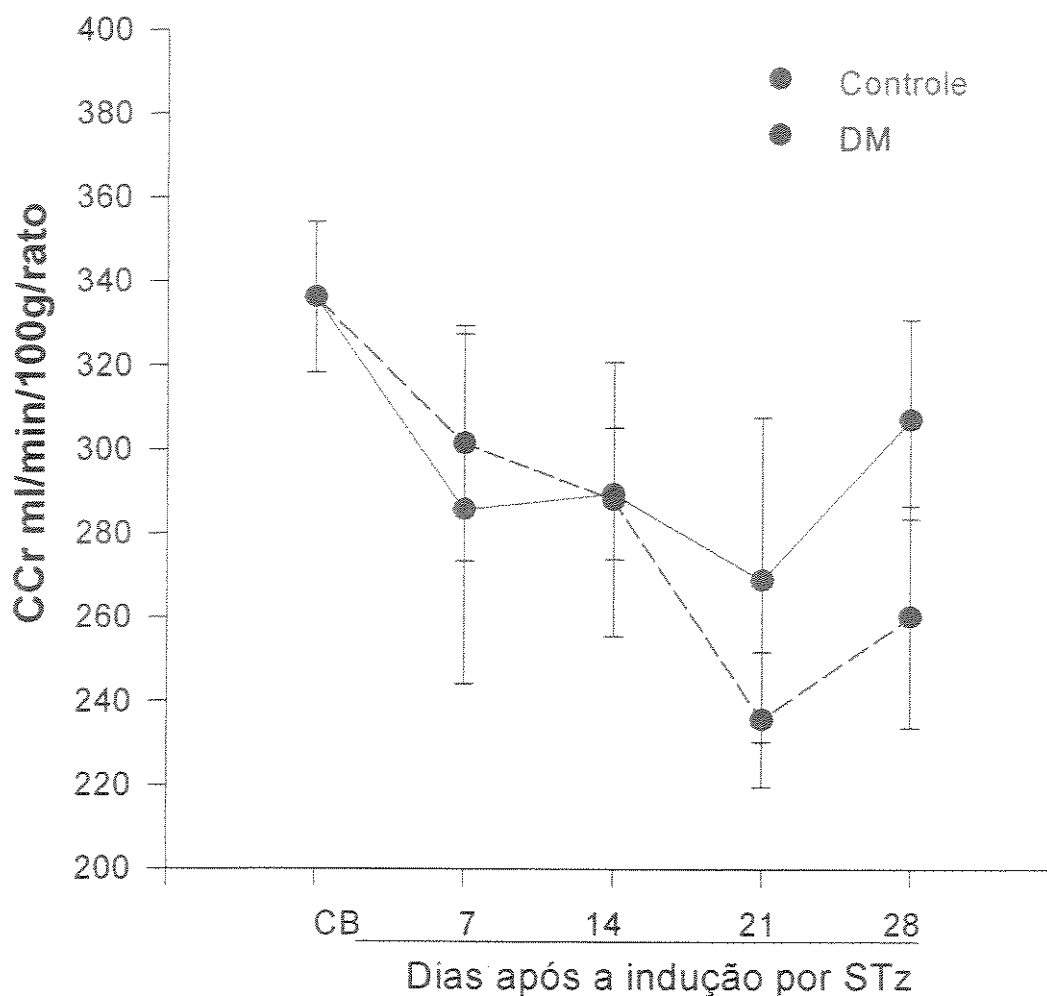


Figura 7: Valores médios de *clearance* creatinina dos animais dos Grupo I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	336,2 $\pm$ 18,0	285,8 $\pm$ 41,7	289,6 $\pm$ 15,7	269,1 $\pm$ 38,6	307,3 $\pm$ 23,7
(n)	11	12	12	12	12
DM	336,2 $\pm$ 18,0	301,6 $\pm$ 28,0	288,1 $\pm$ 32,6	235,7 $\pm$ 16,1*	260,3 $\pm$ 26,5*

Tabela 7: Valores médios de *clearance* creatinina dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Clearance de creatinina - Grupos III e IV

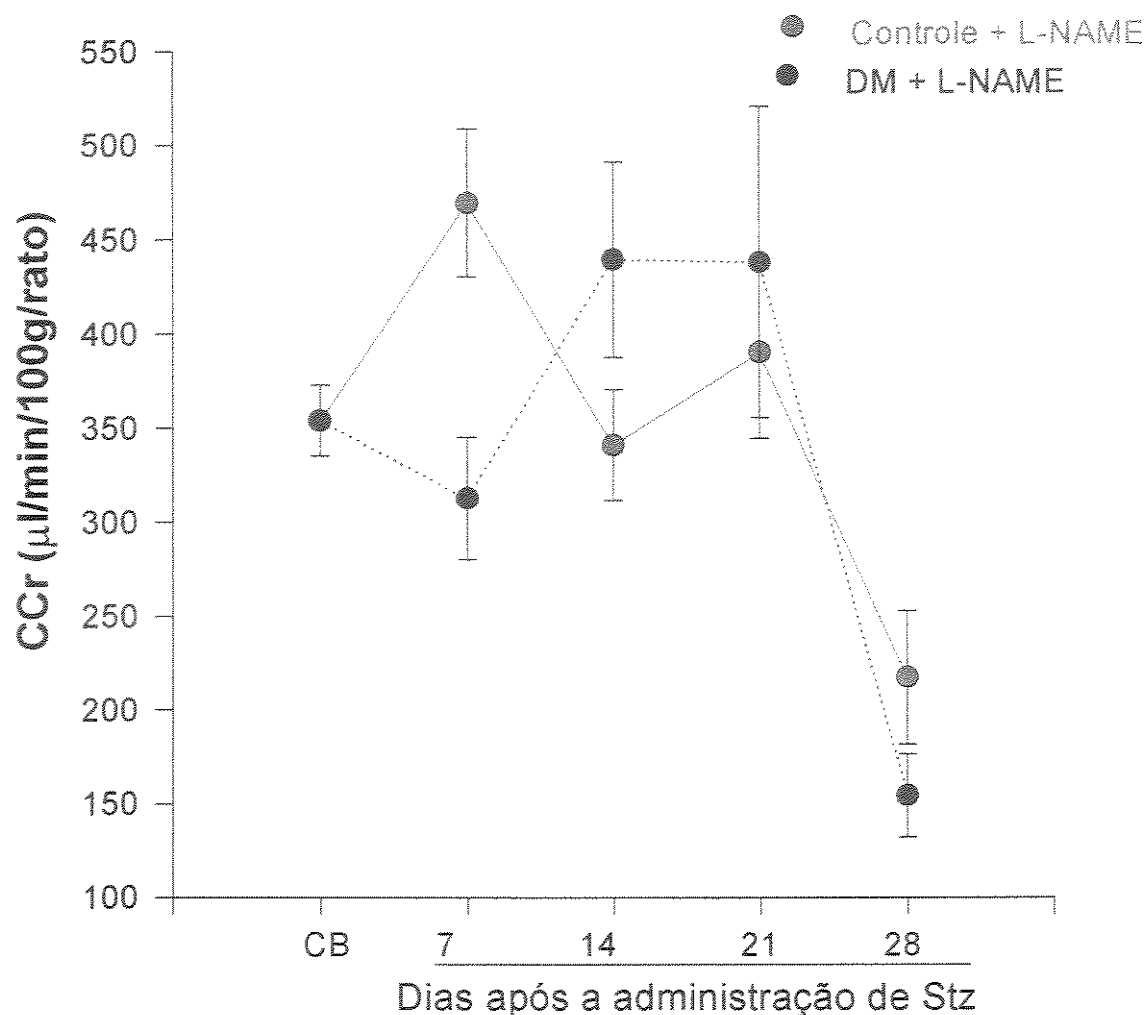


Figura 8: Valores médios de *clearance* de creatinina dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm\text{EPM}$. * $P < 0,05$ quando comparados ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+ L-Name	354,1 $\pm$ 19,0	469,8 $\pm$ 39,4*	341,2 $\pm$ 29,3	390,5 $\pm$ 45,8	217,4 $\pm$ 35,6*
(n)	18	8	7	7	6
DM+L-Name	354,1 $\pm$ 19,0	312,8 $\pm$ 32,4	439,7 $\pm$ 51,8	438,1 $\pm$ 82,7	154,3 $\pm$ 22,2*

Tabela 8: Valores médios de *clearance* de creatinina dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm\text{EPM}$. * $P < 0,05$ quando comparados ao CB.

4.2.2 - Manipulação Tubular de Sódio

Com a finalidade de verificar a manipulação tubular de Na^+ fez-se as seguintes avaliações:.

4.2.2.1 - Fração de Excreção de Sódio

A Fração de Excreção de Sódio, nos grupos I e II, apresentam valores semelhantes durante a maior parte do protocolo, embora os DM demonstrem uma tendência a elevação, desde o início. Somente à partir do 28º é que a FENa^+ torna-se claramente elevada nos animais DM. Porém quando comparados com valores basais este aumento torna-se marcante à partir do 21º dia do protocolo (Tabela 9 e figura 9).

O comportamento dos animais dos grupos III e IV foi semelhante aos grupos I e II, ou seja, com tendência a elevação desse parâmetro mais acentuado nos animais DM-LNAME. Muito embora, não apresentassem diferenças significativas entre as curvas dos animais CO- L-NAME e DM+L-NAME. Quando se compara os valores basais (CB), o quadro é outro, tanto CO+L-NAME quanto DM+L-NAME apresentaram elevações da FENa^+ gradativas do início até os últimos dias do experimento, sendo que foi observado um aumento mais acentuado nos animais DM+L-NAME no vigésimo oitavo dia. (Tabela e Figura 10).

Fração de Excreção de Sódio - Grupos I e II

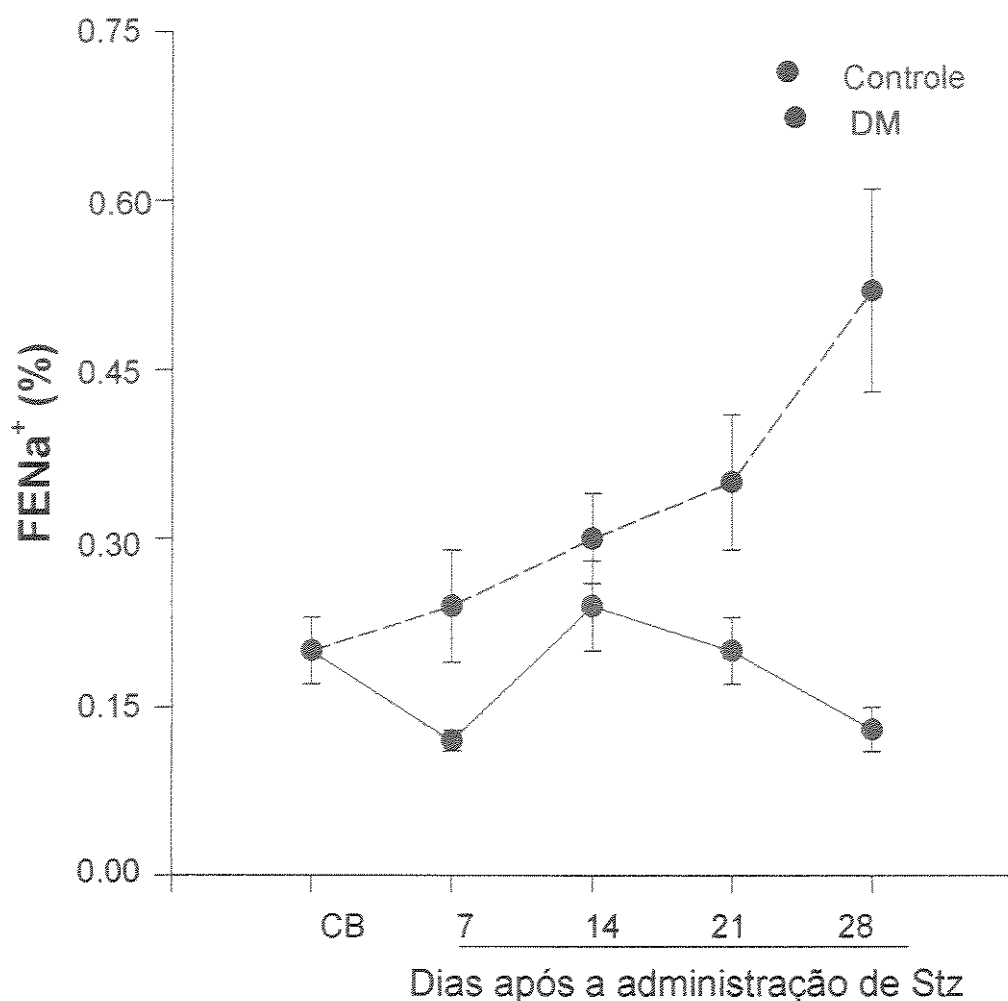


Figura 9: Valores médios de Fração de excreção de Na^+ dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	0,204 $\pm$ 0,03	0,127 $\pm$ 0,009	0,246 $\pm$ 0,04	0,208 $\pm$ 0,03	0,132 $\pm$ 0,02
(n)	11	12	12	12	12
DM	0,204 $\pm$ 0,03	0,244 $\pm$ 0,05	0,308 $\pm$ 0,04	0,350 $\pm$ 0,06*	0,529 $\pm$ 0,09*

Tabela 9: Valores médios de Fração de excreção de Na^+ dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Fração de Excreção de Sódio - Grupos III e IV

