

FLÁVIO TELES DE FARIAS FILHO

**Regressão da nefropatia diabética experimental :
ausência de efeito dose-resposta de um antagonista da
angiotensina II**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de doutor em Medicina

Área de concentração: Nefrologia
Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

São Paulo
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	22
3	MÉTODOS.....	23
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5	RESULTADOS.....	31
6	DISCUSSÃO.....	34
7	CONCLUSÕES.....	44
8	ANEXOS.....	45
9	REFERÊNCIAS.....	65

RESUMO

Farias Filho FT. *Regressão da nefropatia diabética experimental : ausência de efeito dose-resposta de um antagonista da angiotensina II* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 73p.

Nos últimos anos, evidências experimentais e clínicas tem sugerido a possibilidade de regressão de glomerulosclerose, em diversas formas de nefropatia progressiva, inclusive a diabética. No entanto, ainda não se sabe se lesões mais avançadas como glomerulosclerose acompanhada de sinéquias, podem ser revertidas com tratamento medicamentoso, ou se essa possibilidade só existe para lesões menos graves como expansão mesangial. Por outro lado, tem sido sugerido, recentemente, em diversas formas de nefropatia progressiva, que o efeito protetor dos bloqueadores do receptor AT-1 (BAT-1) é dose-dependente. Para avaliar a dose-dependência de um BAT-1 e a possibilidade de regressão de lesões glomerulares na nefropatia diabética (ND), ratos tornados diabéticos por estreptozotocina foram tratados com uma dose convencional e uma extremamente elevada de losartan (L). O tratamento com L reduziu a albuminúria e protegeu contra a glomerulosclerose e inflamação renal de forma semelhante com ambas as doses. Houve nítida regressão da expansão mesangial com o tratamento com L. Contudo, não foi observada regressão de glomerulosclerose. Os achados sugerem ausência de efeito protetor adicional com o uso de altas doses de L nesse modelo de ND. Os dados sugerem, ainda, que a regressão de lesões menos avançadas, como expansão de matriz mesangial, pode ser alcançada com o uso dos BAT-1 na ND.

Descritores: 1. Losartan/uso terapêutico; 2. Diabetes Mellitus; 3. Nefropatias diabéticas; 4. Ratos

SUMMARY

Farias Filho FT. *Regression of diabetic nephropathy : no dose-response effect of an angiotensin II antagonist* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 73p.

Evidence of regression of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy (DN) and other modalities of chronic kidney diseases has been provided in recent years. However, it remains unclear whether advanced lesions such as glomerular sinechiae can be reversed with pharmacological therapy, or whether this possibility exists only for relatively moderate damage such as mesangial expansion. Recently, the protective renal effect of AT-1 receptor blockers (ARBs) was shown to be dose-dependent in chronic nephropathies. To verify whether an ARB possess a dose-dependent renal effect and whether glomerular lesions can regress in DN, rats were made diabetic by streptozotocin and treated with a standard and an extremely high dose of losartan (L). L treatment reduced albuminuria and protected against glomerulosclerosis and glomerular inflammation, without an additional effect with high doses. There was regression of mesangial expansion with L. However, there was no regression in the frequency of glomerulosclerosis with sinechiae. These findings suggest no dose-dependent effect of L in this model of DN and that mesangial matrix removal is a feasible aim with ARBs in DN.

Descriptors: 1. Losartan/therapeutic use; 2. Diabetes Mellitus; 3. Diabetic nephropathies; 4. Rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Evolução do peso corpóreo.....	39
Figura 2	Evolução da glicemia.....	40
Figura 3	Evolução da pressão caudal.....	41
Figura 4	Evolução da albuminúria.....	42
Figura 5	Índice de expansão mesangial.....	43
Figura 6	Porcentagem de esclerose glomerular.....	44
Figura 7	Índice de esclerose glomerular.....	45
Figura 8	Infiltração de macrófagos.....	46
Figura 9	Expressão glomerular de vimentina	47
Figura 10	Correlação entre vimentina e albuminúria.....	48
Figura 11	Microfotografias (expansão mesangial).....	49
Figura 12	Microfotografias (esclerose glomerular).....	50
Figura 13	Microfotografias (macrófagos).....	51
Figura 14	Microfotografias (vimentina).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Evolução do peso corpóreo.....	53
Tabela 2	Glicemia ao longo do estudo	54
Tabela 3	Pressão caudal.....	55
Tabela 4	Evolução da albuminúria.....	56
Tabela 5	Expansão mesangial, glomerulosclerose, interstício, macrófagos e vimentina.....	57
Tabela 6	Creatinina, potássio e aldosterona.....	58

À Valerita, Luis Moreira, Stela e
Joaquim Farias (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Lina e Flávio, minha irmã Stela, Fábio e Belinha, pelo constante apoio, carinho e amor em todos esses anos em que estive ausente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Zatz, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todos os ensinamentos, paciência, apoio, amizade e confiança.

À Dra. Clarice Fujihara, por todos os ensinamentos e ajuda com os experimentos.

Ao Prof. Dr. José Mauro Vieira Jr., grande amigo e incentivador, pela orientação em momentos cruciais desse projeto.

Ao Dr. André Falcão Pedrosa Costa, grande amigo e mestre, pelo incentivo constante e por acreditar em mim em todas as fases de minha formação médica.

Ao Prof. Dr. Rui Toledo, sempre em busca da perfeição à frente da pós-graduação da nefrologia.

À bióloga Luciana Faria de Carvalho, pelo preparo cuidadoso dos cortes para histologia e imuno-histoquímica.

Às amigas Ana Lúcia Mattar, Cláudia Sena, Bianca Ventura, Elisabete Poppi, Camilla Fanelli, Simone Ribeiro, Daniele Canale e Flávia Machado, pela ajuda constante em várias fases desse projeto.

À Dra. Denise Malheiros, pelo apoio e ajuda com a análise histológica.

À Dra. Vanda Jorgetti, pela orientação e amizade construída durante as horas de microscopia.

Aos amigos Humberto Dellê, Dimitri, Luiz Becker, Vagner, Tatiana e Ritinha, pelo apoio e amizade construída durante os anos de LIM-16.

Aos funcionários Bila, Janice e Valter, pela manutenção do biotério.

Às secretárias Neide, Denise e Eliana por toda a assistência com as questões burocráticas.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

INTRODUÇÃO

A despeito dos recentes avanços no tratamento da *Diabetes Mellitus* (DM), a nefropatia diabética (ND) continua sendo uma de suas mais freqüentes complicações.

Nos últimos anos a ND se tornou um problema de saúde pública mundial devido ao aumento progressivo em sua incidência e ao grande impacto sócio-econômico desta complicação do DM. No Brasil, de acordo com dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (2006), é a segunda causa de insuficiência renal crônica (IRC) dialítica, perdendo apenas para a nefroesclerose hipertensiva. Nos Estados Unidos já é a primeira causa de IRC dialítica e estima-se que em 2010 esse país gastará cerca de 28 bilhões de dólares com pacientes diabéticos em terapia renal substitutiva (USRDS, 2001).

A explicação mais aceita para o aumento exponencial da incidência de IRC na população diabética, sobretudo nos diabéticos tipo 2, é o aumento da sobrevida deste grupo de pacientes nos últimos anos, devido aos avanços no tratamento da hipertensão, dislipidemia e insuficiência coronariana.

Observando a população de pacientes diabéticos em terapia renal substitutiva, nota-se uma menor sobrevida, em comparação a outras causas de IRC, seja em hemodiálise ou diálise peritoneal, atribuída às complicações cardiovasculares (STACK e BLOEMBERGEN, 2001 e BATISTA et al., 2005).

Diante do exposto, é urgente que conheçamos cada vez mais os mecanismos envolvidos na patogênese da ND e que surjam novas intervenções para prevenir, retardar, ou mesmo reverter a doença.

PATOGÊNESE DA NEFROPATIA DIABÉTICA

A patogênese da doença é bastante complexa e está longe de ser totalmente esclarecida. Podemos dividir os fatores implicados na patogênese da ND em metabólicos, hemodinâmicos e inflamatórios.

Dentre os fatores metabólicos, a hiperglicemia tem um papel central. Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia induz as alterações funcionais e estruturais observadas na ND não estão totalmente esclarecidos. No entanto, sabe-se que o ambiente hiperglicêmico estimula a síntese de citocinas como o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), implicados em mecanismos de fibrose e aumento da permeabilidade glomerular a macromoléculas (IGLESIAS-DE LA CRUZ et al., 2002 e DI PAOLO et al., 1996). Células mesangiais e tubulares quando expostas a elevadas concentrações de glicose demonstram aumento na expressão de angiotensina II (AII), um octapeptídeo que é sabidamente um dos principais implicados na progressão da doença (WOLF e ZIYADEH, 1997 e SINGH et al., 1999). A ação da glicose sobre proteínas circulantes e estruturais gera moléculas denominadas de produtos avançados de glicação (PAG), que participam de estresse oxidativo e lesão celular (BROWNLEE et al., 1988). Evidências experimentais sugerem a participação dos PAG e seus receptores específicos no

desenvolvimento das complicações microvasculares da DM, em especial da nefropatia (TANJI et al., 2000). Em pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 o controle glicêmico rigoroso, sabidamente, reduz a progressão das complicações microvasculares, inclusive da nefropatia (DCCT RESEARCH GROUP, 2000 e OHKUBO et al., 1995).