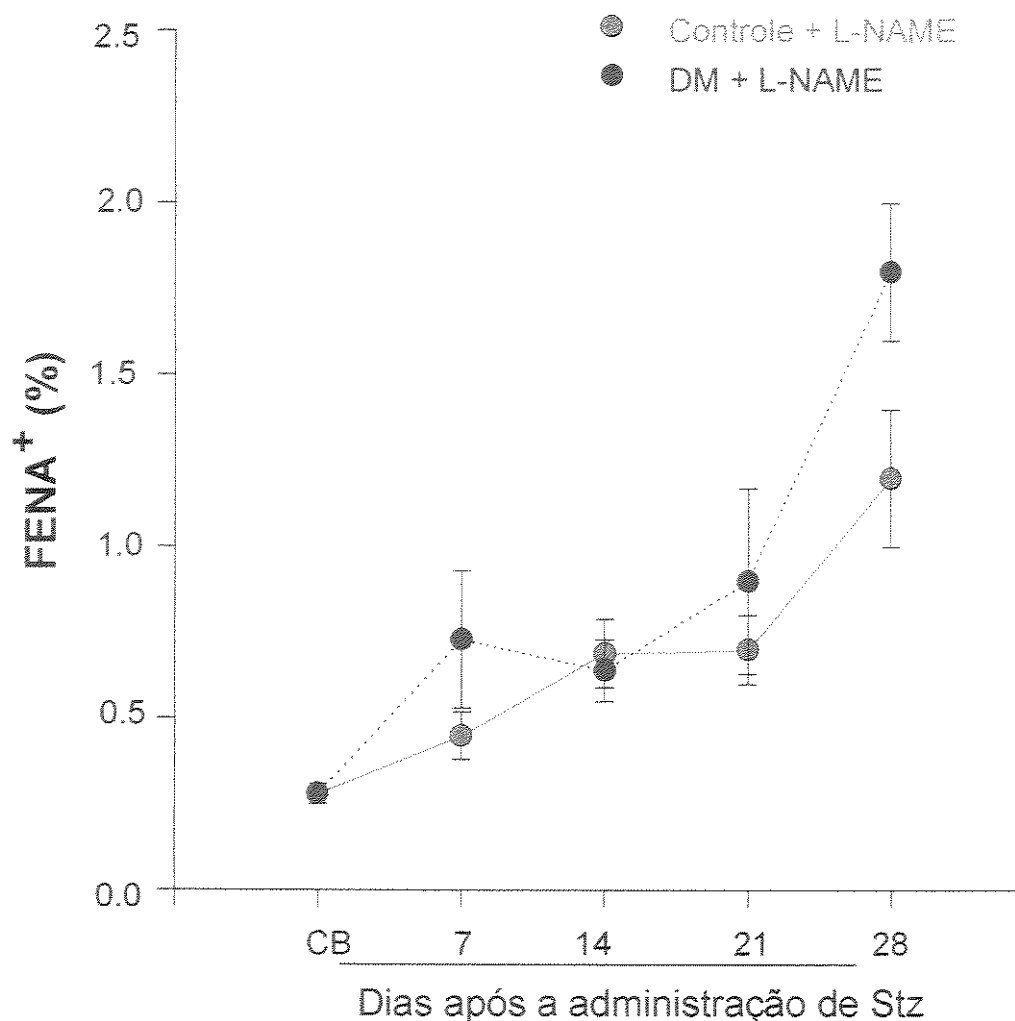


Figura 10: Valores médios de Fração de excreção de Na^+ nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO L-name	0,287 $\pm$ 0,03	0,459 $\pm$ 0,07*	0,680 $\pm$ 0,12*	0,694 $\pm$ 0,12*	1,190 $\pm$ 0,25
(n)	18	8	7	7	6
DM L-name	0,287 $\pm$ 0,03	0,732 $\pm$ 0,20*	0,641 $\pm$ 0,09*	0,884 $\pm$ 0,27*	1,797 $\pm$ 0,22*

Tabela 10: Valores médios de Fração de excreção de Na^+ nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

4.2.2.2 – Fração Excreção Proximal de Sódio (FEPNa⁺)

Os animais do grupo I não apresentaram diferença significativa alguma, quanto a FEPNa⁺, quando comparou-se animais CO e DM entre si e quando comparados com valores basais. (Tabela e Figura 11).

A Fração Proximal de Sódio nos animais dos grupo III e IV se mantêm inalteradas, ou seja, com valores bem próximos ao valor basal, tanto em animais CO+L-NAME como em animais DM+L-NAME, até o 28°. Neste período do experimento ocorre um aumento significativo da FEPNa⁺ nos animais CO+L-NAME e DM+L-NAME, sendo mais marcante neste último grupo. (Tabela e Figura 12).

Excreção Fracional Proximal de Sódio - Grupos I e II

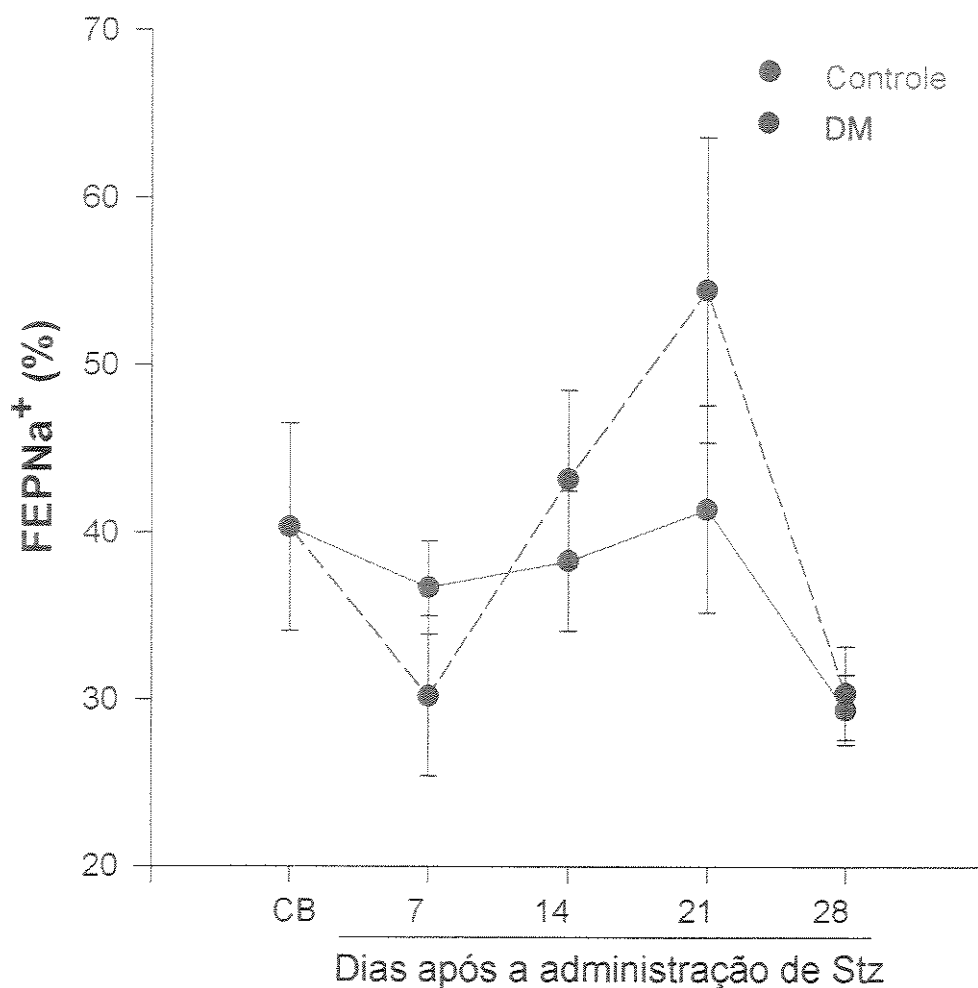


Figura 11: Valores médios de Fração de Excreção Proximal de Na^+ dos animais do Grupo I ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	40,2 $\pm$ 6,2	36,7 $\pm$ 2,8	38,3 $\pm$ 4,2	41,4 $\pm$ 6,2	29,4 $\pm$ 2,14
(n)	11	12	12	12	12
DM	40,2 $\pm$ 6,2	30,3 $\pm$ 4,8	43,2 $\pm$ 5,3	54,5 $\pm$ 9,1	30,4 $\pm$ 2,8

Tabela 11: Valores médios de Fração de Excreção Proximal de Na^+ dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Fração de Excreção Proximal de Sódio - Grupos III e IV

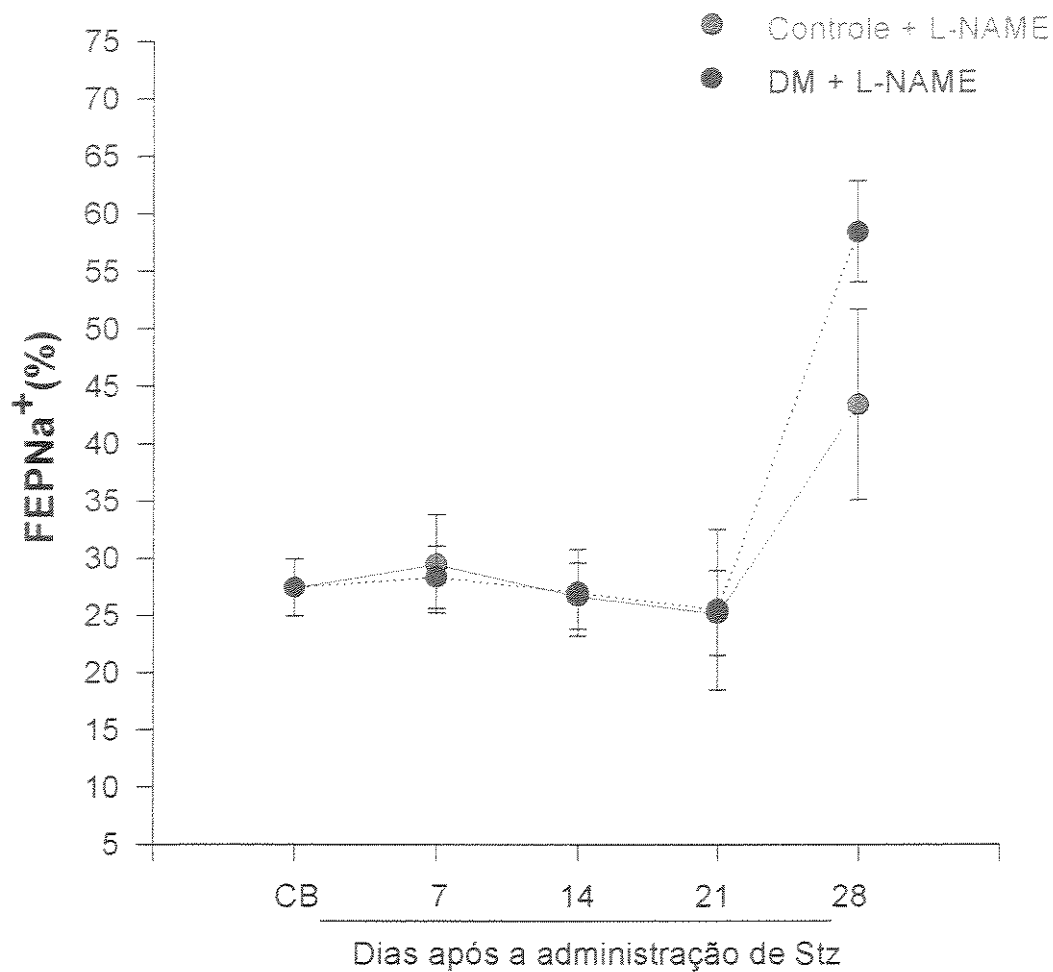


Figura 12: Valores médios de Fração de Excreção Proximal de Na^+ nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB..

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO L-Name	27,4 $\pm$ 2,5	29,5 $\pm$ 4,2	26,7 $\pm$ 2,8	25,1 $\pm$ 3,6	43,4 $\pm$ 8,3
(n)	18	8	7	7	6
DM L-Name	27,4 $\pm$ 2,5	28,4 $\pm$ 2,7	27,0 $\pm$ 3,8	25,5 $\pm$ 6,9	58,4 $\pm$ 4,4*

Tabela 12: Valores médios de Fração de Excreção Proximal de Na^+ nos animais do Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

4.2.2.3 - Fração de Excreção Pós-Proximal de Sódio (FEPPNa⁺)

Como mostra o figura 11, os animais DM , do grupo II, apresentaram um aumento da FEPPNa⁺ no 7º dia do protocolo experimental, em relação aos animais controle, grupo I, e também quando comparados ao valor basal, porém tal aumento tornou-se realmente expressivo no final do experimento, aos vinte e oito dias (Figura e tabela 13).

Não foi observado diferença alguma entre os animais CO+L-NAME e DM+L-NAME, mas a análise comparativa entre os animais dos dois grupos e valores basais, revelaram uma elevação gradativa, ao longo do experimento. (Tabela e Figura 14).

Excreção Fracional Pós-Proximal - Grupos I e II

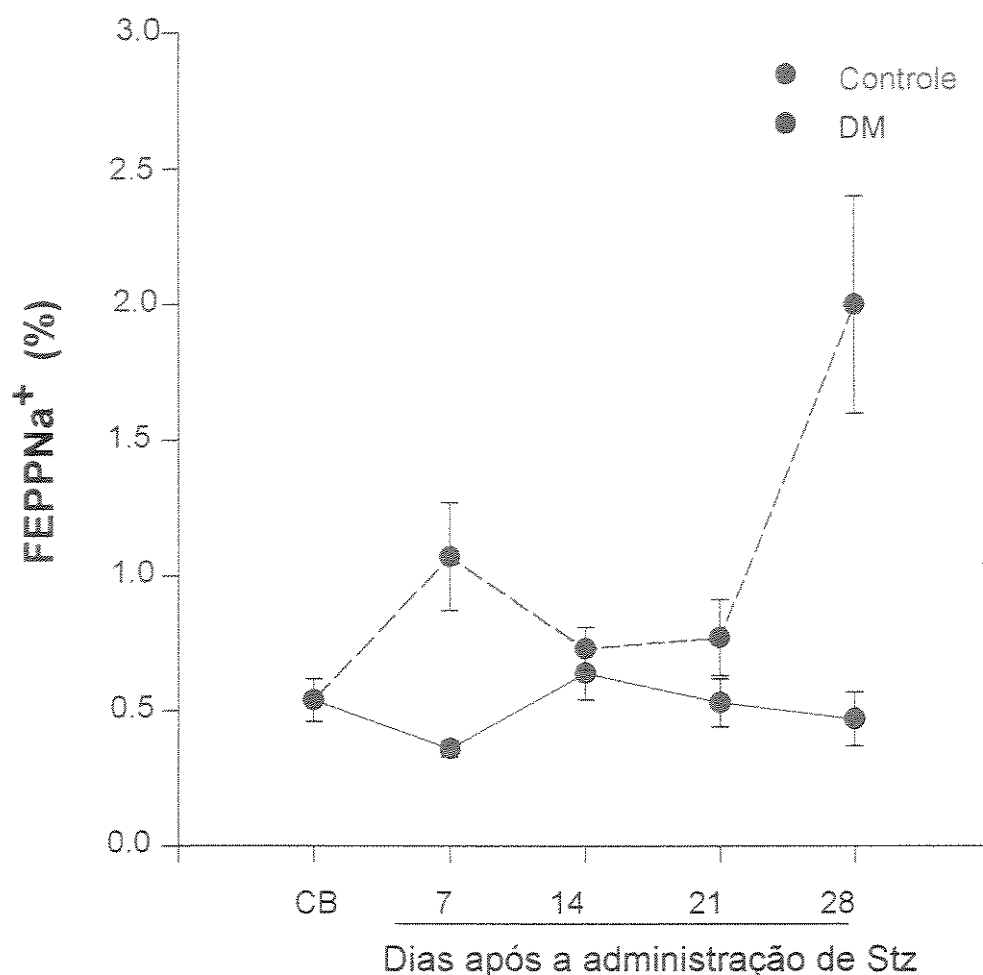


Figura 13: Valores médios de Fração de Excreção Pós -Proximal de Na^+ dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	0,546 $\pm$ 0,08	0,363 $\pm$ 0,03	0,642 $\pm$ 0,10	0,535 $\pm$ 0,09	0,474 $\pm$ 0,10
(n)	11	12	12	12	12
DM	0,546 $\pm$ 0,08	1,070 $\pm$ 0,28	0,738 $\pm$ 0,08	0,778 $\pm$ 0,14	2,07 $\pm$ 0,45*

Tabela 13: Valores médios de Fração de Excreção Pós -Proximal de Na^+ dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Fração de Excreção Pós Proximal de Sódio - Grupos III e IV

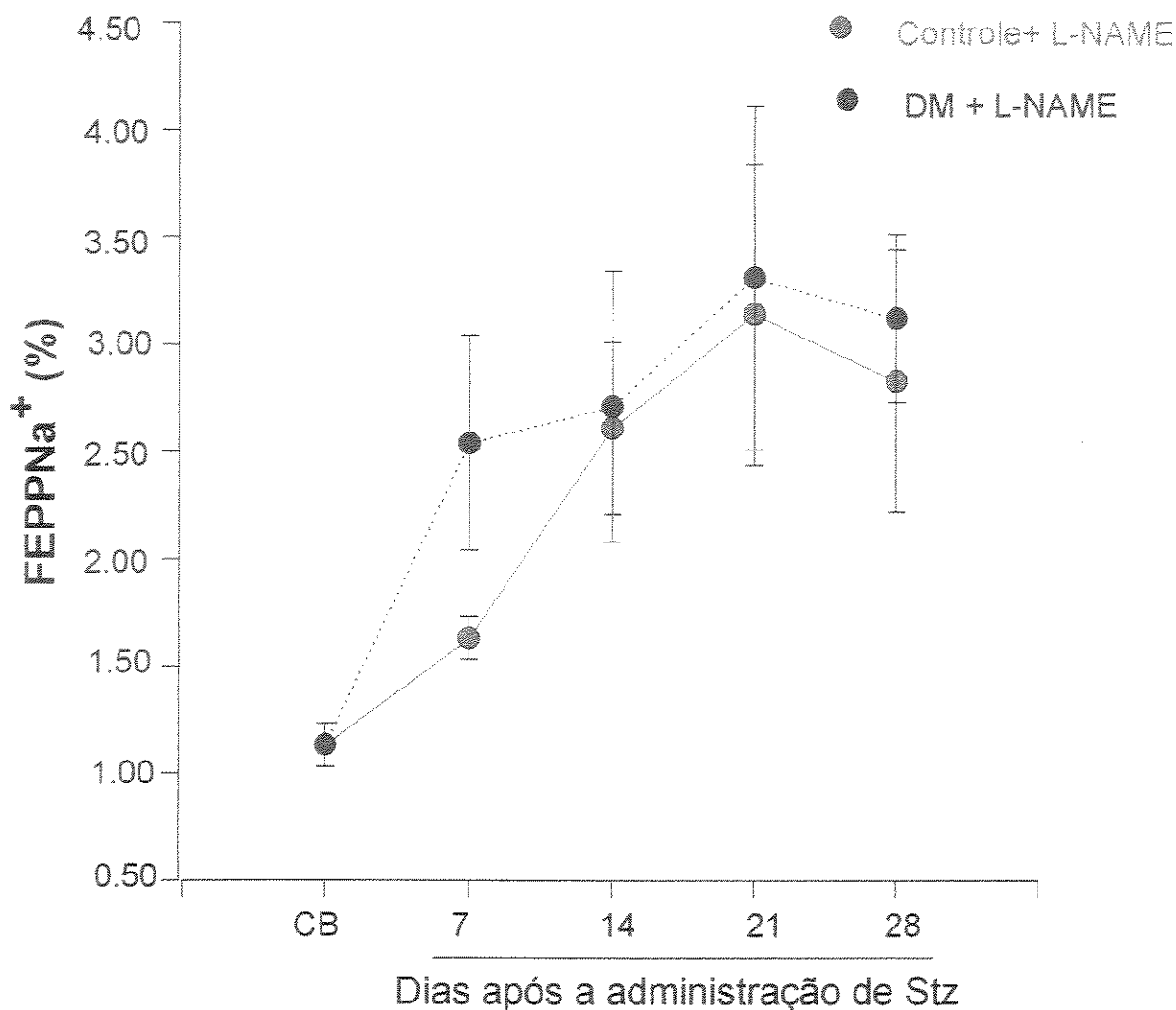


Figura 14: Valores médios de Fração de Excreção Pós -Proximal de Na^+ nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO L-Name	1,133 $\pm$ 0,14	1,625 $\pm$ 0,14	2,619 $\pm$ 0,39 *	3,149 $\pm$ 0,70*	2,834 $\pm$ 0,61*
(n)	18	8	7	7	6
DM L-Name	1,133 $\pm$ 0,14	2,542 $\pm$ 0,51*	2,718 $\pm$ 0,63 *	3,316 $\pm$ 0,87*	3,120 $\pm$ 0,39*

Tabela 14: Valores médios de Fração de Excreção Pós -Proximal de Na^+ nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

4.2.2.4 - *Clearance* de Sódio (CNa^+)

Os animais DM, do grupo II, apresentaram aumento do *clearance* de sódio, ao longo do experimento, quando comparados com valor basal, sendo este aumento significativo no vigésimo oitavo dias de estudo. (Tabela e figura 15).

Os resultados obtidos do *clearance* de sódio, ilustrados no Figura e Tabela 16 mostram uma elevação deste parâmetro, nos ratos DM+L-NAME e CO+L-NAME, quando comparados ao valor basal. Tal elevação é sentida à partir do sétimo dia do estudo, permanecendo até o final do experimento. Porém quando se compara os dois grupos entre si não há diferença significativa.

Clearance de Sódio - Grupos I e II

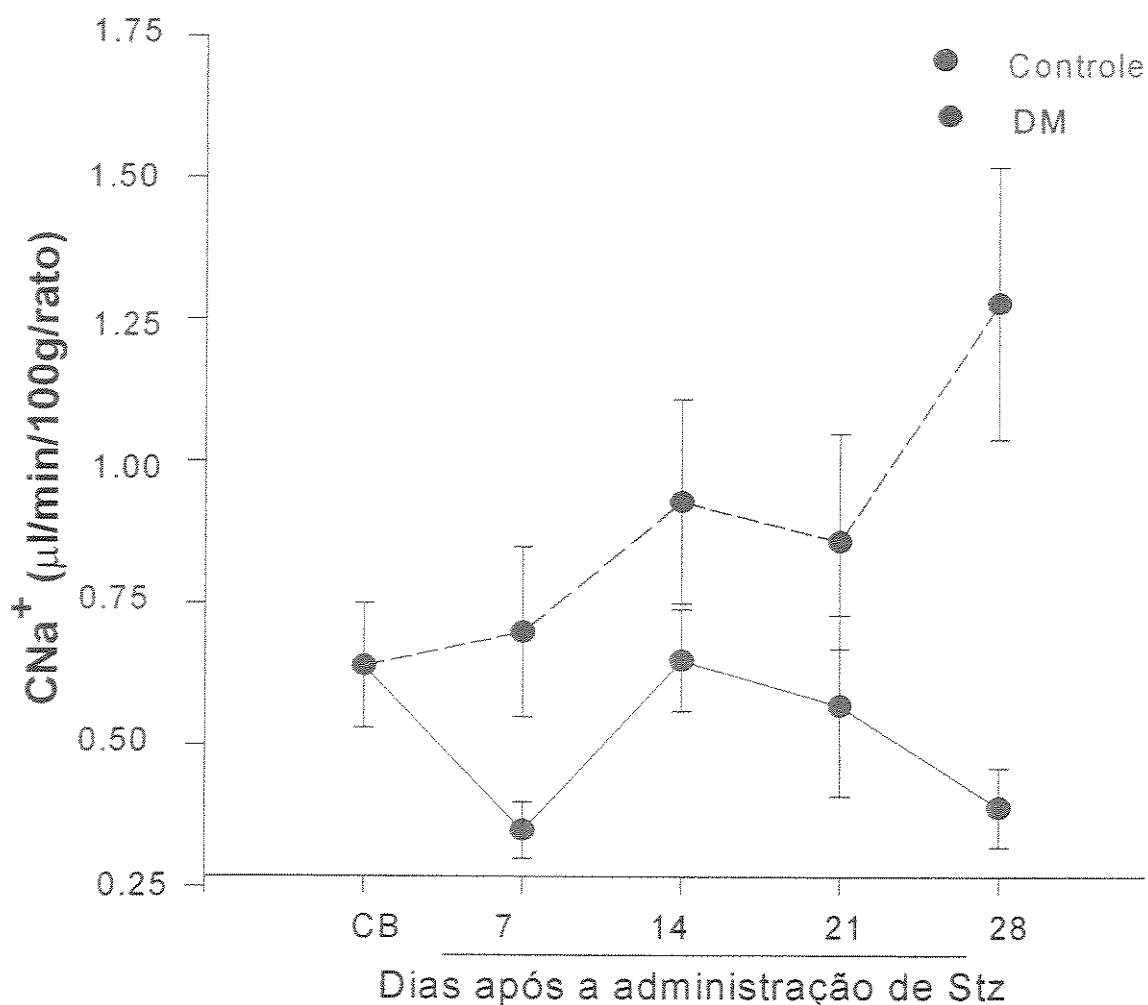


Figura 15: Valores médios de *Clearance* de Sódio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	0,645 $\pm$ 0,11	0,352 $\pm$ 0,05	0,653 $\pm$ 0,09	0,573 $\pm$ 0,16	0,398 $\pm$ 0,07
(n)	11	12	12	12	12
DM	0,645 $\pm$ 0,11	0,708 $\pm$ 0,15	0,930 $\pm$ 0,18	0,861 $\pm$ 0,19	1,284 $\pm$ 0,24*

Tabela 15: Valores médios de *Clearance* de Sódio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Clearance de Sódio - Grupos III e IV

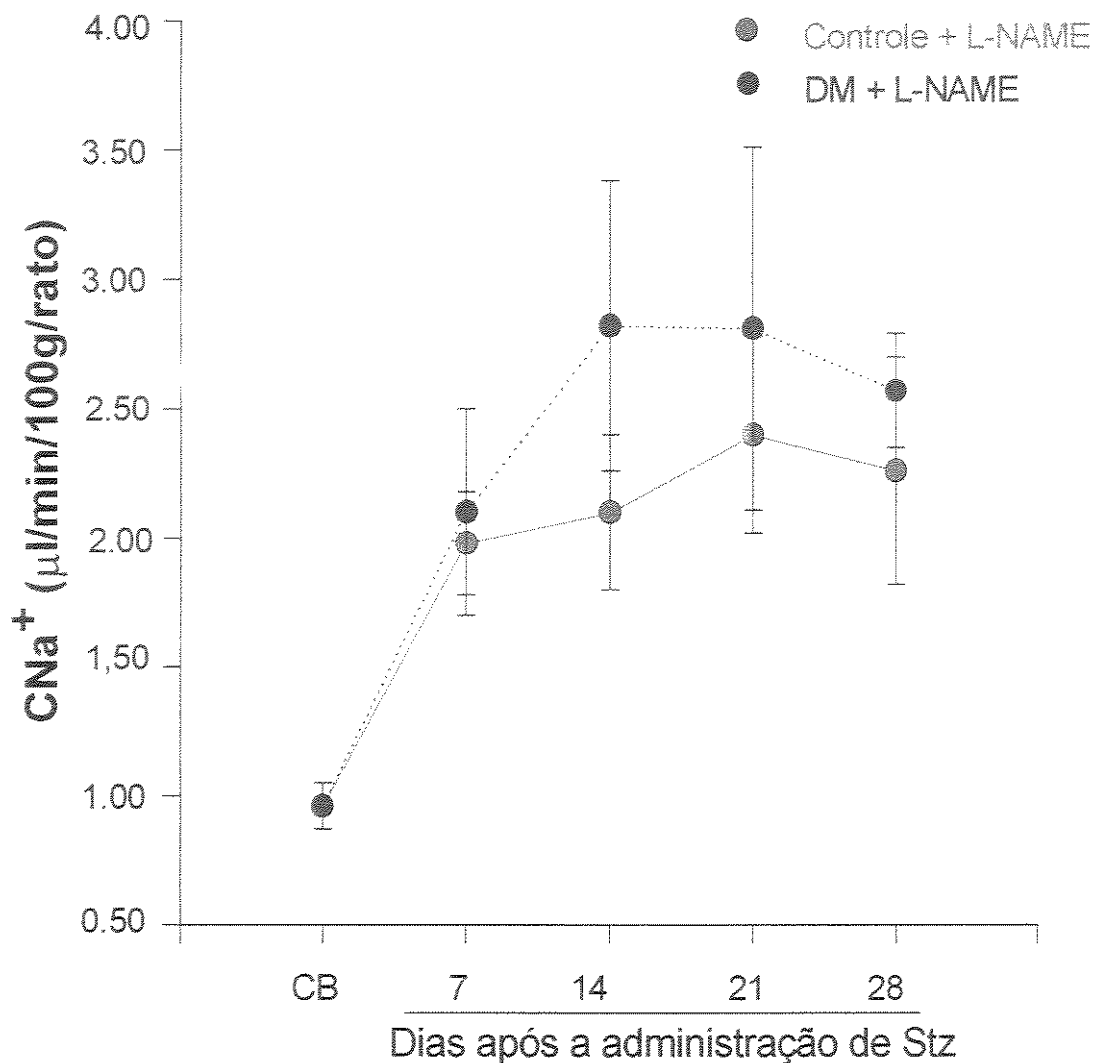


Figura 16: Valores médios de *Clearance* de Sódio nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+L-Name	0,966 $\pm$ 0,09	1,989 $\pm$ 0,21*	2,133 $\pm$ 0,32 *	2,390 $\pm$ 0,38*	2,260 $\pm$ 0,44*
(n)	18	8	7	7	6
DM+Lname	0,966 $\pm$ 0,09	2,106 $\pm$ 0,48*	2,826 $\pm$ 0,56 *	2,810 $\pm$ 0,76*	2,577 $\pm$ 0,22*

Tabela 16: Valores médios de *Clearance* de Sódio nos animais do Grupo III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

4.2.2.5 - *Clearance* de Lítio

Os animais CO e DM do grupo I não são diferentes, quanto ao parâmetro *clearance* de lítio, porém apresentam uma tendência a diminuição do *clearance* de lítio quando se compara com o CB. Os ratos DM mostraram queda significativa no 7º e 28º dia experimental e os ratos CO somente no 28º. (Tabela e Figura 17)

O *clearance* de lítio apresenta-se aumentado expressivamente nos animais CO+L-NAME, somente no sétimo dia, após este período ocorre uma queda, que permanece até o final do protocolo. Os animais DM+L-NAME, quando comparados ao valor basal, apresentam um aumento do *clearance* somente no décimo quarto dia. (Tabela e Figura 18).