Dentre os fatores hemodinâmicos, a hiperfiltração e a hipertensão intraglomerulares exercem um papel crucial na progressão da doença. MOGENSEN (1972) observou aumento do ritmo de filtração glomerular em pacientes diabéticos tipo 1 sem proteinúria. HOSTETTER et al. (1981) demonstraram que o aumento da pressão capilar glomerular (P_{GC}) tem um papel fundamental na progressão da ND. ZATZ et al. (1986) confirmaram esta observação e demonstraram que reduzindo a P_{GC} com enalapril, havia redução na glomerulosclerose, sugerindo um papel da AII na hipertensão glomerular na ND. Existem evidências de que outros compostos como óxido nítrico, prostaglandinas e fator natriurético atrial, também participem da regulação da P_{GC} e do fenômeno de hiperfiltração, observados precocemente na ND (KOMERS et al., 1994 e PERICO et al., 1992).

A participação de fenômenos inflamatórios tem sido demonstrada em diversos modelos experimentais de nefropatia progressiva (FUJIHARA et al., 2001 e KLIEM et al., 1996). Recentemente, surgiram evidências da presença destes fenômenos na patogênese da ND (FURUTA et al., 1993). UTIMURA et al. (2003) demonstraram o importante papel da inflamação na progressão da ND e que o uso precoce do imunossupressor micofenolato mofetil previniu a lesão glomerular no modelo de DM associado à uninefrectomia.

MECANISMOS DE FIBROSE E REMODELAÇÃO RENAL

Independente de onde a lesão se originou (vasos, túbulos ou interstício), a fibrose renal é a via final comum das nefropatias progressivas e o depósito de matriz extracelular (MEC) é fundamental nesse processo. A formação de MEC é um fenômeno dinâmico que resulta da diferença entre sua síntese e degradação (MUTSAERS et al., 1997). Em condições que induzem a fibrose renal esse equilíbrio é quebrado, havendo maior produção e/ou menor degradação da MEC.

O papel dos fibroblastos na deposição da MEC é fundamental. Recentemente, o fenômeno de diferenciação destas células em miofibroblastos, em situações que induzem fibrose renal, tem sido amplamente estudado. A origem dos miofibroblastos ainda não foi totalmente esclarecida. Alguns estudos sugerem que fibroblastos residentes no interstício renal podem dar origem a essas células (KLIEM et al., 1996). Outras evidências sugerem que essas células podem se originar de células epiteliais tubulares e endoteliais, que sofreram diferenciação e migraram para o interstício renal, desempenhando um papel importante na produção de MEC em modelos experimentais de nefropatia crônica (NG et al., 1998).

Várias citocinas que são produzidas em resposta à lesão renal tem propriedades pró-fibróticas, como recrutamento de miofibroblastos e aumento da síntese de MEC. Dentre elas a mais amplamente estudada e cujo papel é considerado crucial para o desenvolvimento de fenômenos de fibrose, em diversos modelos de nefropatia progressiva, é o TGF- β .

O TGF- β é considerado o mediador das ações fibrogênicas de diversos peptídeos vasoconstritores, particularmente a angiotensina II (BORDER e NOBLE, 1998 e WEIGERT et al., 2002). Ele aumenta a expressão do RNA mensageiro de moléculas chave para formação de MEC, incluindo colágeno tipo I e IV (ZIYADEH et al., 1994). O tratamento de ratos com anticorpos monoclonais contra as 3 isoformas do TGF- β , previne a hipertrofia glomerular e atenua de forma significativa a expressão do RNA mensageiro para colágeno tipo IV e fibronectina, retardando alterações estruturais precoces em modelos de ND (ZIYADEH et al., 2000).

A lesão podocitária é outra via implicada na esclerose glomerular e fibrose renal. Quando lesados, os podócitos são incapazes de se replicar (KRIZ et al., 1998). A perda de podócitos induz a formação de adesões dos capilares descobertos à cápsula de Bowman, mais precisamente da membrana basal glomerular com as células epiteliais parietais, que são conhecidas como sinéquias. KRIZ (2003), utilizando técnicas refinadas de análise histológica, tentou demonstrar a evolução do processo de esclerose glomerular em alguns modelos de nefropatia progressiva em que a lesão predominante é a glomerulosclerose segmentar. Utilizando ferritina, o autor demonstrou acúmulo deste traçador em sinéquias. Partindo das alças capilares ainda patentes, que estão formando as sinéquias, foi demonstrado, no mesmo estudo, extravasamento do filtrado glomerular para o interstício periglomerular, com infiltração de fibroblastos nessa região e degeneração túbulo-glomerular.

A degradação da MEC envolve o papel de diversas proteases que são produzidas no próprio tecido renal. Dentre as mais importantes estão as

metaloproteinases da matriz (MMPs) 2, 3 e 9 (MMP-2, MMP-3 e MMP-9), catepsinas e serino proteases. Há evidências de que a degradação da matriz mesangial está comprometida na ND, por redução dessas proteases ou por aumento da expressão de seus inibidores. Em pacientes com ND já foi demonstrada redução das MMP-2 e MMP-3 (SUZUKI et al., 1997 e DEL PRETE et al., 1997). No modelo de ND pós-indução de DM com estreptozotocina (STZ) também há redução na expressão de MMP-9 (MCLENNAN et al., 2002). Em condições patológicas o tecido renal também expressa inibidores de proteases (SHANKLAND et al., 1996). NICHOLAS et al. (2005) demonstraram que a redução na expressão do inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP-1), retarda a progressão da ND em ratos. Em resposta a esses fenômenos, diversas substâncias vão aos poucos se depositando na MEC, como colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas, tornando-a cada vez mais densa e dificultando a ação das proteínas degradadoras e o fenômeno de remodelação.

Algumas das mais importantes e precoces alterações histológicas na ND são: o espessamento da membrana basal glomerular e a expansão mesangial. Esta última é um dos principais fatores implicados na perda de função renal que acompanha a doença (STEFFES et al., 1989). Tais alterações estruturais resultam da deposição em excesso de MEC. Este fenômeno se deve ao acúmulo de proteínas normalmente presentes nessas áreas e/ou de outras que só surgirão nesses tecidos com o decorrer da doença (NERLICH e SCHLEICHER, 1991). A fibronectina, por exemplo, está presente no mesângio normal, mas aumenta sua concentração à medida que ocorre expansão mesangial (VAN VLIET et al., 2001). Já os colágenos tipo I e III são expressos apenas em fases avançadas da

ND, quando surgem lesões do tipo glomerulosclerose nodular (STOKES et al., 2000 e RAZZAQUE et al., 1994).

A mudança progressiva na composição da MEC pode explicar as diferentes respostas diante de intervenções que tentam reverter fibrose renal, de acordo com a fase em que este processo se encontra. Por exemplo, em modelos agudos de isquemia, uma semana após a clipagem da artéria renal, ocorre depósito de colágeno III numa proporção cinco vezes maior do que nos animais controle. Um mês após o evento, a quantidade de colágeno é apenas duas vezes maior do que a observada no grupo controle (FORBES et al., 2000). A composição da MEC, ainda em organização nesses modelos agudos, pode explicar essa remodelação tão significativa.

O PAPEL DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA- ALDOSTERONA NA ND

Diversas evidências experimentais e clínicas demonstram que o sistema-renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem um papel crucial na patogênese da ND. A hipertensão glomerular mediada pela AII, independente do aumento na pressão arterial sistêmica, exerce um papel importante na progressão do dano glomerular na ND e a redução da P_{GC} com drogas que bloqueiam o SRAA, tem um efeito protetor sobre este tipo de lesão (ZATZ et al., 1986). Foi sugerido que o SRAA se encontra hiperativado na ND. FRANKEN et al. (1990) demonstraram aumento dos níveis séricos de pro-renina em pacientes diabéticos. VAN DYK et al. (1994) observaram aumento na atividade sérica da enzima conversora de

angiotensina (ECA) em pacientes diabéticos do tipo 1. Contudo, medidas da concentração sérica não necessariamente refletem uma maior ação renal desses compostos. VALLON et al. (1995) demonstraram que variações na ingestão de sódio em ratos diabéticos induzem mudanças na concentração renal de All sem alterar a sua concentração sérica, sugerindo mecanismos de regulação diferentes entre o SRAA intra-renal e o sistêmico.

Muitas das ações renais da angiotensina II são mediadas pelo receptor AT-1, um polipeptídeo com sete passagens transmembrana que é amplamente distribuído pelo tecido renal. Isoformas AT-1A e AT-1B tem analogia de 95% na seqüência de aminoácidos, mas a maioria das ações da All envolvem a ativação do receptor AT-1A (BURNS, 2000). Dados recentes demonstram aumento da expressão dos receptores AT-1 em áreas com inflamação intersticial no modelo de ablação renal de 5/6 (GONÇALVES et al., 2004). No entanto, foi demonstrada redução na expressão renal de AT-1 na ND. BALLERMANN et al. (1984) demonstraram redução na expressão de AT-1 em glomérulos de ratos diabéticos, três semanas após a indução da doença. CHENG et al. (1994) demonstraram redução na expressão tubular de AT-1 em fases iniciais da ND e que o tratamento com insulina reverteu esse padrão.