Clearance de Lítio - Grupos I e II

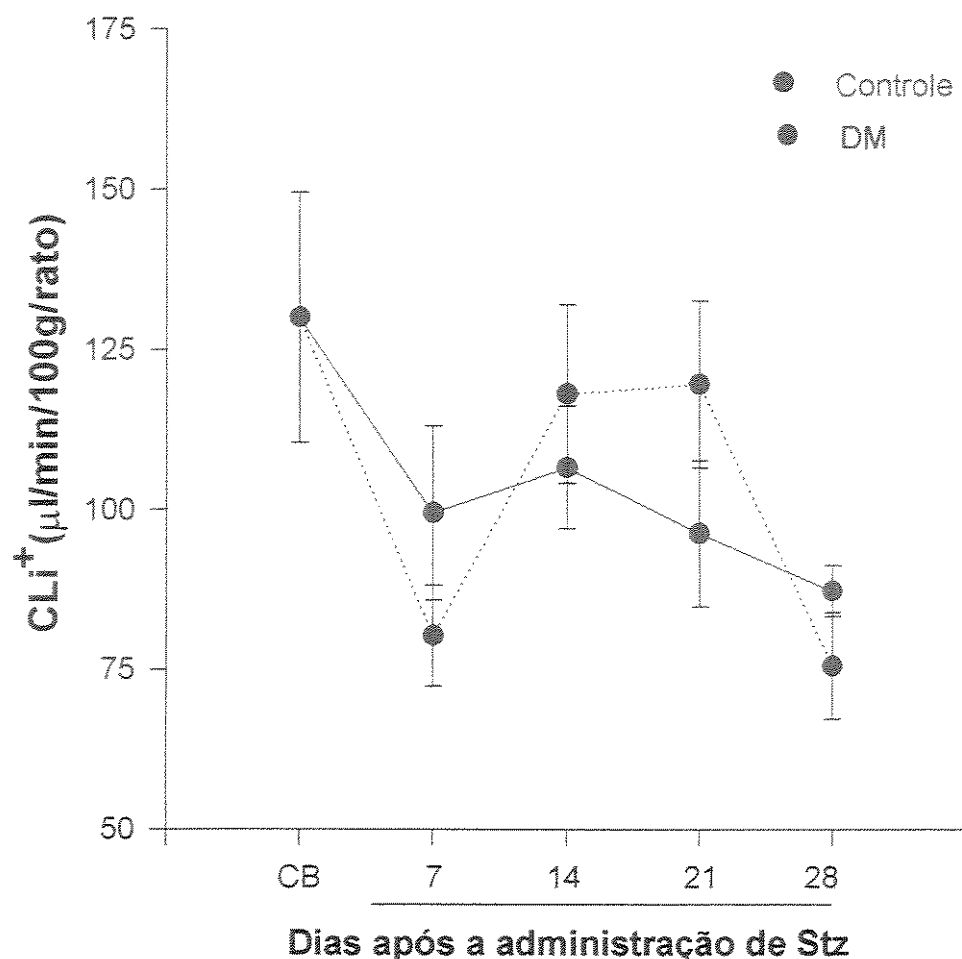


Figura 17: Valores médios de *Clearance* de Lítio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	130,0 $\pm$ 19,5	99,5 $\pm$ 13,68	106,64 $\pm$ 9,65	96,34 $\pm$ 11,4	87,3 $\pm$ 4,0*
(n)	11	12	12	12	12
DM	130,0 $\pm$ 19,5	80,33 $\pm$ 7,93*	118,1 $\pm$ 13,9	119,5 $\pm$ 13,0	75,5 $\pm$ 8,26*

Tabela 17: Valores médios de *Clearance* de Lítio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Clearance de Lítio - Grupos III e IV

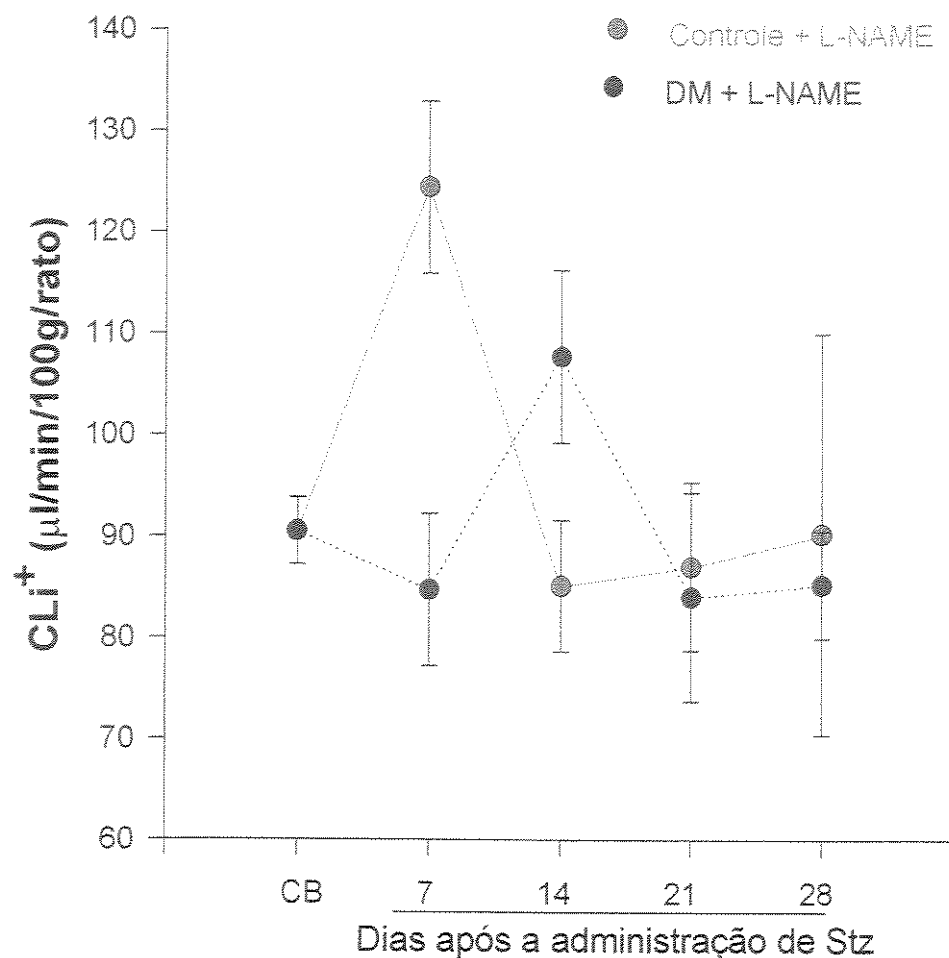


Figura 18: Valores médios de *clearance* de Lítio nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+L-Name	90,49± 3,31	124,4± 8,5*	85,08±6,55	87,0± 8,29	90,24±19,7
(n)	18	8	7	7	6
DM+LName	90,49± 3,31	84,72±7,51	107,68±8,4 *	83,9± 10,2	85,26± 5,3

Tabela 18: Valores médios de *Clearance* de Lítio nos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

4.2.2.6 - Excreção Urinária de Sódio

A Figura e Tabela 19, a seguir, demonstram um aumento na UNa^+V nos animais DM, em relação aos CO sete dias após a indução do diabetes, voltando a se elevar de forma acentuada no final do estudo. Após a comparação destes grupos com valores basais, foi observado um aumento significativo nos animais diabéticos no último período experimental.

Animais CO e DM tratados com L-NAME tiveram sua Una^+V aumentadas, quando comparadas ao valor de CB, embora não houvesse diferença significativa entre si. (Tabela 20 e Figura 20).

Excreção Urinária de Sódio - Grupos I e II

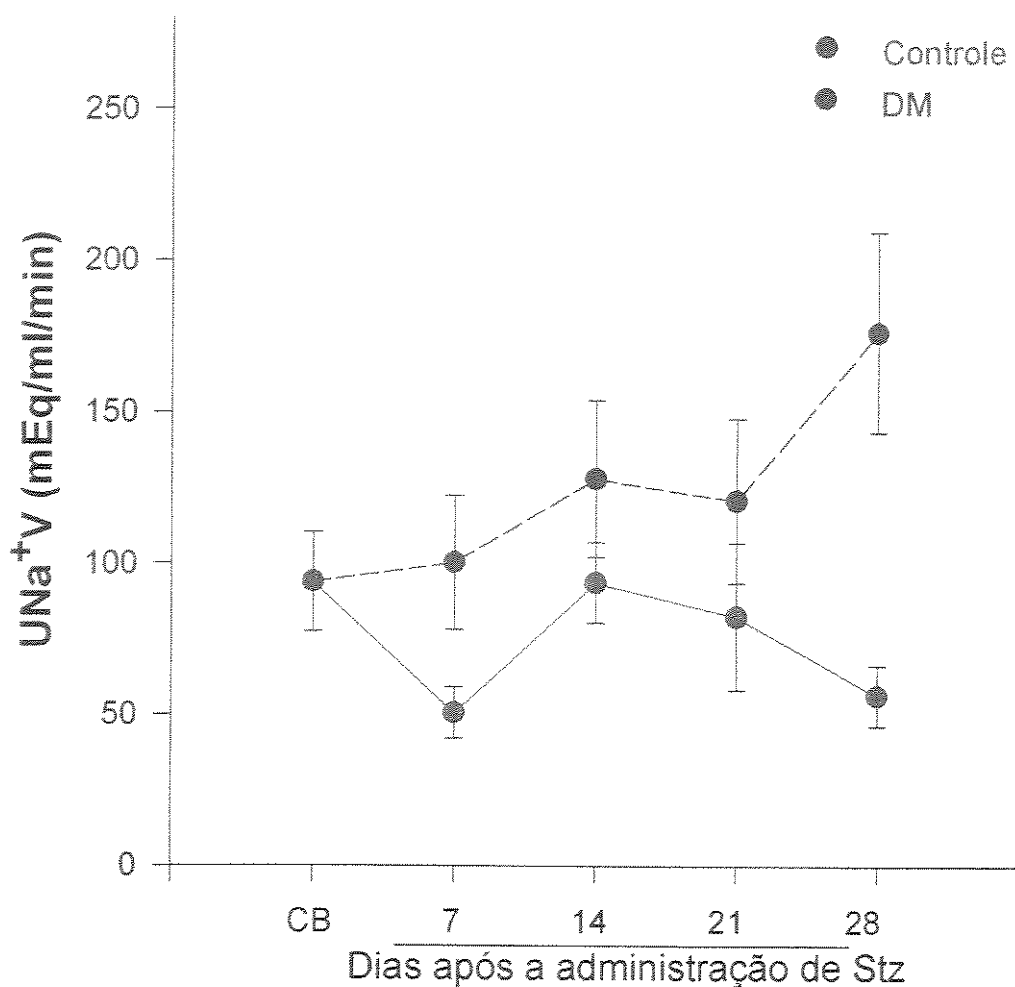


Figura 19: Valores médios de Excreção Urinária de Sódio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mEq/ml/min, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	94,0 $\pm$ 16,4	50,76 $\pm$ 8,5	93,8 $\pm$ 13,3	82,64 $\pm$ 24,3	56,4 $\pm$ 10,0
(n)	11	12	12	12	12
DM	94,0 $\pm$ 16,4	100,3 $\pm$ 22,1	128,0 $\pm$ 25,9	120,9 $\pm$ 27,2	176,5 $\pm$ 33,0*

Tabela 19: Valores médios de Excreção Urinária de Sódio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mEq/ml/min, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Excreção Urinária de Sódio - Grupos III e IV

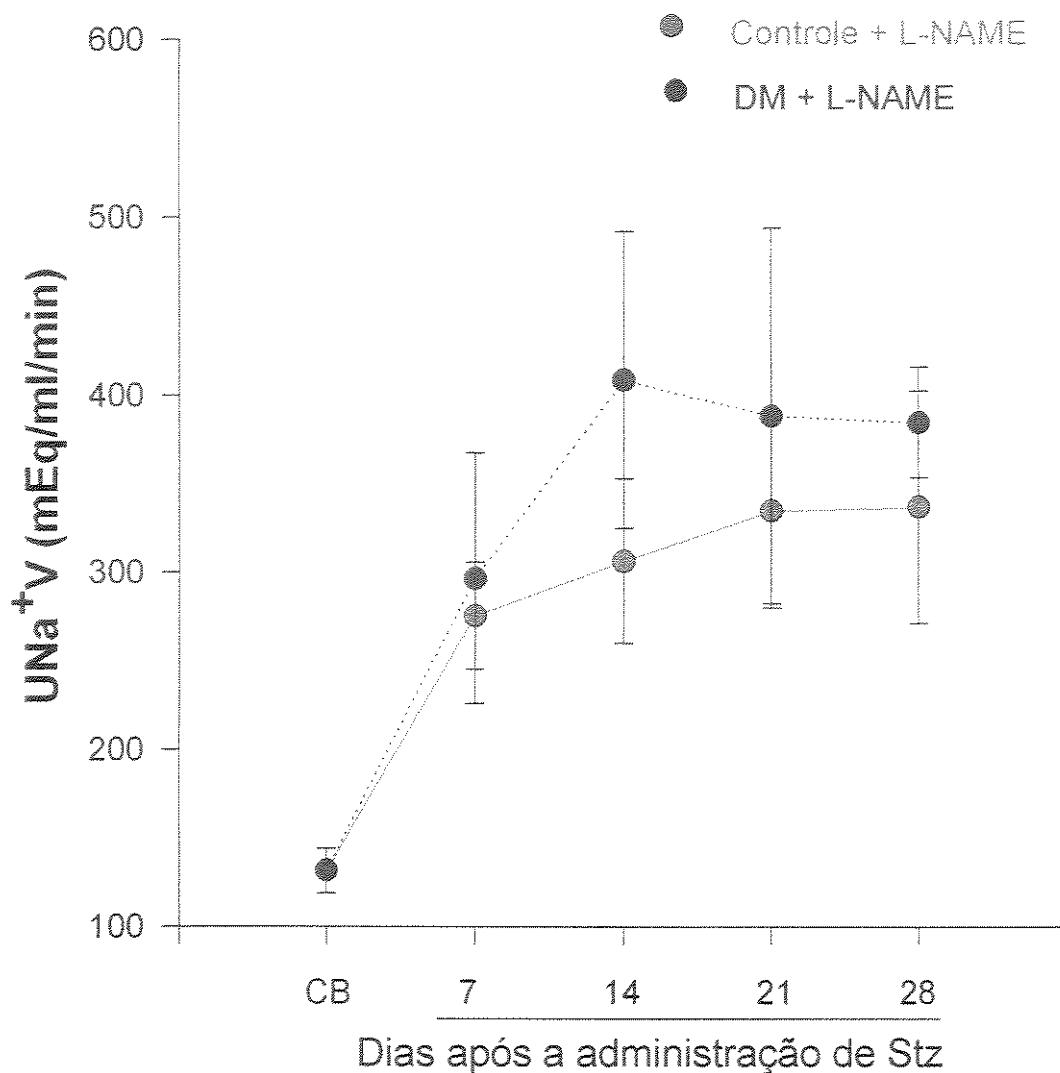


Figura 20: Valores médios de Excreção Urinária de Sódio dos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados mEq/ml/min, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+L-Name	131,6 $\pm$ 12,7	275,7 $\pm$ 30,3*	306,5 $\pm$ 46,3 *	334,9 $\pm$ 54,8*	337,0 $\pm$ 65,7*
(n)	18	8	7	7 *	6
DM+LName	131,6 $\pm$ 12,7	296,7 $\pm$ 70,6*	408,7 $\pm$ 83,4 *	388,4 $\pm$ 105,7	384,7 $\pm$ 31,2*

Tabela 20: Valores médios de Excreção Urinária de Sódio dos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mEq/ml/min, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

4.2.3 - Excreção Renal de Potássio

Avaliou-se este parâmetro através da Fração de Excreção de Potássio.

4.2.3.1 - Fração de Excreção de Potássio

Uma tendência a elevação na FEK^+ , nos ratos DM, foi verificado ao longo de todo o experimento, sendo marcante somente com vinte e oito dias de experimento, em relação aos ratos CO. Os títulos dos ratos DM apresentaram um aumento significativo do décimo quarto dia em diante. Os animais CO apresentaram um aumento discreto, somente no vigésimo primeiro dia, quando comparados ao valor de CB. (Tabela e Figura 21).

A FEK^+ , nos animais DM+L-NAME e CO +L-NAME não foram diferentes entre si, e nem mesmo em relação ao valor basal, até o vigésimo primeiro dia do protocolo. Só houve uma elevação da FEK^+ , nos animais diabéticos tratados, no final do experimento, aos vinte e oito dias, se comparados ao valor de CB. (Tabela e Figura 22)

Excreção Renal de Potássio - Grupos I e II

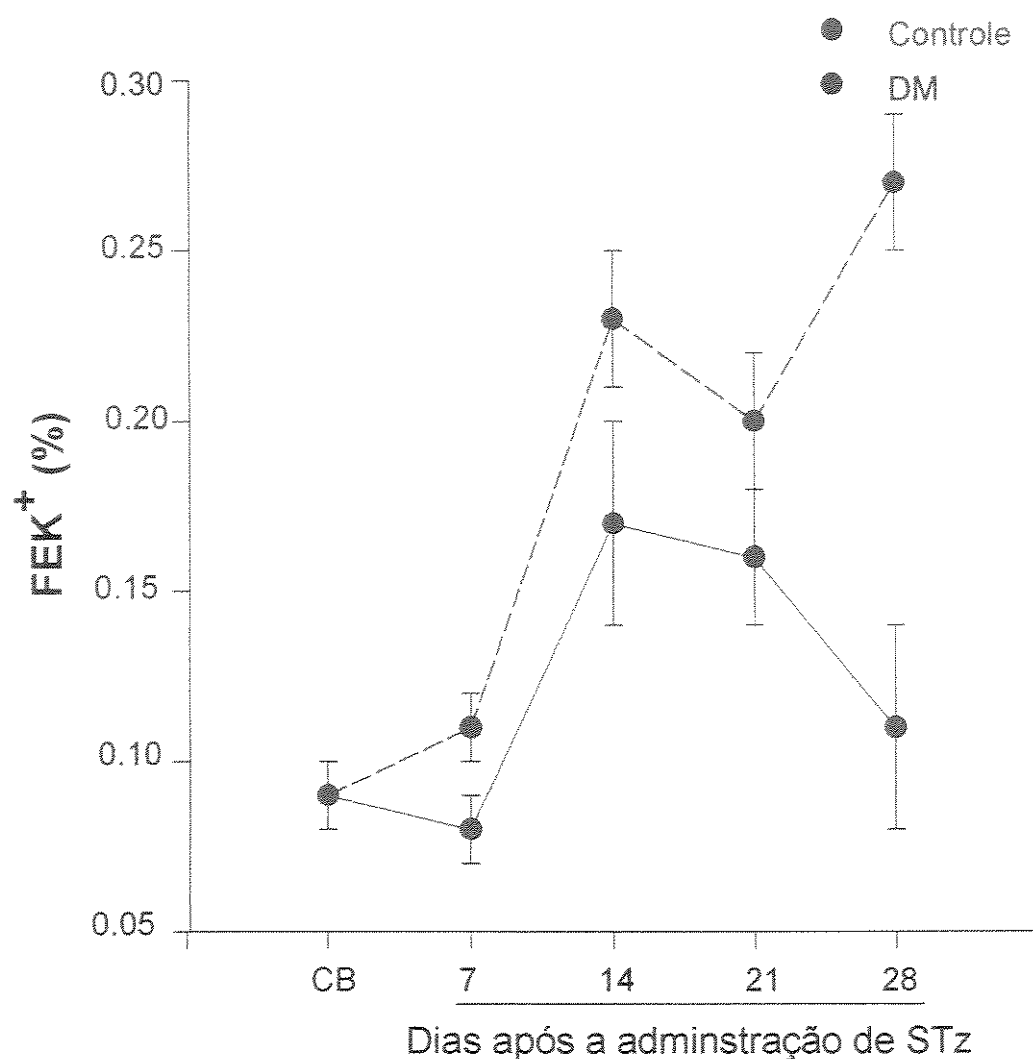


Figura 21: Valores médios de Fração de Excreção Urinária de Potássio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	11	10	10	9	8
CO	0,097 $\pm$ 0,01	0,085 $\pm$ 0,01	0,179 $\pm$ 0,03	0,166 $\pm$ 0,02*	0,118 $\pm$ 0,03
(n)	11	12	12	12	12
DM	0,097 $\pm$ 0,01	0,118 $\pm$ 0,01	0,238 $\pm$ 0,02*	0,207 $\pm$ 0,02*	0,276 $\pm$ 0,02*

Tabela 21: Valores médios de Fração de Excreção Urinária de Potássio dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

Fração de Excreção de Potássio - Grupos III e IV

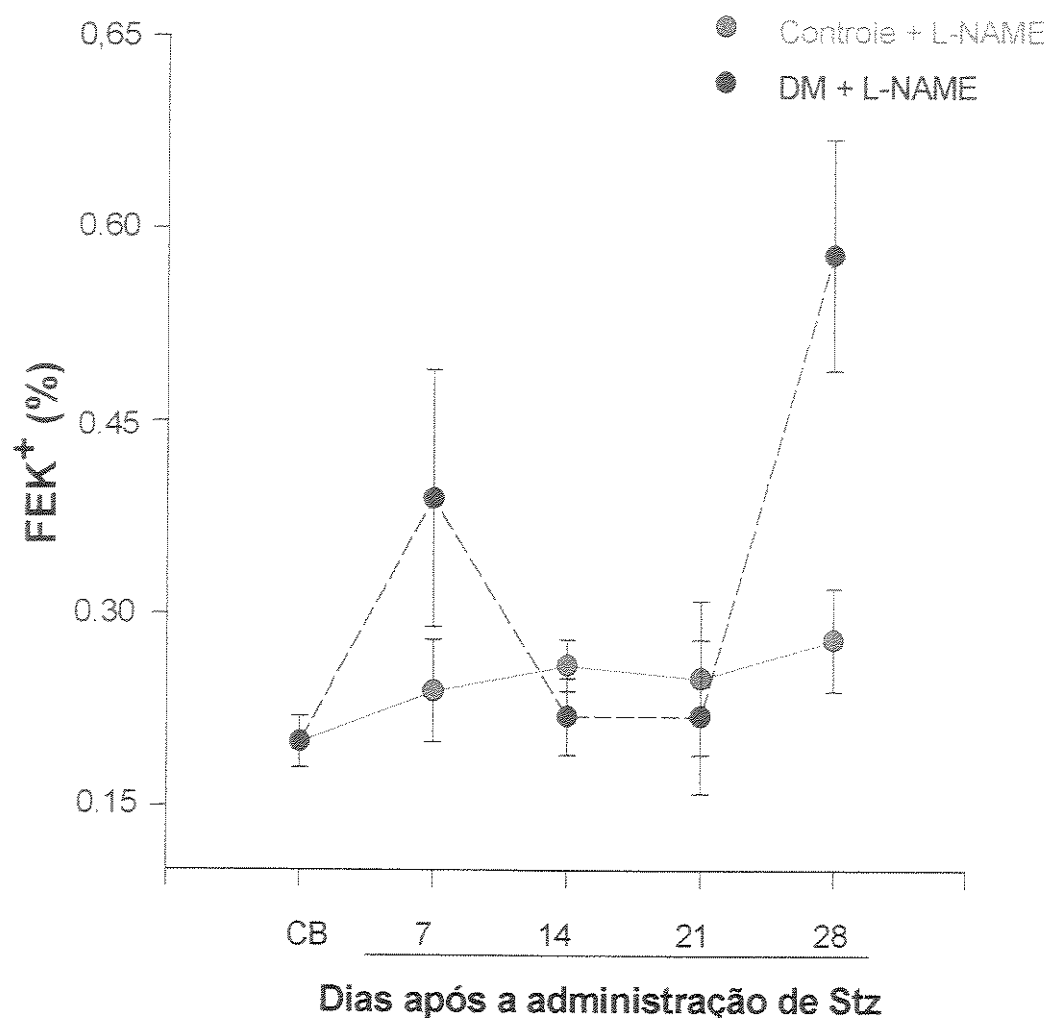


Figura 22: Valores médios de Fração de Excreção Urinária de Potássio dos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

	CB	7	14	21	28
(n)	18	10	10	9	8
CO+L-Name	0,200 $\pm$ 0,02	0,246 $\pm$ 0,04	0,260 $\pm$ 0,02	0,252 $\pm$ 0,06	0,284 $\pm$ 0,04
(n)	18	8	7	7	6
DM+Lname	0,200 $\pm$ 0,02	0,398 $\pm$ 0,01	0,222 $\pm$ 0,03	0,229 $\pm$ 0,06	0,585 $\pm$ 0,09*

Tabela 22: Valores médios de Fração de Excreção Urinária de Potássio dos animais dos Grupos III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em %, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparado ao CB.

4.4- Proteinúria e Albuminúria

Os animais diabéticos, em relação aos animais controles apresentaram aumento progressivo significativo da excreção urinária de proteínas à partir do segundo dia após a indução do diabetes por estreptozocina (Tabela e Figura 23).

A excreção renal de albumina nos animais diabéticos encontra-se expressivamente elevada à partir do décimo dia após a indução do diabetes, quando comparados aos animais controles (Tabela e Figura 24).

Proteinúria – Grupos I e II

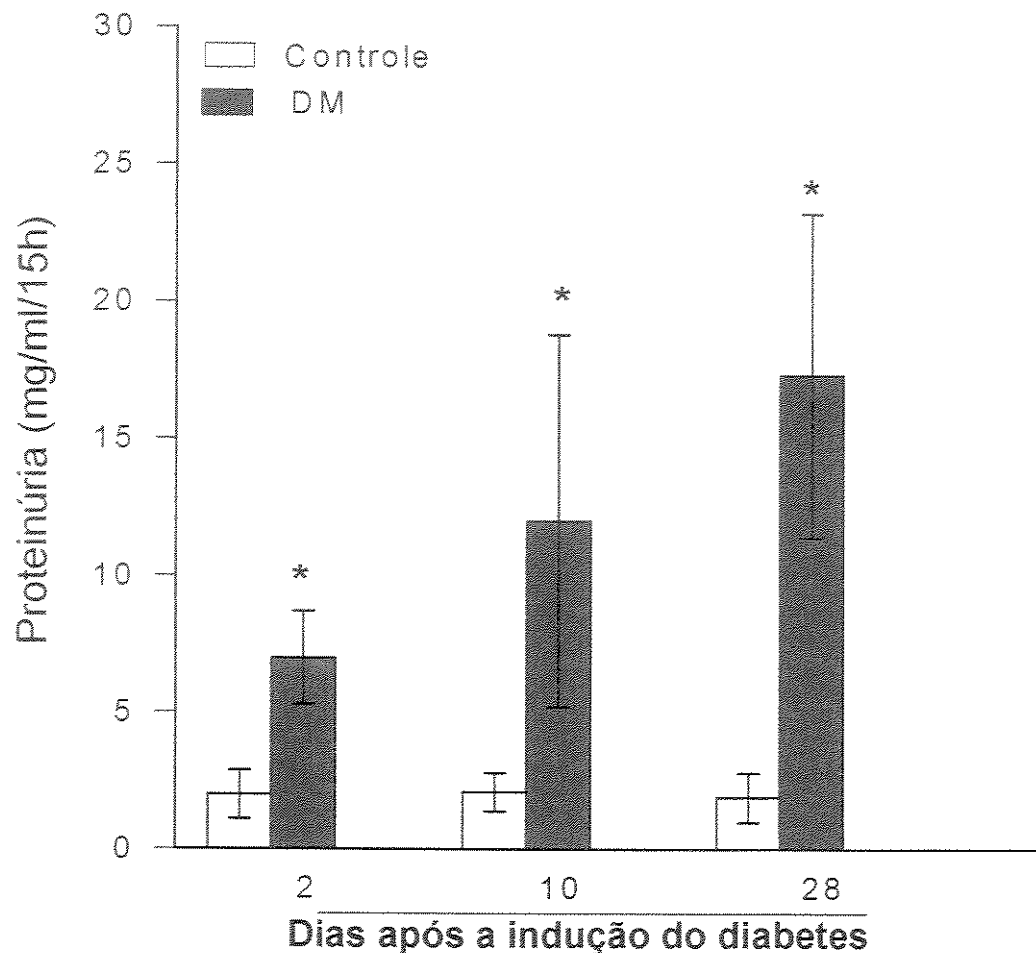


Figura 23: Valores médios de Excreção Urinária de proteínas dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias. Os resultados estão registrados em mg/ml/15h, como média $\pm$ EPM. *P<0,05 animais diabéticos quando comparados aos animais controles .