A proteção contra a progressão da ND observada com o uso dos inibidores da ECA (IECA) e bloqueadores do receptor AT-1 (BAT-1) em estudos clínicos e experimentais, também sugere a importante participação do SRAA na patogênese da doença (ANDERSON et al., 1992 e LEWIS et al., 1993). ANDERSON et al. (1985) demonstraram pela primeira vez que o uso do IECA enalapril protegeu contra o aumento da pressão capilar glomerular observado no modelo de ablação

5/6 e limitou a progressão da nefropatia. Em seguida ZATZ et al. (1986) demonstraram o mesmo efeito em ratos com nefropatia diabética.

O primeiro BAT-1 desenvolvido foi o losartan (L). Logo surgiram evidências do seu papel renoprotetor na ND e em outros modelos de nefropatia progressiva (REMUZZI et al., 1993).

O “Reduction in Endpoints in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus with the Angiotensin II Antagonist Losartan” (RENAAL) (BRENNER et al., 2001) foi um dos principais estudos que investigaram os benefícios do L em pacientes diabéticos do tipo 2 com nefropatia instalada. Neste estudo foi observada redução de 25% no risco de dobrar a creatinina sérica e de 28% no risco de progressão para doença renal crônica dialítica, além de uma redução de em média 35% na proteinúria nos pacientes que receberam L, quando comparados ao grupo placebo. Resultados semelhantes foram observados com o estudo “Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial” (IDNT) (LEWIS et al., 2001) que avaliou 1715 pacientes diabéticos do tipo 2 e hipertensos, comparando os efeitos renais do irbesartan aos do bloqueador de canal de cálcio amlodipina.

DOSE-DEPENDÊNCIA DOS BAT-1

Há dados na literatura que sugerem que o efeito dos BAT-1 é dose-dependente, havendo maior proteção renal com doses cada vez maiores. No estudo “Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria” (IRMA2) (PARVING et al., 2001) 590 pacientes diabéticos do tipo 2 com hipertensão arterial e microalbuminúria, mas com função renal normal, foram

aleatorizados para receber 150 mg/dia ou 300 mg/dia de irbesartan. Ao final de 2 anos de seguimento, o risco de desenvolver nefropatia foi significativamente menor no grupo irbesartan comparado ao placebo. Dentre os tratados com irbesartan o risco de progressão para nefropatia foi de 68% no grupo 150 mg e 44% no grupo tratado com 300 mg da droga. A redução na albuminúria também foi mais evidente no grupo tratado com a dose mais alta (34% vs 24%). ARANDA et al. (2005) observaram maior redução na proteinúria e preservação da função renal com o dobro da dose convencional de telmisartan (160 mg/dia), durante 2 anos de seguimento, em pacientes hipertensos com IRC. ROSSING et al. (2006) compararam diferentes doses de irbesartan (300, 600 e 900mg) em pacientes diabéticos do tipo 2 e microalbuminúricos. Nesse estudo foi demonstrado um maior efeito na redução da microalbuminúria com a dose de 900mg de irbesartan.

Dados recentes deste laboratório demonstraram que doses dez vezes acima da dose hipotensora de L foram mais eficazes em retardar a progressão da lesão renal em ratos submetidos à ablação de 5/6, mesmo sem apresentar efeito hipotensor adicional, sugerindo que quanto maior a dose maior o efeito protetor dessa classe de medicamentos (FUJIHARA et al., 2005).

A despeito das evidências a favor de um efeito dose-dependente dos BAT-1 em algumas formas de nefropatia progressiva, não há dados suficientes que assegurem um efeito semelhante na ND. Seria de se esperar que os achados obtidos no modelo de ablação de 5/6 pudessem ser repetidos no modelo de ND pós-indução de DM com STZ. No entanto, os dois modelos apresentam diferenças significativas. Diferente da ND, o modelo de ablação de 5/6 é mais agressivo, cursa com hipertensão e dano túbulo-intersticial significativo, além de elevada

expressão de receptores AT-1 no interstício renal. Tais diferenças poderiam gerar achados discordantes em relação à dose-dependência dos BAT-1 nos dois modelos citados.

É POSSIVEL OBTER REGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA ?

Nos últimos anos, diversas modalidades terapêuticas têm demonstrado impacto em retardar a perda de função renal em várias formas de nefropatia progressiva. Mais recentemente, alguns pesquisadores vêm tentando demonstrar que é possível não apenas impedir a progressão, mas até mesmo reverter algumas dessas nefropatias. A possibilidade de reversão dessas lesões renais com tratamento medicamentoso ainda é tema polêmico.

FIORETTO et al. (1998) demonstraram, pela primeira vez em humanos, a possibilidade de reversão da nefropatia diabética já instalada. Nesse estudo foram avaliados 8 pacientes com nefropatia diabética comprovada por biópsia, submetidos a transplante pancreático isolado. Os pacientes foram submetidos à biópsia renal antes do transplante, bem como 5 e 10 anos após o mesmo. Após 5 anos de transplante pancreático não houve regressão significativa das lesões observadas na primeira biópsia (espessamento da membrana basal glomerular, expansão mesangial e glomeruloesclerose nodular). Contudo, após 10 anos de seguimento, houve reversão dessas lesões, não se observando mais glomeruloesclerose nodular em alguns pacientes.

BOFFA et al. (2003) demonstraram no modelo de nefropatia por inibição crônica da síntese do óxido nítrico, caracterizado por hipertensão, proteinúria e declínio de função renal progressivos, que o tratamento com L na dose de 30 mg/kg/dia, considerada maior que a antihipertensiva, reduziu a expressão gênica para colágeno I e IV e TGF- β . No mesmo estudo, após 1 mês de tratamento, também foi observada redução no índice de glomeruloesclerose em comparação com os animais não tratados, sugerindo regressão das lesões glomerulares. No entanto, nesse estudo o tratamento com L foi iniciado quando o índice de glomeruloesclerose ainda era bastante modesto e a regressão observada foi basicamente de lesões do tipo expansão mesangial.

Há evidências de que o fator de crescimento do hepatócito (HGF) desempenha um papel protetor em alguns modelos de nefropatia progressiva (MIZUNO et al., 1998 e GAO et al., 2002). Na nefropatia diabética experimental o papel do HGF ainda é controverso. CRUZADO et al. (2004) demonstraram que o aumento da produção renal de HGF correlacionou-se com uma redução significativa na albuminúria e no índice de esclerose glomerular em ratos diabéticos. Nesse estudo os autores compararam os dados histológicos obtidos após 32 semanas de DM (quando foi iniciado o tratamento com HGF) e 30 dias depois. Ao final desse período, foi observada redução significativa na expansão mesangial e no índice de esclerose

glomerular. Contudo, não houve redução da expansão intersticial nem melhora na taxa de depuração de creatinina.

REMUZZI et al. (2002) avaliaram o efeito do bloqueio duplo do SRAA com lisinopril e valsartan, por 15 semanas, num modelo de nefropatia progressiva espontânea em ratos. Ao final do estudo, os animais tratados apresentaram redução de 12 para 6% na porcentagem de glomérulos com esclerose em menos de 25% do tufo capilar. Nos animais tratados também houve redução discreta, porém considerada significativa, na porcentagem de área intersticial, em relação aos animais controle. Porém, apenas 2% dos glomérulos desses animais apresentavam lesões glomerulares mais avançadas e quando a esclerose atingia mais de 25% do tufo capilar não foi demonstrada reversão. Além disso, o tratamento não preveniu a perda de função renal observada nesse modelo, dado que se opõe à hipótese de regressão da nefropatia.

Mais recentemente, tem-se estudado o papel das células-tronco nos mecanismos de regeneração renal. Existem evidências, indiretas, de que células provenientes da medula óssea podem migrar até o parênquima renal e sofrer diferenciação nesse novo sítio (POULSOM et al., 2001). No entanto, a maioria dos estudos existentes foi desenvolvida em modelos de insuficiência renal aguda (GUPTA et al., 2002 e KALE et al., 2003), havendo pouquíssimos dados sobre o papel das células-tronco na reparação das lesões renais crônicas progressivas.

Nos estudos experimentais em que se tentou demonstrar regressão de nefropatias, os tratamentos foram sistematicamente iniciados em animais com lesões renais pouco avançadas (baixo índice de esclerose glomerular), tendo

havido reversão apenas de alterações relativamente brandas e que não comprometiam a estrutura renal, tais como expansão mesangial e hialinose glomerular moderada.

Portanto, diante das evidências disponíveis atualmente, não podemos afirmar que lesões renais caracterizadas por fibrose avançada podem ser revertidas.