	2	10	28
(n)	18	10	10
CO	2,0 $\pm$ 0,9	2,1 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,9
(n)	18	8	7
DM	7,0 $\pm$ 1,7*	12,0 $\pm$ 6,8*	17,3 $\pm$ 5,9 *

Tabela 23: Valores médios de Excreção Urinária de proteínas dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias. Os resultados estão registrados em mg/ml/15h, como média $\pm$ EPM. *P<0,05 animais diabéticos quando comparados aos animais controles .

Albuminúria – Grupos I e II

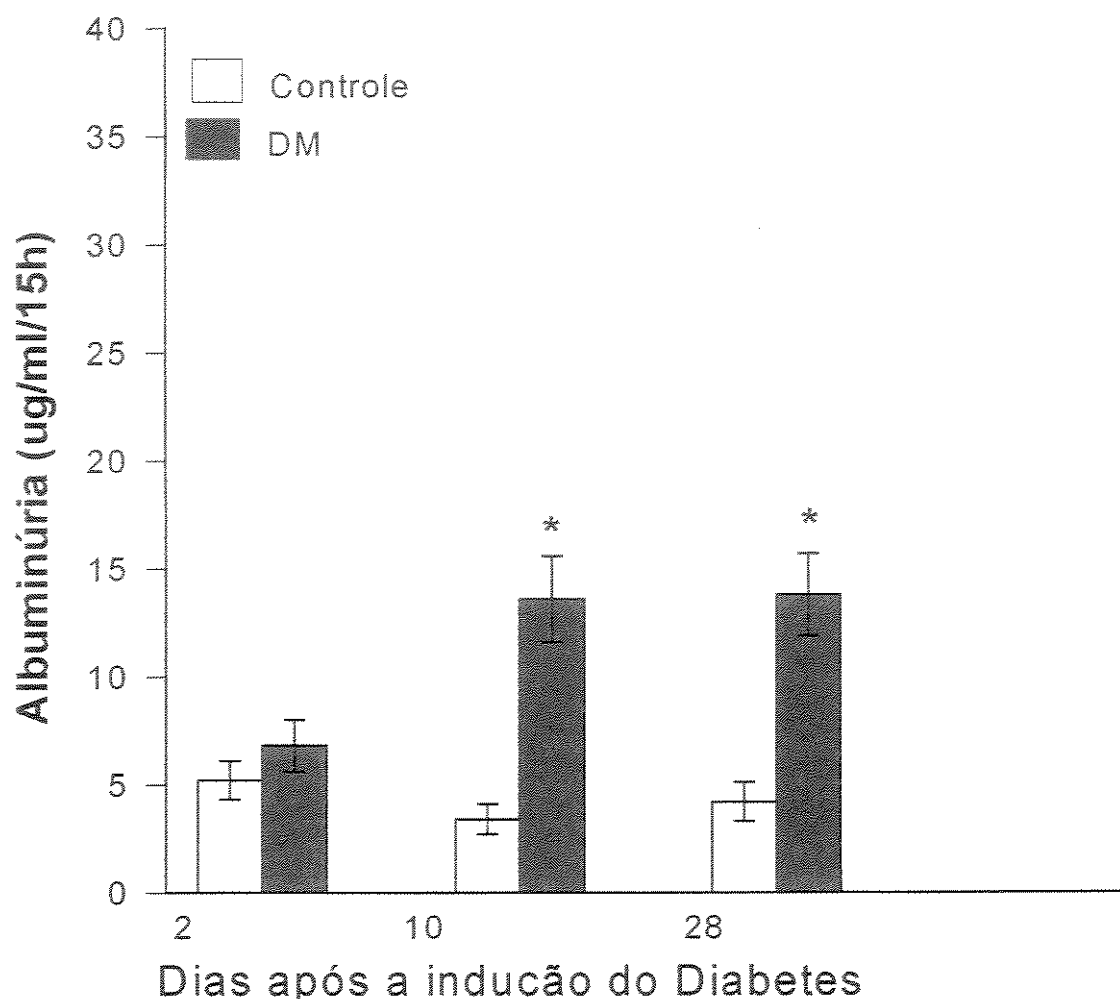


Figura 24: Valores médios de Excreção Urinária de albumina dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias. Os resultados estão registrados em mg/ml/15h, como média $\pm$ EPM. *P<0,05 animais diabéticos quando comparados aos animais controles .

	2	10	28
(n)	18	10	10
CO	5,2 $\pm$ 0,9	3,4 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,9
(n)	18	8	7
DM	6,8 $\pm$ 1,2	13,6 $\pm$ 2,0*	13,8 $\pm$ 1,9 *

Tabela 24: Valores médios de Excreção Urinária de albumina dos animais dos Grupos I e II ao longo dos 28 dias. Os resultados estão registrados em mg/ml/15h, como média $\pm$ EPM. *P<0,05 animais diabéticos quando comparados aos animais controles .

4.5 - Pressão Arterial Média

A figura e tabela 25, demonstram que não há diferença significativa entre os grupos I e II, em relação à pressão arterial média, durante todo o período experimental, com valores iguais ao valor basal. Os animais dos grupos III e IV apresentaram uma tendência a elevação da pressão arterial média ao longo do experimento, quando comparados ao valor basal, principalmente os animais CO + L-NAME, que apresentaram um aumento significativo da pressão arterial média a partir do vigésimo dia experimental. Não havendo portanto, diferença entre os grupos III e IV.

PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA –GRUPOS I, II, III ,IV

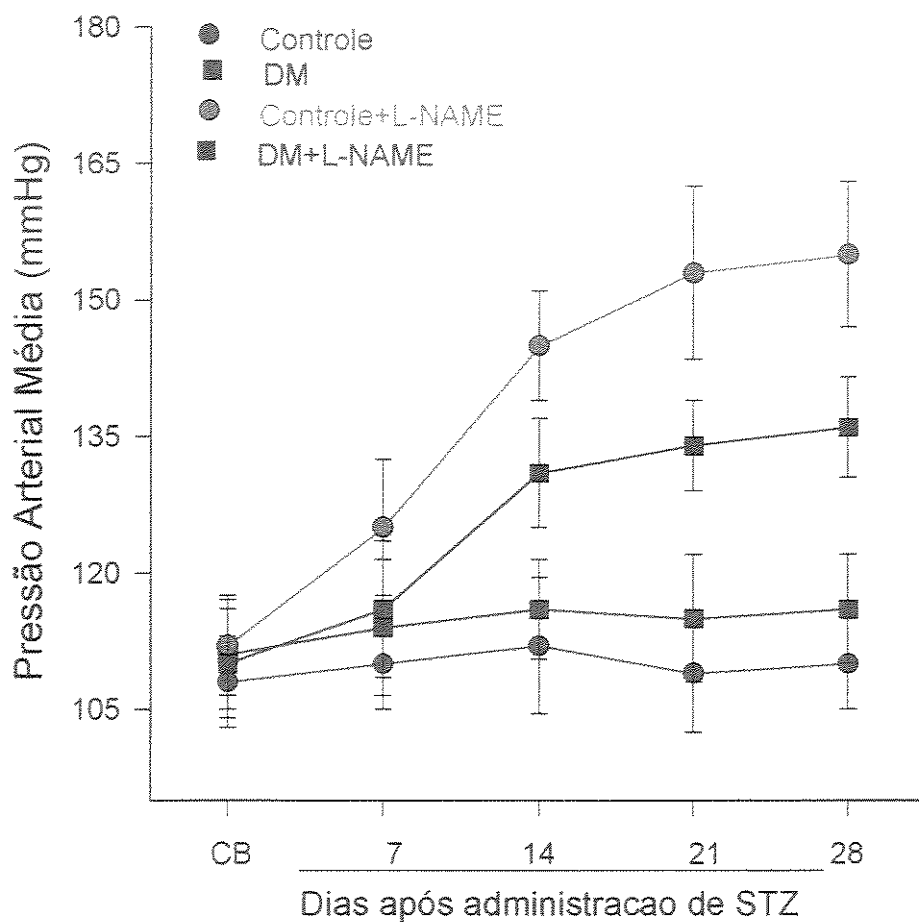


Figura 25: Pressão Arterial Média dos animais dos Grupos I, II, III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mmHg, como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ quando comparados DM com CO e CO+L-NAME com DM+L-NAME.

	<i>CB</i>	<i>7</i>	<i>14</i>	<i>21</i>	<i>28</i>
(n)	11	10	10	9	8
CO	108,0±5,0	110,0±5,0	112,0±7,5	109,0±6,5	110,0±5,0
(n)	11	12	12	12	12
DM	111,0±6,0	114,0±7,5	116,0±5,5	115,0±7,0	116,0±6,0
(n)	18	10	10	9	8
CO+L-Name	112,0±5,5	125,0±7,5	145,0±6,0	153,0±9,5	155,0±8,0
(n)	18	8	7	7	6
DM+L-Name	110,0±6,0	116,0±7,5	131,0±6,0*	134,0±5,0*	136,0±5,5*

Tabela 25: Valores médios Pressão Arterial Média dos animais dos Grupos I, II, III e IV ao longo dos 28 dias, CB valores basais. Os resultados estão registrados em mmHg, como média ±EPM.*P<0,05 quando comparados DM com CO e CO+L-NAME com DM+L-NAME.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Alterações da Função Renal e Pressão Arterial em Ratos Diabéticos (grupos I e II)

Muitos trabalhos tem demonstrado que a nefropatia diabética é marcada por uma hiperfiltração glomerular (KANEDA et al 1992), proteinúria persistente e aumento da pressão arterial. A excreção urinária de proteínas tem sido considerada como indicativo de disfunção glomerular. As causas que levam as alterações glomerulares no diabetes mellitus ainda não estão muito bem estabelecidas, entretanto foram observadas lesões como espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares e expansão do mesangio glomerular (MAUER 1984;KREISRG 1995), hipertrofia renal e hiperplasia (BAK, 2000). Outros estudos demonstram ainda um aumento na transcapilaridade de albumina precoce em ratos diabéticos logo após o estabelecimento do diabetes experimental (TUCKER et al,1991). Alterações nos capilares glomerulares podem aumentar a filtração de macromoléculas (TUCKER et al, 1993). Entretanto outros trabalhos demonstram que a expansão progressiva do mesangio , eventualmente leva a uma diminuição na superfície de filtração e reduzindo a taxa de filtração glomerular (MAUER 1984 e STEFFES 1992). Evidências tem demonstrado que a hiperglicemia aumenta atividade da proteína quinase C (PKC), esta por sua vez pode estar envolvida com aumento anormal do mesângio e alterar

o funcionamento das células glomerulares, devido a expressão elevada do mRNA TGF- β , além disso a PKC parece estar envolvida com a inibição da Na⁺/K⁺ ATPase (KOYA et al 1997). Vários trabalhos tem demonstrado que ocorre um aumento de glicosfingolipídeos (GSL) em ratos diabéticos induzidos por estreptozocina, a importância do aumento de glicoconjugados está relacionada com uma série de importantes funções celulares, como por exemplo, crescimento e proliferação celular (ZADOR et al 1993).

No presente estudo, foi estimada a taxa de filtração glomerular através do clearance de creatina endógeno, onde foi observada uma queda gradativa não significativa da filtração glomerular nos animais diabéticos, quando comparados ao valor basal durante quatro semanas de acompanhamento. A não observação de hiperfiltração renal nos nossos resultados pode estar associada ao um tempo insuficiente realizados em nossos experimentos, para o aparecimento de hiperfiltração. Resultados conflitantes a respeito têm sido publicados. Bauman (1980) observou um aumento significativo da taxa de filtração glomerular com 89-90 dias após a indução do diabetes. Back (2000) não observou hiperfiltração no período de dez dias após o estabelecimento do diabetes. Entretanto, Toker et al (1993) observaram um aumento da taxa de filtração glomerular no período de sete a dez dias. Anestesia e outros tipos de estresse podem alterar a taxa de filtração glomerular, em muitos trabalhos esse parâmetro tem sido verificado em animais anestesiados (VAAMONDE 1989, BACK 2000).

Concomitante a essa taxa de filtração glomerular estável, observamos um progressivo aumento na excreção urinária de proteínas a partir do segundo dia após a indução do diabetes e albuminúria expressiva no décimo dia em diante. De acordo com Vial, C et al.(1986), um aumento de proteinúria tubular é indicativo de queda da capacidade

de reabsorção das células dos túbulos proximais, sendo um sensível teste para a disfunção tubular em ratos. Excreção de proteínas de baixo peso molecular, enzimúria e alterações histopatológicas, são indicativos de disfunção tubular sem alterações glomerulares são encontradas em trabalhos realizados por Chouinard et al (1992).

Kaneda e colaboradores (1992), em seus resultados obtiveram elevada excreção fracional de sódio ($FENa^+$) e aumento da excreção urinária de proteína β^2 -microglobulina e albumina. Em paralelo a esses dados observaram um aumento nas mitocôndrias das células túbulo proximal; indicando que estas alterações mitocondriais estejam relacionadas com redução do transporte ativo, nas células do túbulo proximal, devido a distúrbios no metabolismo de ATP.