No presente estudo tentamos obter novas evidências sobre a possibilidade de regressão da ND com tratamentos farmacológicos, utilizando critérios histológicos rigorosos na caracterização das lesões glomerulares.

OBJETIVOS

1. Investigar a hipótese de que no tratamento da nefropatia diabética os BAT-1 exibem um efeito dose-dependente, semelhante ao observado no modelo de ablação de 5/6.
2. Avaliar a possibilidade de regressão de lesões avançadas da nefropatia diabética, tais como glomeruloesclerose com sinéquias.

MÉTODOS

Foram utilizados cento e trinta ratos Munich-Wistar adultos machos, com peso inicial de 230 a 270 gramas. Os animais foram obtidos de uma colônia mantida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da FM-USP (LIM16). Todos foram mantidos a uma temperatura ambiente de 23 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 5 %, ciclo claro/escuro de 12/12 h e tiveram livre acesso a água e a uma dieta farelada, normossódica e normoproteica (Nuvilab, Curitiba, PR).

Indução da DM

Com oito semanas de idade foi induzida a DM através da administração intravenosa de estreptozotocina (Sigma, St. Louis –MO, USA) na dose única de 65 mg/kg em tampão citrato 0,05 M, em 4 grupos de animais. Um quinto grupo serviu como controle e recebeu apenas o veículo. A indução de DM foi feita sob anestesia com Ketamina (50 mg/kg) associada a Rompum (10 mg/kg), na proporção de 2:1. Os animais diabéticos receberam, diariamente, uma dose vespertina de insulina (NPH mista, Biobrás, Montes Claros – MG), que variou de 0,5 a 4 unidades e que foi ajustada individualmente com o intuito de manter a glicemia matinal entre 300 e 450 mg/dl. O nível sanguíneo de glicose foi avaliado semanalmente através da técnica de reflectometria (Advantage, Roche Diagnostics, Indianápolis – IN, USA).

Seleção dos grupos

Após 10 meses de DM selecionamos os animais diabéticos com albuminúria acima de 60 mg/dia, no intuito de incluir apenas os animais com lesão renal significativa. Os grupos de animais diabéticos foram pareados de acordo com a albuminúria.

Grupos experimentais:

Grupo CN – ratos controle observados até 12 meses após a indução dos animais diabéticos.

Grupo DMPRE – ratos diabéticos tratados apenas com insulina e observados até 10 meses de DM.

Grupo DM – ratos diabéticos tratados apenas com insulina e observados até 12 meses de DM.

Grupo DML50 – ratos diabéticos tratados com insulina e losartan (Medley, Brasil) na água do bebedouro, na dose de 50 mg/kg/dia, dos 10 aos 12 meses de DM.

Grupo DML500 – ratos diabéticos tratados com insulina e losartan na água do bebedouro, na dose de 500 mg/kg/dia, dos 10 aos 12 meses de DM.

Durante o período de observação os animais foram submetidos à pesagem diária, determinação mensal da albuminúria de 24 horas (U_{alb}), mensurada pela técnica de imunodifusão radial (MANCINI e CARBONARO, 1965) e medida de pressão caudal (ZATZ, 1990). Ao final do período de observação os animais foram anestesiados com Ketamina e Rompum e tiveram o seu rim direito extraído, cortado em três ou quatro fatias coronais de 2 a 3 mm e congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida a artéria aorta foi cateterizada com um tubo de polietileno e foi colhido sangue para determinação do potássio, creatinina e aldosterona. Após a coleta os animais tiveram seu rim esquerdo perfundido *in situ* com solução de Dubosq-Brazil, após breve perfusão com solução salina 0,9%. Em seguida, o tecido renal foi cortado em três ou quatro fatias coronais de 2 a 3 mm e imersos em solução de formol a 10% em tampão fosfato. Em seguida os fragmentos foram processados em parafina, obtendo-se cortes de 2-3 μm de espessura para análise histológica e imuno-histoquímica, cujas técnicas estão descritas a seguir:

Histomorfometria

Para a análise histológica os cortes de tecido renal de 2-3 μm de espessura foram corados com o PAS e tricrômico de Masson.

O grau de expansão da matriz mesangial foi mensurado através do cálculo da porcentagem de área glomerular ocupada pelo mesângio através de um método de contagem de pontos e foram analisados 25 glomérulos consecutivamente. A partir desses dados foi calculado um índice de expansão mesangial (IEM), que consistiu na razão entre o número de glomérulos cuja área mesangial foi superior a 25% e o número de glomérulos cuja área mesangial foi inferior a 15%. O IEM foi utilizado para melhor representar a porcentagem de área ocupada por mesângio em cada animal, visto que nesse modelo de ND experimental, muitos glomérulos não desenvolvem qualquer alteração estrutural, o que subestimaria o grau de expansão mesangial caso uma simples avaliação por porcentagem fosse realizada.

Para mensurar a porcentagem de esclerose glomerular (%EG) utilizamos um critério histológico diferente dos utilizados em estudos prévios. Só foram consideradas como esclerose glomerular as lesões do tufo capilar glomerular acompanhadas de sinéquias. Tal critério foi utilizado na tentativa de evitar que glomérulos afetados por expansão da matriz mesangial, ainda que extensa, fossem considerados erroneamente como esclerosados, ou seja, tomados por um processo já bastante avançado. Para essa avaliação foram analisados 200 glomérulos por corte, sob aumento de 400X.

Em uma segunda forma de avaliação, amplamente descrita na literatura, foi avaliado o grau de lesão glomerular atribuindo-se a cada glomérulo uma

pontuação: 1 - lesões acometendo de 1 a 25% do tufo capilar glomerular, 2 - lesões de 26 a 50%, 3 - acometimento de 51 a 75% e 4 - para lesões acometendo mais de 75% do tufo capilar glomerular. Um índice de esclerose glomerular (IEG) foi calculado para cada rato a partir da média ponderada dos valores atribuídos para cada glomérulo, individualmente, e multiplicada por 100.

O grau de expansão intersticial foi quantificado por um método de contagem de pontos da fração do córtex renal ocupada por tecido intersticial corada pelo tricrômico de Masson. Os cortes foram analisados por um patologista experiente que não tinha conhecimento prévio dos grupos.

Imuno-histoquímica

Todas as lâminas para imuno-histoquímica foram silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano- Sigma). Após 30 minutos em estufa a 60 °C, os cortes foram submetidos a desparafinização em três banhos de xilol e em seguida reidratados. Procedeu-se então à recuperação dos antígenos com calor úmido, na temperatura de 90 °C durante 30 minutos, em solução de ácido cítrico 10 mM em pH de 6,0. As lâminas foram lavadas em água destilada e mantidas em solução tampão TBS (Tris Buffer Saline) em pH de 7,6.

Para marcação de células positivas para o antígeno ED-1 (macrófagos), utilizou-se o método APAAP (fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina). Após o banho com tampão TBS, procedeu-se à incubação dos cortes com soro não imune de coelho (Dako, Dinamarca) na concentração de 1:20 por 30 minutos para bloqueio de marcação inespecífica. Seguiu-se a incubação dos cortes com cerca de 30 µl do anticorpo primário anti-ED-1 de rato desenvolvido em camundongo

(Serotec, Oxford, Reino Unido) na concentração de 1:200 por, pelo menos, 18 h. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e então incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos) na concentração de 1:50, durante 30 minutos, em temperatura ambiente na câmara úmida. Após nova lavagem com TBS, os cortes foram incubados por 30 minutos com o complexo APAAP (Dako, Carpinteria-CA, USA), na concentração de 1:70 e lavados novamente em TBS por 5 minutos.

Para revelação com substrato cromogênico utilizou-se uma solução de 1 mg de naftol AS-MX fosfato (Sigma, St. Louis-MO, USA), 100 µl de dimetilformamida, 4,9 ml de solução Tris 0,1 M em pH 8,2, 5 µl de levamisol 1 M e 5 mg de "Fast red". Foram aplicadas três gotas dessa solução em cada corte e estes foram mantidos em temperatura ambiente em câmara úmida. A revelação foi acompanhada em microscópio e interrompida com submersão das lâminas em água destilada. As lâminas foram posteriormente contra coradas com Hemalaum (Merck, Damstadt, Alemanha) durante 1 minuto e 20 segundos. Por fim, os cortes foram cobertos com meio de montagem aquoso (Glycergel), montados entre lâmina e lamínula e devidamente identificados.

A quantificação da positividade para o antígeno ED-1 foi realizada em aumento de 250X e expressa em células/mm². Foram examinados 25 campos sucessivos por corte, correspondendo a uma área de 0,13 mm².