Nossos resultados sugerem disfunções tubulares pós proximais, pois não houve aumento na reabsorção proximal de sódio, já que o clearance de lítio e a excreção fracional proximal de sódio ($FEPNa^+$) não se encontram alterados. Entretanto podemos observar que houve aumento expressivo de excreção fracional de sódio ($FENa^+$), excreção fracional pós proximal de sódio ($FEPPNa^+$) e excreção urinária de sódio (UNa^+V) nos animais diabéticos, sugere que tínhamos observado modificações significativas na carga filtrada de sódio, definida por multiplicações entre concentrações estáveis de sódio plasmática e taxas de filtrações glomerulares estimada pelo *clearance* de creatina. Concomitante a esses resultados foi verificado uma elevada excreção urinária de potássio (FEK^+) dos ratos diabéticos, levando-nos a crer que ocorreu uma secreção aumentada de potássio no túbulo distal. Esse aumento na secreção de potássio reflete um aumento na reabsorção de sódio nos segmentos distais do néfron, pois os transportes de sódio e potássio estão intimamente relacionados nesta porção do néfron. Aumento na excreção fracional de sódio associado a

elevada secreção de potássio no túbulo distal, nos leva a sugerir que a reabsorção de sódio no ramo ascendente espesso de Henle deve estar diminuída no modelo de diabetes estreptozocina-induzido realizada neste trabalho.

Quatro mecanismos básicos poderiam estar envolvidos com a queda na reabsorção de sódio no ramo espesso da alça de Henle, com reabsorção proximal de sódio preservada, são eles: mecanismo humoral, neural, hemodinâmico e metabólico. No mecanismo humoral podem estar relacionados hormônios renais como a prostaglandina, bradicinina e renina. Embora existam expressões de diferentes tipos de produção de prostaglandinas nos diversos tecidos, órgãos e também em diferentes espécies, a PGE_2 é predominante no rim de todas as espécies. O túbulo proximal e o segmento convoluto distal sintetizam pequenas quantidades de PGE_2 , enquanto que os ramos descendente e espesso da alça de Henle, túbulos coletores medular e cortical possuem grande capacidade de síntese deste hormônio (FARMAN 1986 e 1987). A principal ação das prostaglandinas observada nos rins é provocar aumento da natriurese, sendo que o bloqueio desse hormônio por indometacina leva a uma evidente retenção renal de sódio. A ativação de fosfolipases A citoplasmáticas podem levar a um aumento na liberação de proteínas, como PGE_2 , no qual se encontram aumentados no glomérulo de ratos diabéticos (CRAVEN 1988; CRAVEN 1987; SCHANBELAN, 1985; KOYA, 1997). O aumento de proteínas pode provocar vasodilatação da arteríola aferente levando a um aumento da taxa de filtração glomerular (KOYA 1997).

Vários trabalhos tem apresentado que a atividade do cotransportador do $Na^+/K^+/2Cl^-$ responde a estímulos bioquímicos, tais como hormônios vasoativos, ou estímulos biofísicos como estresse osmótico (O'DONNELL 1989). A produção de bradicinina, à partir de

cininógenos encontrados no rim pode também estar contribuindo para uma diminuição da reabsorção tubular de sódio, trabalhos realizados por Brock (1986), indicam que a bradicinina pode modular o cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. Essas evidências nos levam a crer que a reabsorção de sódio no ramo ascendente da alça de Henle pode estar reduzida devido a ação natriurética da PGE_2 e bradicinina.

O controle neural dos rins é realizado por uma via eferente com atividade simpática e por uma aferente não colinérgica. Foram identificados duas classes de receptores sensoriais dos nervos renais aferentes, os quimiorreceptores (CRs) e os mecanorreceptores (MRs). Dentre os quimiorreceptores foram identificados os CR1 e os CR2, sendo o segundo sensível a alterações na composição de eletrólitos da pélvis renal (RECORDATI 1978 e 1980; CHIEN 1997 e 2000). Foram classificados 3 tipos de mecanorreceptores, um sensível a pressão de perfusão arterial (MRa), outro sensível a pressão venosa (MRv) e outro a pressão uretero-pélvica. A atividade desses receptores podem refletir o estado diurético e antidiurético do rim (RECORDATI 1980; CHIEN 1997 e GENOVESE 1993). Em ratos normais, a ativação do CR2 aumenta a atividade nervo renal eferente contralateral em reflexo renorenal excitatório, provocando uma antinatriurese e antidiurese no rim contralateral. Quando MRus são ativados reduz a atividade do nervo renal eferente contralateral por reflexo renorenal inibitório, levando a diurese e natriurese (FERGUSON 1988). Em trabalhos realizados por Chien et al (2000) mostram que o reflexo renorenal induzidos pela estimulação na pelvis renal de quimiorreceptores (CR-2) e mecanorreceptores ureteropelvico (MRv) estejam alterados em ratos diabéticos. Especula-se a idéia de que a atividade aferente renal esteja aumentada provocando uma ação reduzida na via eferente

renal. Não podemos também afastar com nossos estudos modificações na atividade eferente simpática renal precocemente, também potencializando o efeito natriurético observado.

Arteriolas glomerulares aferentes e eferentes, túbulos proximais, ramo ascendentes espesso da alça de Henle e aparelho justaglomerular recebem intensa inervação simpática. A excreção renal de sódio pode ser modulada pela inervação renal simpática, onde esta pode provocar mudanças hemodinâmicas e alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona. A pressão e o volume sanguíneos, a ingestão e a excreção de eletrólitos e água são também regulados pelo sistema renina-angiotensina. A liberação de renina e conseqüente formação de angiotensina II (AII) são estimulados pela baixa concentração de sódio plasmática e quando as células da mácula densa detectam alterações de Na^+ , K^+ e Cl^- , no fluido tubular disparando o mecanismo de feedback tubuloglomerular. O sistema renina-angiotensina desempenha papel sutil na regulação do fluxo sanguíneo renal como parte do feedback tubuloglomerular. Um aumento no fluxo tubular distal está associado a um aumento da filtração glomerular. Caso a filtração glomerular se encontre elevada, as concentrações de cloreto e sódio são modificadas pela angiotensina II, que promove constrição arteriolar, e redução na filtração glomerular. Trabalhos têm demonstrado que a reabsorção Na^+ em ratos diabéticos está aumentada nos túbulos proximais envolvendo a estimulação do cotransportador Na^+ /glicose (VALLON 1999). Entretanto, os nossos resultados sugerem uma queda na reabsorção tubular pós-proximal de sódio, provavelmente na alça de Henle, promovida também por mecanismos hemodinâmicos, tais como pelo aumento da pressão hidrostática nos capilares peritubulares, juntamente com vasodilação da arteríola aferente, promovida por hormônios vasodilatadores

(prostaglandinas e bradicininas), associada a uma diminuição de pressão colóide osmótica peritubular poderiam ter como consequência um aumento na excreção urinária de sódio.

O aumento da atividade eferente simpática aumenta a reabsorção tubular de sódio enquanto que uma queda nesta atividade provoca diminui a reabsorção tubular de sódio (KOPP & DiBONA,1992). A provável atividade renal simpática diminuída concomitante a uma redução do sistema renina-angiotensina, poderiam promover uma queda na reabsorção tubular de sódio, provocando natriurese.

O aumento da pressão arterial média em alguns modelos experimentais está associado a um aumento do volume extracelular e ao aparecimento de um inibidor circulante da bomba Na^+K^+ -ATPase (GREENE et al., 1987). Muitos trabalhos tem mostrado relação entre aumento do sistema renina-angiotensina em diabetes, com aumento da pressão arterial média. Katoh et al (2000) previnem o desenvolvimento da nefropatia diabética em camundongos, utilizando-se de inibidores da enzima de conversão da angiotensina, associado a uma queda na atividade enzimática da angiotensina com queda da pressão sanguínea. Contudo em nossos resultados não observamos aumento na pressão média arterial em ratos diabéticos estreptozocina induzidos. Sugerimos que atividade do sistema renina-angiotensina esteja diminuída, devido à ação de vasodilatadora de proetionóides e cininas. Andersen et al (2000) sugerem que a bradicinina pode apresentar um papel efetivo na enzima de conversão da angiotensina (ACE), bem como na pressão sanguínea e no funcionamento renal, pois inibidores da ACE reduz a formação de angiotensina II e induz ao acúmulo de bradicinina no rim.

Acredita-se que esta disfunção tubular no diabetes acima citada esteja relacionada também com modificações metabólicas tubulares, onde uma menor síntese, via gliconeogênese, ou um decréscimo de reabsorção ou aproveitamento tubular de glicose provocaria uma menor síntese de substratos energéticos requisitados para os transportes tubulares. Como o segmento ascendente espesso de Henle é dependente quase que exclusivamente de glicose para obtenção de energia, sendo que 80-90% da ATP produzido é utilizado para o transporte tubular de Na^+ sugere-se que o transporte ativo nesta porção do néfron poderia encontrar-se reduzido devido a uma menor atividade mitocondrial nos animais diabéticos-induzidos (KURAKAWA, 1986).

5.2 - Alterações da Função Renal e Pressão Arterial em Ratos Normais e Diabéticos tratados com inibidores da síntese de óxido nítrico (L-NAME) - Grupos III e IV

O óxido nítrico é considerado um vasodilatador importante para a regulação do tônus vascular e hemodinâmica renal. Inibidores de óxido nítrico sintetase, tais como L-NAME, agem por inibição competitiva e causa vasoconstrição (MONCADA, 1993).

Nos rins o óxido nítrico participa da regulação da hemodinâmica glomerular e medular, isto é, responde a via feedback tubuloglomerular, liberação de renina e controle do volume extracelular (RAIJ et al 1995; NAVAR te al. 1996; KONE & BALIS 1997). Estudos realizados por Kashiwagi e colaboradores (2000) demonstram que a inibição crônica da síntese de óxido nítrico com L-NAME causam glomeruloesclerose e fibrose intersticial e hipertensão arterial sistêmica. Estas alterações eram caracterizadas pelo aumento da na produção de TGF- β 1. Tem sido especulado que a administração de

inibidores específicos do sistema renina-angiotensina diminui os danos histológicos renais e reduza a expressão no rim do TGF- β 1 (KASHIWAGI et al 2000).

Por outro lado, estudos realizados com ratos, recebendo infusão intravenosa de N^G -monomethyl-L-arginina promove vasoconstrição em arteríolas glomerulares, afetando principalmente arteríola aferente, levando a um aumento na pressão capilar glomerular e conseqüente aumento na pressão de ultrafiltração (PUF) (ZATZ et al 1991). Este aumento na (PUF) está relacionado fisiologicamente com a esclerose glomerular.

Nossos resultados confirmam a literatura, mostrando que a inibição do óxido nítrico sintetase causam um aumento da pressão média arterial em animais diabéticos e controles tratados, associado a uma natriurese pós proximal, pois a excreção urinária de Na^+ (UNa^+V), $FENa^+$, $FEPPNa^+$ encontram-se aumentada nos animais tratados (diabéticos e controles) (Xavier F et al, 2000). Doses diferentes de L-NAME foram utilizadas para determinar a natriurese em trabalhos realizados por Lahera e colaboradores (1991). Ratos que receberam $1mg\ kg^{-1}\ min^{-1}$, mostraram um significativo efeito anti-natriurético sem alterações na pressão média arterial, fluxo plasmático renal e taxa de filtração glomerular. Entretanto, doses superiores a $30\ mg/d$ provocam um aumento significativo da pressão arterial, associado a uma queda progressiva do fluxo plasmático renal e filtração glomerular sem alterações na excreção renal de sódio.

Trabalhos realizados por Xavier et al (2000) indicam uma possível participação da atividade neural do rim para explicar o aumento da pressão arterial e excreção urinária de sódio em ratos denervados tratados com inibidores da óxido nítrico sintetase. Estes resultados mostram um aumento na excreção urinária de sódio, devido a uma queda na reabsorção de sódio pós-proximal, associada a uma redução na taxa de filtração diminuída.

Estes resultados corroboram com os resultados por nós observados após a inibição da óxido nítrico sintetase em animais diabéticos e normais.

A taxa de filtração glomerular não apresenta diferenças significativas nos nossos trabalhos, porém o clearance de creatinina tende a cair tanto nos animais DM+L-NAME quanto CO+L-NAME. A inibição aguda da óxido nítrico sintetase com uma dose baixa de L-NAME diminui a taxa de filtração glomerular e fluxo plasmático renal em animais diabéticos (VEELKEN et al 2000).

Nossos resultados observados após a inibição NO sintetase, com L-NAME na dose de 60mg/ kg/d, não foi capaz de modificar significativamente os achados observados em relação ao manuseio tubular de sódio em ratos diabéticos. Entretanto, adicionalmente potencializaram o efeito natriurético já observado, bem como deixaram mais evidente uma pronunciada redução na filtração glomerular na quarta semana após a indução do diabetes experimental.

Esta maior resposta natriurética observada no presente trabalho pode estar relacionada tanto com a inibição na reabsorção tubular de sódio reduzida pelo aumento de NO, bem como por um adicional aumento da pressão peritubular renal induzida pela inibição de NOS.

6 - CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso trabalho sugere:

- 1- Animais diabéticos, STZ- induzidos apresentam um aumento da natriurese por comprometimento dos segmentos pós-proximais do néfron, sem alterações significativas nas taxas de filtração do glomérulo e na pressão arterial média arterial.
- 2- A inibição da NOS causa um aumento da pressão arterial, e natriurese pós-proximal, sem alterações nas taxas de filtração glomerular até a 4ª semana de acompanhamento, em animais controles e diabéticos induzidos por estreptozocina.
- 3- A inibição de NOS pelo L-NAME (60mg/kg/d) não modificou significativamente a filtração glomerular e o manuseio tubular de sódio, em ratos diabéticos, vígis e não tratados com insulina durante quatro semanas de acompanhamento.

7- Referências Bibliográficas

Andersen S, Tarnow L, Rossing P, Hansen BV, Parving HH. Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 57(2): 601-609, 2000.

Anderson S, Jung FF and Ingelfinger JR. Renal renin-angiotensinsystem in diabetes: funcional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol* 265: F477-F486, 1993.

Anderson S, Meyer TW, Rennke HG and Brenner BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 76: 612-619, 1985.

Anderson S, Rennke HG, Garcia DL and Brenner BM. Short and long term effect of antihypertensive therapy in the diabetic rat. *Kidney In* 36: 526-536, 1989.

Appiani AC, Assael BM, Tirrelli AS, Cavanna G and Marra G. Sodium excretion and hyperfiltration during glucose infusion in man. *Am J Nephrol* 10: 103-108, 1990.

Ayo SH, Radnik RA, Glass WF, Garoni J, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JJ. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high glucose medium. *Am J Physiol* 260: F185-F191, 1991.

Ayo SH, Radnik RA, Glass WF, Kreisberg JJ: High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 136: 1339-1348, 1990.

Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev* 15 (4): 516-542, 1994.

Bak M, Thomsen K, Christiansen T and Flyvbjerg A. Renal enlargement precedes renal hyperfiltration in early experimental diabetes in rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 1287-1292, 2000.

Bank N, Aynedjian HS. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int* 43:1306-1312, 1993.