Para a marcação de células positivas para vimentina (Vim) foi utilizado o método biotina-estreptavidina-peroxidase. Realizou-se um bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 3% (7 banhos de 5 minutos cada) seguindo-se

lavagem com água corrente, água deionizada e 3 banhos de PBS por 3 minutos cada. Com a finalidade de evitar marcação inespecífica, bloqueios foram realizados com kit Avidina/Biotina (Dako, Carpinteria-CA, USA), sendo duas incubações de 15 minutos cada e com leite desnatado a 4%, por 20 minutos. Em seguida, foi aplicado sobre os cortes o anticorpo monoclonal para vimentina (Novocastra, Nescastle, UK), diluído em BSA 1:400, sendo esses incubados por, no mínimo, 18 h. No dia seguinte as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com kit LSAB System-HRP (DakoCytomation, Carpinteria-CA, USA). Após esta etapa as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação com cromógeno 3,3 diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). As lâminas foram lavadas, abundantemente, em água corrente e contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A quantificação da positividade para vimentina nos glomérulos foi realizada em aumento de 250X, através de um sistema de contagem de pontos e expressa como porcentagem de pontos positivos na área total do tufo capilar glomerular. Para este fim, foram analisados 50 glomérulos por corte.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA) com comparações pareadas entre grupos pelo método de Tukey (WALLENSTEIN et al., 1980). Os dados que apresentaram distribuição não-Gaussiana foram submetidos à transformação logarítmica antes da análise estatística. Definiu-se como significância estatística $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os dados referentes ao peso corpóreo, glicemia e pressão caudal estão representados nas figuras e tabelas 1, 2 e 3. A mortalidade entre os animais diabéticos no período que antecedeu o tratamento foi de aproximadamente 20 % e zero no grupo controle. Nenhum animal diabético morreu durante o tratamento com losartan. Com relação ao peso corpóreo, já a partir dos 2 meses de DM, a média dos ratos diabéticos foi significativamente menor do que a do grupo controle, dado este já demonstrado por outros autores (FUJIHARA et al., 1992 e UTIMURA et al., 2003). Não houve diferença significativa de peso corpóreo entre os grupos de animais diabéticos, sugerindo que o L, mesmo na dose de 500 mg/kg/dia, não interferiu significativamente com o estado geral dos animais. A glicemia média dos animais diabéticos, no período de observação, variou entre 300 e 450 mg/dl, não havendo diferença significativa entre os grupos, inclusive os tratados. Esse dado sugere que o losartan não exerceu efeito metabólico importante em relação ao controle glicêmico desses animais.

A pressão caudal dos animais diabéticos não se elevou em relação ao grupo controle ao longo do estudo (figura 3 e tabela 3). Após 30 dias de tratamento com L, o grupo DML500 apresentou uma redução numérica, porém não significativa, na pressão sistólica. Tal efeito não ocorreu no grupo DML50 nesse período. Contudo, após 60 dias de tratamento os grupos DML50 e DML500 apresentaram redução

significativa na pressão caudal ($p < 0,05$ vs CN), não havendo diferença entre os grupos tratados com L, em relação a este parâmetro, nesse período.

A evolução da albuminúria ao longo do estudo está representada na figura 4 e na tabela 4. O grupo CN apresentou aumento progressivo na albuminúria em função do envelhecimento. A excreção urinária de albumina foi significativamente maior nos animais diabéticos, já a partir do 4º mês de DM ($p < 0,05$ vs CN). O grupo DM apresentou aumento progressivo na albuminúria. O tratamento com losartan reduziu de forma significativa a albuminúria em comparação com o grupo DM e DMPRE (grupo DML50, Ualb 40 ± 10 mg/dia; DML500 Ualb 35 ± 10 mg/dia; $p < 0,05$ vs DM e DMPRE). Não houve diferença na excreção urinária de albumina entre os grupos DML50 e DML500 após 60 dias de tratamento.

Os valores de creatinina sérica, potássio e aldosterona plasmáticos estão representados na tabela 6. Ao final dos 60 dias de tratamento com L não houve diferença na creatinina sérica ou no potássio plasmático entre os grupos. Os níveis plasmáticos de aldosterona foram significativamente maiores no grupo DM em relação ao grupo controle e os animais tratados com L apresentaram redução nos níveis plasmáticos de aldosterona em relação ao grupo DM ($p < 0,05$).

Histomorfometria e Imuno-histoquímica

Os dados referentes à expansão mesangial, esclerose glomerular, área intersticial e imuno-histoquímica para macrófagos e vimentina estão representados nas figuras 5 a 14 e tabela 5. Aos 10 meses de DM o grupo DMPRE apresentou aumento significativo do IEM em relação aos controles da mesma idade (grupo

DMPRE, IEM 31 ± 6 vs CN, 3 ± 1 ; $p < 0,05$). O grupo DM apresentou aumento adicional no IEM em relação ao grupo DMPRE (grupo DM, IEM 141 ± 40 ; $p < 0,05$ vs DMPRE). Os grupos tratados com L apresentaram redução significativa no IEM em relação ao grupo DMPRE (figura 5 e 11). Não houve diferença entre os grupos tratados com L em relação a esse parâmetro. Em relação a %EG houve aumento significativo no grupo DMPRE em relação aos controles da mesma idade (grupo DMPRE, %EG 6 ± 1 vs CN, $2 \pm 0,3$; $p < 0,05$). O tratamento com L preveniu contra a progressão da esclerose glomerular (grupo DML50, %EG 5 ± 2 e DML500, %EG 6 ± 1 ; $p < 0,05$ vs DM) sem efeito adicional com a dose mais elevada. Porém, não houve diferença significativa na %EG entre os grupos tratados com L e o grupo DMPRE. Em relação ao IEG foi observado que a maioria dos glomérulos estudados no grupo DMPRE (62%) apresentaram lesões nas faixas de 1 a 25% do tufo capilar glomerular, 25% apresentaram lesões com extensão de 26 a 50% e 9% dos glomérulos apresentaram lesões nas faixas de 51 a 75%. Apenas uma minoria dos glomérulos estudados (3%) apresentou lesões com mais de 75% de comprometimento do tufo capilar glomerular. Os ratos do grupo controle apresentaram um IEG compatível com o processo de envelhecimento. O IEG foi significativamente maior nos animais do grupo DMPRE em relação ao grupo CN (figura 7). No grupo DM houve um aumento adicional no IEG ao final do estudo ($p < 0,05$ vs grupo DMPRE, figura 12). Nos grupos tratados com L o IEG foi significativamente menor do que o observado no grupo DM (grupos DML50, IEG 11 ± 1 e DML500, IEG 14 ± 2 ; $p < 0,05$ vs DM). Os grupos tratados com L também apresentaram menores valores de IEG em relação ao grupo DMPRE (figuras 7 e

12). Não houve expansão intersticial significativa, no período de observação, em nenhum dos grupos estudados.

Observou-se aumento significativo na infiltração renal por macrófagos no grupo DM (figuras 8 e 13C). O tratamento com L atenuou de forma significativa a infiltração de macrófagos no tecido renal ($p < 0,05$ vs grupo DM, figura 13D), não havendo diferença significativa entre o grupo DML50 e DML500.

A expressão de vimentina foi igualmente reduzida nos glomérulos dos animais diabéticos dos grupos DMPRE e DM (grupo DMPRE, Vim 11 ± 1 céls/mm²; grupo DM, Vim 11 ± 1 céls/mm²; $p < 0,05$ vs CN; figuras 9, 14B e 14C). O tratamento com L restaurou a expressão glomerular de vimentina (figura 14D) para valores semelhantes aos do grupo controle, não havendo diferença significativa entre os grupos DML50 e DML500. Houve uma correlação inversa entre a expressão glomerular de vimentina e a albuminúria (figura 10).

DISCUSSÃO

No presente estudo observamos albuminúria intensa e lesão glomerular evidente, mas não lesão túbulo-intersticial, 10 e 12 meses após a indução da DM.

Esses achados estão em concordância com os obtidos anteriormente neste Laboratório por UTIMURA et al. (2003), que observou que, mesmo em ratos uninefrectomizados, nos quais a lesão renal é acelerada, a indução de DM com STZ não se associava a dano túbulo-intersticial significativo. Quando considerados em conjunto, esses resultados indicam que, no modelo de diabetes por estreptozotocina, ocorre um predomínio de lesões glomerulares, poupando o compartimento túbulo-intersticial, pelo menos durante o período estudado, de até 12 meses após a indução da DM. É importante salientar que, em sua maioria, os glomérulos examinados aos 10 e 12 meses de diabetes apresentavam-se essencialmente normais à microscopia ótica, indicando que, mesmo após um período comparativamente longo de observação, ainda estamos diante de um modelo de ND incipiente, correspondendo em humanos, aproximadamente, à antiga Fase 3 da nefropatia diabética, de acordo com a classificação proposta por MOGENSEN (1983), ou à Fase 1 da classificação atualmente proposta para a IRC (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2000).

Dentre as lesões glomerulares observadas, a expansão da matriz mesangial (figura 11), já descrita anteriormente em associação com a ND, foi a mais freqüente (FIORETTO et al., 1995). Trata-se de um depósito de componentes da MEC no compartimento mesangial, o qual, no entanto, não causa alteração estrutural significativa do tufo capilar. Ainda assim, esse tipo de lesão pode levar à redução da superfície filtrante, acarretando assim uma limitação séria à ultrafiltração glomerular. STEFFES et al., (1989) demonstraram uma relação direta entre a expansão da matrix mesangial e a perda de função renal em portadores de ND. Em estudos clínicos de longo prazo, foi observada recuperação parcial da

função renal com o uso de bloqueadores do SRAA, possivelmente relacionada à regressão da expansão de matriz mesangial (RUGGENENTI et al., 1998).

Com uma frequência menor, observamos a presença de glomerulosclerose segmentar (figura 12), que definimos como obliteração de alças capilares por depósitos confluentes de constituintes da MEC. Contudo, só consideramos como esclerosadas aquelas áreas de obliteração do tufo capilar que se acompanhavam da presença de sinéquias, ou seja, aderências à cápsula de Bowman. Tal critério foi utilizado com o intuito de evitar que áreas compostas apenas por expansão da matriz mesangial fossem classificadas como esclerosadas. Mediante esse procedimento, buscamos separar lesões glomerulares precoces daquelas com caráter mais avançado, já francamente fibróticas.

A sinéquia é fruto da adesão do tufo capilar ao folheto parietal da cápsula de Bowman, numa área em que houve perda de podócitos. KRIZ (2003) demonstrou, em material de biópsia obtido de pacientes diabéticos, que, em áreas de glomeruloesclerose segmentar associadas à formação de sinéquias, ocorre extravasamento de filtrado glomerular, o qual tende a se acumular no interstício adjacente, sendo contido por uma “barreira” de fibroblastos que se infiltram na região. A posterior organização desse infiltrado e da inflamação que o mesmo acarreta leva, ainda segundo o mesmo pesquisador, ao desenvolvimento de fibrose do interstício situado ao redor dos néfrons afetados.

Em vista da rigidez do critério que adotamos, o qual exigia a presença de sinéquias para que as lesões glomerulares fossem classificadas como esclerosantes, é possível que a frequência real de glomérulos com tais lesões tenha sido até maior do que a observada. Contudo, o rigor utilizado, ainda que

possa ter sido excessivo, foi necessário a que adquiríssemos a certeza de que as lesões classificadas como esclerosantes eram qualitativamente diferentes das que consistiam apenas em expansão mesangial, refletindo um processo mais avançado de fibrose. É importante observar que, mesmo com a utilização desse critério rigoroso, observamos um aumento significativo na %EG, dez meses após a indução da DM (imediatamente antes do início do tratamento), indicando a presença, já nessa fase, de lesões glomerulares avançadas. Contudo, deve-se ressaltar que a frequência de glomérulos com lesões esclerosantes foi baixa, não ultrapassando 6%, mesmo após 10 meses de DM. Dentre aqueles glomérulos que apresentaram tais lesões, pouquíssimos foram afetados de modo global, ilustrando, mais uma vez, o caráter relativamente incipiente do processo.

O efeito do L sobre a infiltração renal de macrófagos observada em ratos diabéticos ilustra a importância dos fenômenos inflamatórios na patogênese da ND, bem como o efeito antiinflamatório, amplamente descrito em outros modelos experimentais, do tratamento com supressores do SRAA. Nossos achados corroboram com os de UTIMURA et al. (2003) que demonstraram infiltração de macrófagos no tecido renal, no modelo de DM e uninefrectomia.

O tratamento com L durante 2 meses fez regredir a expansão mesangial que havia sido detectada aos 10 meses de DM. Esse achado indica ser possível a regressão desse tipo de lesão glomerular, e está de acordo com as observações relatadas anteriormente por FIORETTO et al. (1998) em pacientes diabéticos e, mais recentemente, por ADAMCZAK et al. (2003) em ratos com ablação renal de 5/6. Os mecanismos através dos quais a cura da DM ou o tratamento com supressores do SRAA leva à reabsorção do material acumulado na região

mesangial é ainda incerto. MA et al. (2005) demonstraram no modelo de ablação renal de 5/6, que o tratamento com inibidores da ECA diminui a expressão renal do PAI-1 (Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1), conhecido inibidor de MMPs, as quais são responsáveis pela degradação dos componentes da MEC. HAN et al. (2006) demonstraram redução na expressão de MMP-2 e aumento na expressão de seu inibidor (ITMP-2) em ratos diabéticos. No mesmo estudo foi observado que o tratamento com um BAT-1 trouxe os valores de MMP-2 e ITMP-2 para níveis semelhantes aos dos animais controle, sugerindo um papel da AII no processo de remodelação da MEC.

Ao contrário do observado com relação à expansão mesangial, as lesões glomerulares classificadas como esclerosantes não sofreram regressão aparente nos ratos tratados com L, embora sua progressão tenha sido prevenida. Esse achado é consistente com o conceito de que essas lesões representam um estágio mais avançado e possivelmente irreversível, ou pelo menos de reversão mais difícil e demorada do que a simples expansão mesangial. No entanto, não se pode afastar a possibilidade de que, caso o tratamento fosse prolongado por mais algumas semanas ou meses, observaríamos, também, regressão das lesões mais avançadas. Nossas observações não estão necessariamente em desacordo com achados anteriores da literatura, interpretados como indicativos de que a glomeruloesclerose é um processo reversível. É preciso notar que, em sua quase totalidade, os estudos de regressão da doença renal crônica consideraram as lesões glomerulares como um todo relativamente homogêneo, sem procurar distinguir, como fizemos no presente estudo, entre lesões incipientes (expansão mesangial) e avançadas (glomeruloesclerose com a presença de sinéquias). No

entanto, mesmo de forma inadvertida, é possível observar, em estudos anteriores, que o comportamento dos dois tipos de lesão diante do tratamento com supressores do SRAA pode diferir. ADAMCZAK et al. (2003), utilizando o modelo de ablação de 5/6, avaliaram a morfologia glomerular antes e após o tratamento com enalapril, numa dose quatro vezes superior à dose anti-hipertensiva. O grau de esclerose glomerular naqueles animais foi avaliado através de um índice (Índice de Esclerose Glomerular, IEG) que levava em conta tanto a frequência quanto a extensão das lesões glomerulares. Antes do tratamento, a maioria dos glomérulos apresentava IEG baixo, com lesões pouco avançadas, compostas basicamente por expansão da matriz mesangial. Após 4 semanas de tratamento, foi observada redução significativa na porcentagem de glomérulos com hialinose segmentar leve, mas não na de glomérulos com lesões mais avançadas. No presente estudo, o uso de um critério para separar essas lesões permitiu observar uma diferença de comportamento entre elas, deixando evidente a dificuldade em fazer regredir as lesões mais avançadas, com fibrose consolidada.

O modo de expressar o grau de lesão glomerular pode condicionar de modo decisivo as conclusões a que podemos chegar com relação à reversibilidade das lesões glomerulares. Esse importante aspecto fica evidente quando expressamos o grau de glomeruloesclerose através do IEG. Ao contrário do que havíamos observado quando a esclerose glomerular foi expressa como porcentagem dos glomérulos afetados por sinéquias, os animais tratados com L exibiram regressão do IEG em relação ao grupo pré-tratamento. Mais uma vez, a contradição é apenas aparente. A expansão da matriz mesangial e a esclerose glomerular genuína coexistem e não são separadas por uma clara linha demarcatória. Assim,

mesmo que uma lesão esclerosante persista após o tratamento, pode haver reabsorção do excesso de matriz mesangial nas áreas adjacentes à sinéquia, ou seja, diminuição da porção mais facilmente reversível da lesão. Como o IEG leva em conta apenas a extensão da lesão, não distinguindo entre sinéquias e áreas de expansão mesangial, o resultado é uma diminuição do IEG com o tratamento, ainda que a frequência das sinéquias tenha permanecido estável.

O achado de que a ND é constituída de lesões glomerulares reversíveis e que mesmo em fases incipientes pode comportar lesões mais avançadas e de regressão mais difícil, tem um importante corolário no que diz respeito ao tratamento clínico de pacientes diabéticos: a julgar por esses resultados, o tratamento desses pacientes com supressores do SRAA deve ser iniciado o mais cedo possível, em uma fase em que ainda se pode reverter uma parte substancial das lesões glomerulares. Há evidências clínicas de que uma porcentagem dessas lesões, como demonstrado no presente estudo, seja já irrecuperável e determine, em fases relativamente incipientes, perda detectável de função renal (PERKINS et al., 2007), o que torna ainda mais imperioso o início precoce do tratamento e o acompanhamento clínico rigoroso desses pacientes.

O estudo da expressão glomerular de vimentina permitiu entender em maior detalhe a natureza das lesões glomerulares observadas no presente estudo, bem como o efeito sobre elas do tratamento com L. A vimentina é uma proteína expressa constitutivamente no tecido renal, integrando o citoesqueleto de células epiteliais da cápsula de Bowman, células endoteliais, células mesangiais e podócitos. No presente estudo, a expressão glomerular de vimentina apresentou predomínio em podócitos e reduziu-se nos ratos diabéticos não tratados. Esses

resultados estão de acordo com observações publicadas anteriormente na literatura, como as de ESSAWY et al. (1997), que demonstraram redução da expressão glomerular de vimentina em biópsias de pacientes diabéticos do tipo 1 e 2. Esses achados sugerem lesão e/ou disfunção de estruturas constitutivas do tufo capilar, como células endoteliais e podócitos, nas áreas de expansão mesangial e de glomerulosclerose. O efeito do tratamento com L, restaurando a expressão glomerular de vimentina, assim como a correlação inversa entre esta e a albuminúria, sugerem que a redução na expressão de vimentina pode estar relacionada à disfunção de células e estruturas fundamentais ao bom funcionamento da barreira de filtração glomerular, como os podócitos e a membrana diafragmática. Juntos, esses achados fornecem uma possível base para a regressão das lesões glomerulares promovida pelo L, sugerindo que a reabsorção do excesso de matriz mesangial permitiu a recuperação funcional das células glomerulares, restaurando assim a síntese de moléculas essenciais ao bom funcionamento da barreira glomerular.

Observamos elevação dos níveis de aldosterona plasmática nos animais diabéticos, 12 meses após a indução do DM, e redução desses níveis com o tratamento com L. Esse achado pode ajudar a explicar os mecanismos responsáveis pelo dano glomerular nesse modelo. O aumento da aldosterona plasmática exacerba o dano glomerular no modelo de ablação renal de 5/6 (GREENE et al., 1996). O acréscimo de um antagonista da aldosterona (espironolactona) ao tratamento antihipertensivo de pacientes diabéticos do tipo 1, reduz significativamente a albuminúria sem apresentar efeito adicional no controle da pressão arterial sistêmica desses pacientes (SCHJOEDT et al. 2005). Nossos

achados reforçam a hipótese de um possível papel patogênico da aldosterona nas lesões glomerulares na ND.

Ao contrário do observado por FUJIHARA et al. (2005) no modelo de ablação de 5/6, a renoproteção proporcionada pelo tratamento com losartan não obedeceu a um efeito dose-resposta. A regressão da albuminúria e da expansão mesangial, assim como a prevenção da esclerose glomerular, ocorreram com igual intensidade com a dose convencional, de 50 mg/kg, e com uma dose dez vezes superior. As razões por que não conseguimos reproduzir aqui os resultados obtidos com o modelo de ablação de 5/6 não estão claras. Devemos observar, no entanto, que uma das prováveis explicações para o efeito dose-resposta observado com aquele modelo é a intensa expressão do receptor AT-1 em áreas de inflamação intersticial, tornando provavelmente necessário aumentar muito a concentração do losartan, a fim de forçar o desligamento da AII. No entanto, conforme observado acima, não há expansão ou inflamação significativas do interstício renal no modelo de ND por STZ, ao menos até o 12^o mês após a indução da DM. Em concordância com esse achado diversas evidências experimentais sugerem que não há aumento na expressão dos receptores AT-1 no tecido renal na ND (CHENG et al., 1994 e BALLERMANN et al., 1984), o que pode tornar inútil a tentativa de aumentar a eficácia do tratamento com L aumentando a dose da droga.

Ao contrário do observado em pacientes com ND avançada, nos quais a intolerância ao tratamento com supressores do SRAA manifesta-se freqüentemente sob a forma de hipercalemia ou queda catastrófica do RFG, não observamos qualquer dessas anomalias em ratos tratados com qualquer das

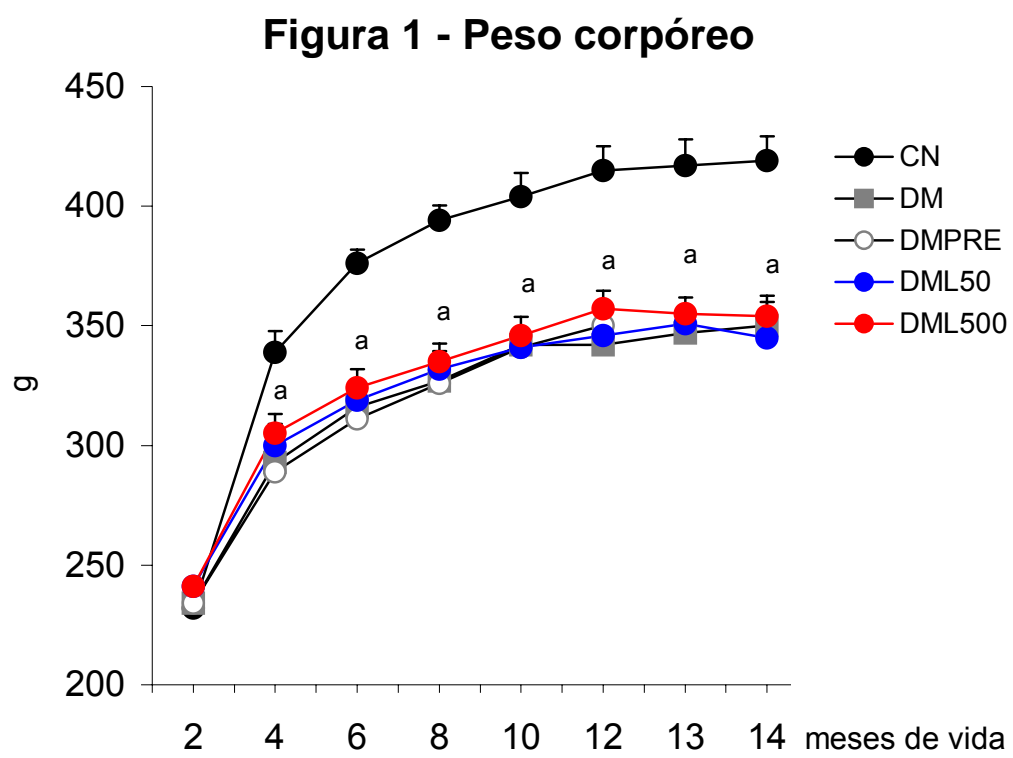
doses de L. As taxas de creatinina sérica, assim como as de potássio plasmático, foram semelhantes entre os grupos, indicando ausência de rebaixamento da função renal nos ratos diabéticos. Uma vez mais, esses achados indicam que o modelo utilizado é o de uma ND incipiente, longe ainda de provocar qualquer repercussão funcional significativa.

Em resumo, o presente estudo indica ser possível, mediante tratamento com um BAT-1, a reversão da expansão mesangial no modelo de ND pós-indução de DM com STZ. No entanto, tal regressão é mais difícil quando consideramos lesões glomerulares mais avançadas, como aquelas associadas à formação de sinéquias com a cápsula de Bowman. Essa reversão parece depender da recuperação funcional de células glomerulares, como os podócitos. O tratamento com doses mais altas de L não proporcionou vantagem terapêutica em relação à dose convencional, talvez devido à ausência, nessa fase relativamente incipiente, de lesões intersticiais e, presumivelmente, de expressão intersticial intensa do receptor AT-1. Esses resultados fortalecem ainda o conceito de que é imperioso tratar agressivamente a ND, mesmo em suas fases incipientes, quando ainda é elevada a possibilidade de reverter a expansão mesangial, impedir a progressão de lesões avançadas e preservar ao máximo a função renal.

CONCLUSÕES

1. O tratamento com losartan apresentou efeito protetor contra o desenvolvimento da nefropatia diabética nesse modelo.
2. A dose alta de losartan não foi mais benéfica do que a dose convencional na proteção das lesões renais nesse modelo de nefropatia diabética.
3. O tratamento com losartan foi capaz de regredir a expansão mesangial, porém não reverteu áreas de glomerulosclerose com sinéquias nesse modelo de ND.

ANEXOS



^a $p < 0,05$ vs CN

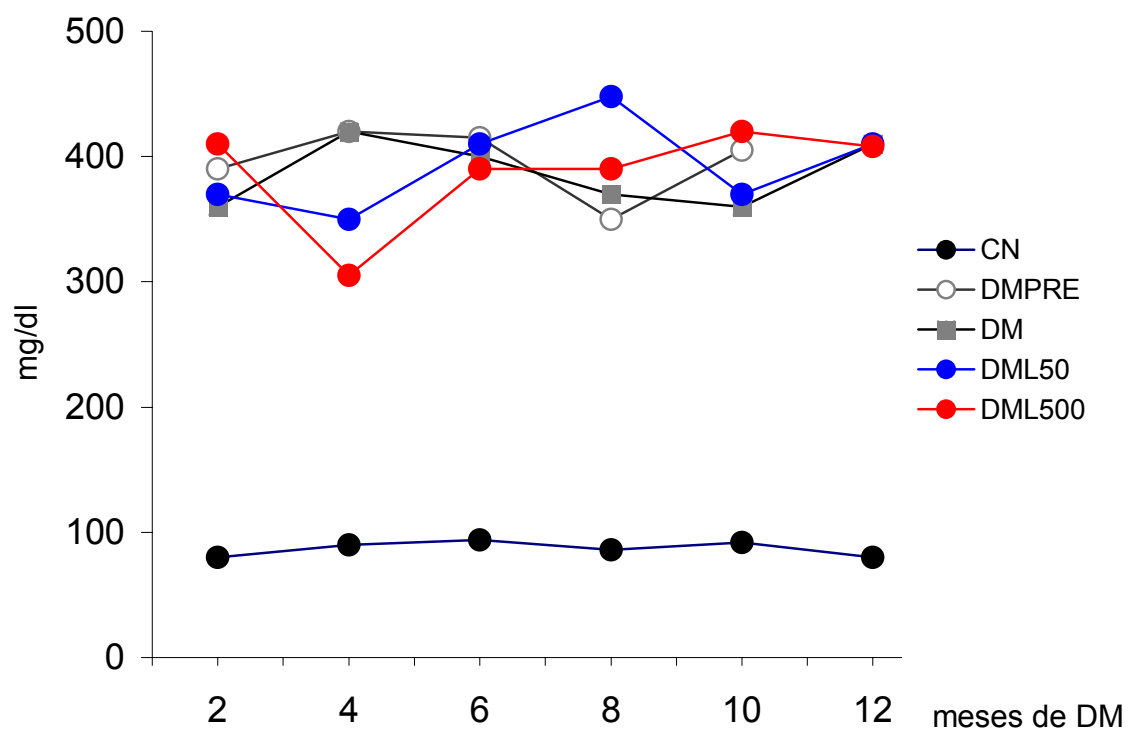
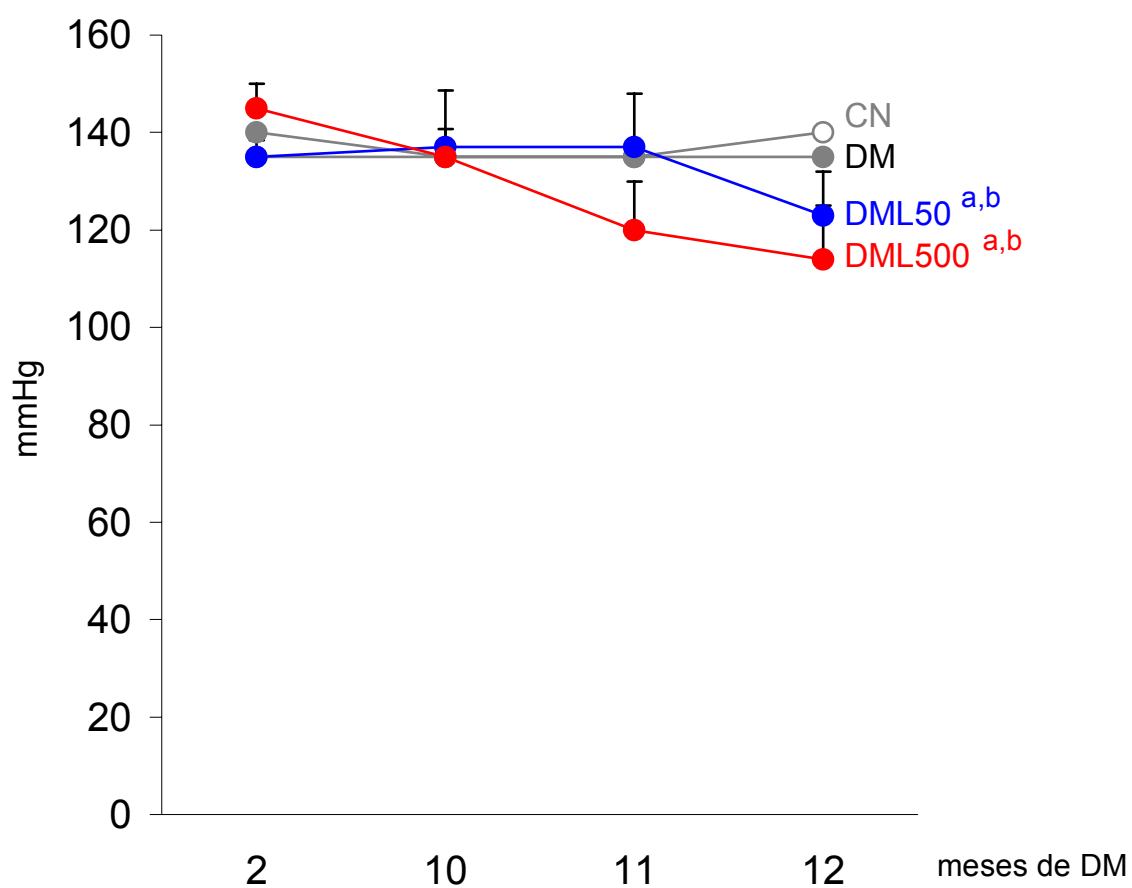
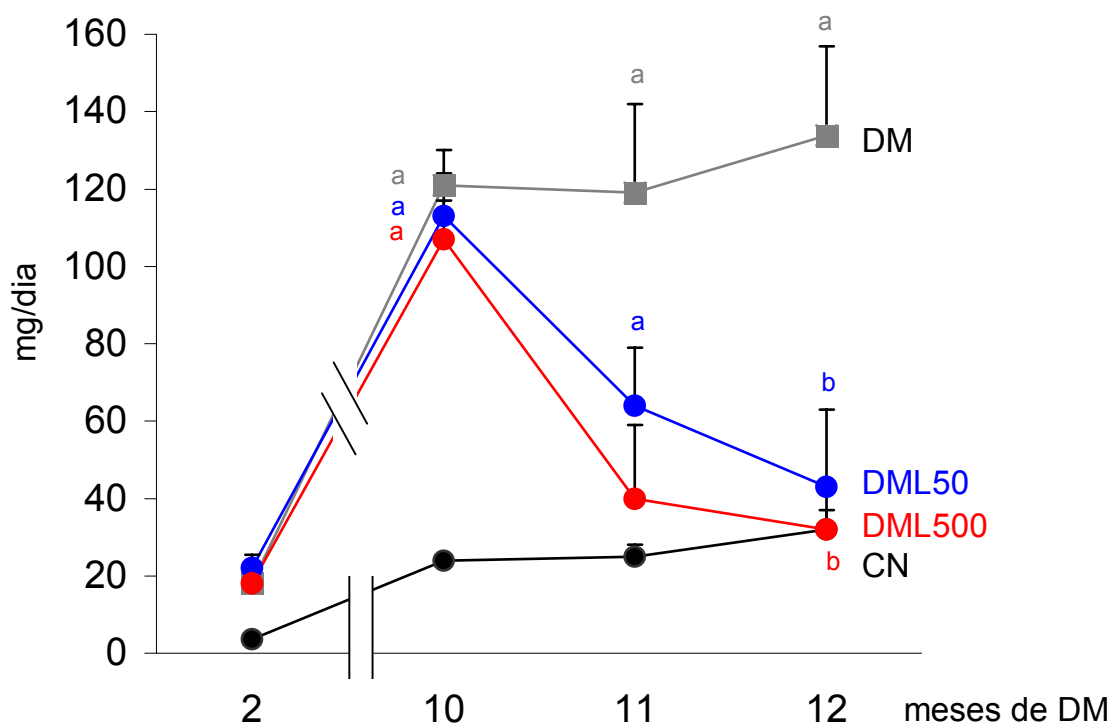
Figura 2 - Glicemia

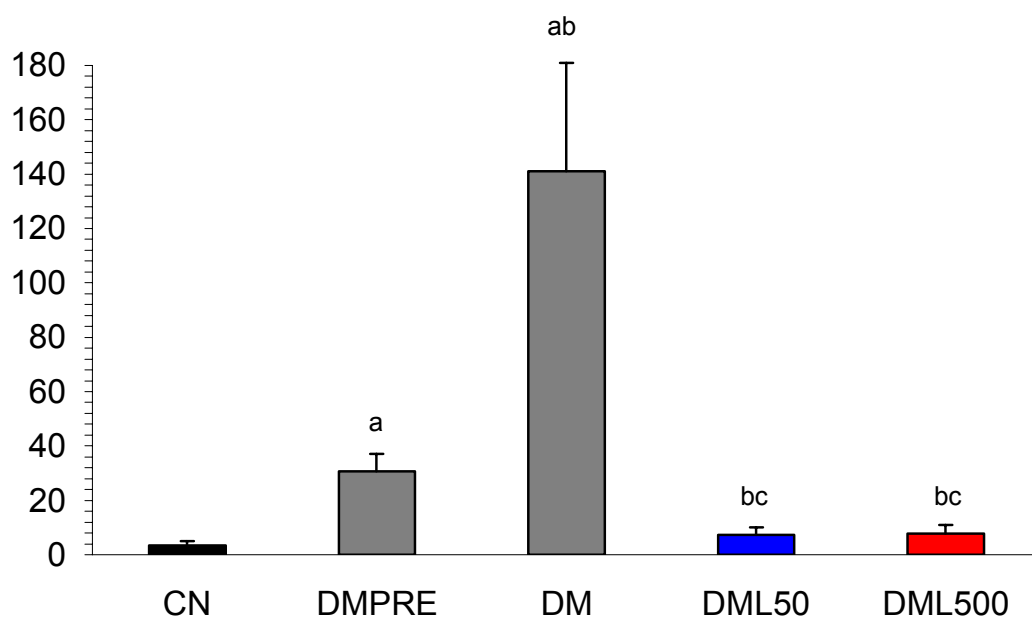
Figura 3 - Pressão caudal

^a $p < 0,05$ vs CN; ^b $p < 0,05$ vs DM