Bauman JW Jr. Proteinuria in long term streptozotocin diabetes in rats. *Life Sciences* 27: 2121-2124, 1980.

Bautifc H. Inositol lipid sinalling of compensatory renal growth. *Nephron* 55: 173-241, 1990.

Bayles C, Mitruka B and Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90: 278-281, 1992.

Baylis C and Qui C. Importance of nitric oxide in the control of renal hemodynamics. *Kidney Int* 49: 1727-1731, 1996.

Beck-Nielsen H, Henriksen JE, Vaag A, Hother-Nielsen. Pathophysiology of non – insulin – dependent diabets mellitus(NIDDM). *Diabets Research and Clinical Practice* 28 : S13 – S25 , 1995.

Boer WH, Koomans HA, Dorhout Mees EJ. Renal lithium handling during water loading and subsequent *d*-DAVP-induced anti-diuresis. *Eur J Clin Invest* 18: 273-278, 1988.

Breyer JA. Diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *Am J Kidney Dis* 20: 533-547, 1992.

Brocher-Mortensen J. Glomerular filtration and extracellular fluid volume during normoglycemia and moderate hyperglycemia in diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 32:311-316, 1973.

Brock TA, Buignara C, Canessa M, Gimbrone MA Jr. Bradykinin and vasopressin stimulate $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}$ cotransport in cultured endothelial cells *Am J Physiol* 250: C888-C895, 1986.

Chien C-T, Chien H-F, Cheng Y-J, Chen C-F and Hsu S-M. Renal afferent signaling diuretic response is impaired in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 57:203-214, 2000.

Christiansen JS, Gammelgaard J, Orskov H, Anderson AR, Telmer Sand Parving HH. Kidney function and size in normal subjects before and during-growth hormone administration for one week. *Eur J Clin Invest* 11: 487-490, 1981.

Craven PA, Caines FR, Derubertis FR, Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Met Clin Exp*. 36:95-103, 1987.

Craven, PA Patterson MC, Derubertis FR. Role of enhanced arachidonate availability through phospholipase A₂ pathway in mediation of increased prostaglandin synthesis by glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 37:429-435, 1988.

Dahl-Jorgensen K, Brinchmann-Hansen O, Hanssen KF, Ganes T, Kierulf P, Smeland E, Sandvik L, Aagenaes O. Effect of near normoglycaemia for two years on progression of early diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy: the Oslo study. *Br Med J (Clin Res Ed)* 293(6556): 1195-1199, 1986.

Deng A, Baylis C: Locally produced EDRF control preglomerular resistance and ultrafiltration coefficient. *Am J Physiol* 264:F212-F215, 1993.

Dunham PB, Senyk O. Lithium flux through the Na/K pump in human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3099-3103, 1977.

Erlich Y, Rosenthal T. Contribution of nitric oxide to the beneficial effects of enalapril in the fructose-induced hyperinsulinemic rat. *Hypertension* 28(5):754-757, 1996.

Farman N, Pradelles P, Bonvalet JP. PGE₂, PGF₂, α -keto-PGF₁ and TxB₂ synthesis along rabbit nephron by enzyme immunoassay. *Am J physiol* 251: F238-F244, 1987.

Farman N, Pradelles P, Bonvalet JP. Determination of prostaglandin E2 in the rabbit nephron by enzyme immunoassay. *Am J Physiol* 251: F238-F244, 1986.

Ferguson M, Bell C. Ultrastructural localization and characterization of sensory nerves in the rat kidney *J Comp Neurol* 274: 9-16 1988.

Frömter E. Magnitude and significance of paracellular shunt path in kidney proximal tubule, in *Intestinal permeation*, edited by Kramer M, Lauterbach F, Oxford, *Excerpta Medica*, 1977.

Fujihara CK, De Nucci G and Zatz R. Chronic nitric oxide inhibition aggravates glomerular injury in rats with subtotal nephrectomy. *J Am Soc Nephrol*, 1995 In Press.

Fujihara CK, De Nucci G and Zatz R. Sodium excess aggravates hypertension and parenchymal injury in rats with chronic nitric oxide inhibition. *Am J Physiol* 266: F697-F705, 1994.

Fujihara CK, Padilha RM and Zatz R. Glomerular abnormalities in long-term experimental diabetes: Role of hemodynamic and nonhemodynamic factors and effects of antihypertensive therapy. *Diabetes* 41:286-293, 1992.

Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.

Genovesi S, Pieruzzi F, Wijnmaalen P, Centonza L, Golin R, Zanchetti A, Stella A. Renal afferents signaling diuretic activity in the cat. *Cir Res* 73:906-913, 1993.

Garcia WE, Gontijo JAR, Figueiredo JF. Avaliação do clearance de lítio como marcador da manipulação tubular proximal de sódio em ratos acordados em gaiolas metabólicas individuais. *J Bras Nephrol* 13: 1-10, 1991.

Greene DA, Latimer AS and Sima AAA. Sorbitol, phospho-inositide and sodium potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Eng Med J* 316: 599-609, 1987.

Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 65: 760-797, 1985.

Greger R. Possible sites of lithium transport in the nephron. *Kidney Int* 37:(28): 26-30, 1990.

Hansen BC, Ortmeier HK, Bodkin NL. Prevention of obesity in middle-aged monkeys: food intake during body weight clamp. *Obes Res* 2: 199s-204s, 1995.

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Benneh PA. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in US population age 20-74 yr. *Diabetes* 36(4) 523-534, 1987.

Harvey JN, Edmundson AW, Jaffa AA, Martin LL and Mayfield RK. Renal excretion of kallikrein and eicosanoids in patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Relationship to glomerular and tubular function. *Diabetologia* 35: 857-862, 1992.

Hosteter TH, Troy JL and Brenner BM. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 19:410-415, 1981.

Hout SJ, Pamnani MB, Clough DL and Haddy FJ. The role of sodium intake, the Na⁺, K⁺ pump and ouabain-like humoral agents of reduced renal mass hypertension. *Am J Nephrol* 3: 92-99, 1983.

Kaneda K, Iwao J, Sakata N and Takebayashi S. Correlation between mitochondrial enlargement in renal proximal tubules and microalbuminuria in rats with early. *Acta Pathologica Japonica* 42(12): 855-860, 1992.

Karlsen AE, Henrik U, Andersen HU, Vissing H, Larsen PM, Fey SJ, Cuartero BG, Madsen OD, Petersen JS, Mortensen SB, Mandrup-Poulsen T, Boel E and Nerup J. Cloning and expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase cDNA from rat islets of langerhans. *Diabetes* 44: 753-758, 1995.

Kashiwagi M, Shinozaki M, Hirakata H, Tamaki K, Hirano T, Tokumoto M, Goto H, Okuda S and Fujishima M. Locally activated renin-angiotensin system associated with TGF- β 1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Am Soc Nephrol* 11:616-624, 2000.

Katoh M, Ohmachi Y, Kurosawa Y, Yoneda H, Tanaka N, Narita H. Effects of imidapril and captopril on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Eur J Pharmacol* 398(3):381-387, 2000.

Kimura K, Tojo A, Matsuoka H and Sugimoto T. Morphometric analysis of renal arterioles in subtotal nephrectomized rats. *J Lab Clin Med* 122: 273-283, 1993.

Kinne R, Koenig B, Hannafin J, Kinne-Saffran E, Scott DM, Zierold K. The use of membrane vesicles to study the NaCl/KCL cotransporter involved in active transepithelial chloride transport. *Pflügers Arch* 405: S101-S105, 1985.

Kinsella JL and Aronson PS. Properties of the Na^+/H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol* 238: F461-469, 1980.

Kinsella JL, Aronson PS. Interaction of NH_4^+ and Li^+ with the renal microvillus membrane $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger. *Am J Physiol* 241: C220-C226, 1981.

Kirchner KA. Effect of antidiuretic hormone on lithium as a marker for proximal tubule delivery. *Am J Physiol* 257:F899-F906, 1989.

Kirchner KA. Effect of diuretic and antidiuretic agents on lithium clearance as a marker for proximal delivery. *Kidney Int* 37(28) S-22 - S-25, 1990.

Kone BC, Bayles C. biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 272: F561-F578, 1997.

Koop UC and DiBonna GF. The neural control of renal function. In: the kidney – physiology and pathophysiology. DW Seldin and G Giebich (eds), NY, raven pages 1157-1204 1992

Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Kubota K and King GL. Characterization of protein kinase C β -isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- β , extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 100(1):115-126 1997.

Kreisberg JJ, Kreisberg SH. High glucose activates protein kinase C and stimulates fibronectin gene expression by enhancing a cAMP response element. *Kidney International* 48: (51) S-3-S-11, 1995.

Kurokawa, K (editor). Biochemical modulation of renal function. *Kidney International* 29 (1): 1-89, 1986.

Labord K, Bussières L, Dechaux M and Sachs C. Decrease in renal Na-K-ATPase activity in BB diabetic rats. *Kidney Int.* 33: 420-420, 1988.

Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S and Romero JC, Effects of NG-Nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* 261: F1033-F1037, 1991.

Lovenberg W, Techniques for the Measurement of Blood Pressure. *Hypertension* 9: I5-I6, 1987.

Majid DAS, Willims A, Kadowitz PJ, Navar LG. Renal responses to intra-arterial administration of nitric oxide donor in dogs. *Hypertension* 22(4):535-541, 1993.

Mattson DL, Roman RJ, Cowley AW Jr. Role os nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension*, 19: 766-769, 1992.

Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, et al Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 74: 1143-1155, 1984.

Mogensen CE & Christensen CK. Blood pressure changes and renal function in incipient and overt diabetic nephropathy. *Hypertension* 7(II): II64-II73, 1985.

Moncada S, Martin JF. Evolution of nitric oxide. *Lancet* 341(8859) 1511, 1993.

Mongensen CE & Anderson NJK. Increased kidney size and GFR in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin treatment. *Diabetologia* 11:221-224, 1975.

Navar LG, Inscho EW, Majid AS, Imig JD, Harrison BI, Mitchell KD Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Ver* 76: 425-536, 1996.

Ng LL, Simmons D and Frighi V. Leucocytes Na^+/H^+ antipport activity in type I diabetic patients with nephropaty. *Diabetologia* 33: 371-377, 1990.

O'Donnell ME, [^3H] Bumetamide binding in vascular endothelial cell. Quantitation of Na-K-CL cotransporters. *J Biol Chem* 264: 20326-20330 1989.

Ohishi K, Carmines PK, Inscho EW, Navar LG. EDRF- angiotensin II interactions in rat juxtaglomerular afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol.* 263:900-906, 1992.

Ortola FV, Ballermann BJ, Anderson S, Mendez RE and Brenner BM. Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. Potential mediator of hyperfiltration. *J Clin Invest* 80: 670-674, 1987.

Palmer LG, Frindt G. Conductance and gating of epithelial Na channels form rat cortical collecting tubule. *J Gen Physiol* 92: 121-138, 1988.

Parving H-H, Noer I, Kehlet H, Mongensen CE, Svendsen PA and Heding L. The effect of short-long glucagon infusion on kidney function in normal man. *Diabetologia* 13: 323-325, 1977.

Pfeischifter J. Does nitric oxid, na inflammatory mediator of glomerular mensagial cell,have a role in diabetic nephropathy? *Kidney* 48(51):S50-S60, 1995.

Pollock DM, Opgenorth TJ. Comparison of the hemodynamic effects of endothelin-1 and big endothelin-1 in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 179(2):1122-1126, 1991.

Raij L, Baylis C. Nitric oxide and the glomerulus (Editorial review) *Kidney Int* 48: 20-32,1995.

Recordati GM, Moss NG, Genovesis S, Rogens PR. Renal receptors in the rat sensitive to chemical alterations of their environment *Circ Res* 46: 395-405, 1980.

Recordati GM, Moss NG, Waselkov L. Renal chemoreceptorsin the rat. *Circ Res* 43:534-543, 1978.

Ribeiro MO, Antunes E, De-Nucci G, Lovisolo SM and Zatz R. Chronic inhibition of oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20: 298-303, 1992.

Romero JC, Lahera V, Salom MG, Biondi ML, role of endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2: 1371-1387, 1992.

Schambelan M, Blake S, Sraer M, Bens M, Nibez M-P and Wahbe F. Increase prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 75: 404-412, 1985.

Steffes MW, Bilous RW, Southerland DER and Mauer M. Cell and matrix components of the glomerular mesangium in type 1 diabetes. *Diabetes* 41:679-684, 1992.

Sylvie Chouinard, BSc, Claude Viau, ScD and Erminio Greselin, DVM. Enzymuria and tubular proteinuria in diabetic rats: A 12-Week follow-up study. *Renal Failure* 14: 41-47, 1992.

Thomsen K and Shirley DG. The validity of sodium and water delivery from the proximal tubules. *Nephron* 77: 125-138, 1997.

Thomsen K, Leyssac PP. Acute effects of various diuretics on lithium clearance. *Renal Physiol* 9: 1-8, 1986.

Thomsen K, Schou M, Steiness I, Hansen HE. Lithium as an indicator of proximal sodium reabsorption. *Pflügers Arch* 308: 180-184, 1969.

Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG and Blantz RC. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney Int* 39: 1176-1183, 1991.

Tucker BJ, Rasch R and Blantz RC. Glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in preproteinuric and proteinuric diabetic rats. *J Clin Invest.* 92: 686-694, 1993.

Vaamonde CA, Bier RT, Papendick R, Alpert H, Gouvea W, Owens B, Predo V: Acute and chronic renal effects of radiocontrast in diabetic rats: role anesthesia and risk factors. *Invest Radiol* 24: 206-218, 1989.

Vallon V, Kerstin R, 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.

Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Böhmer KP and Sterzel B. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 11: 71-79, 2000

Viau C, Bernard A and Lauwerys R. Determinação of rat β 2-microglobulin in urine and in serum. II. Application of its urinary measurement to selected models. *J Appl. Toxicol* 6: 191-195, 1986b.

Weil R III, Nozawa M, Koss M, et al. The kidney in streptozotocin diabetic rats. *Arch Pathol Lab Med* 100: 37-49, 1976.

Xavier F, Magalhães AMF, Gontijo JAR. Effects of inhibition of nitric oxide synthase on blood pressure and renal sodium handling in renal denervated rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 347-354, 2000.

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

Zataz R and De-Nucci G. Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am J Physiol* 261:F360-F363, 1991.

Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG and Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77: 1925-1930, 1986.

Zatz R, Meyer TW, Rennke HG and Brenner BM. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factor in pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5963-5967, 1985.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE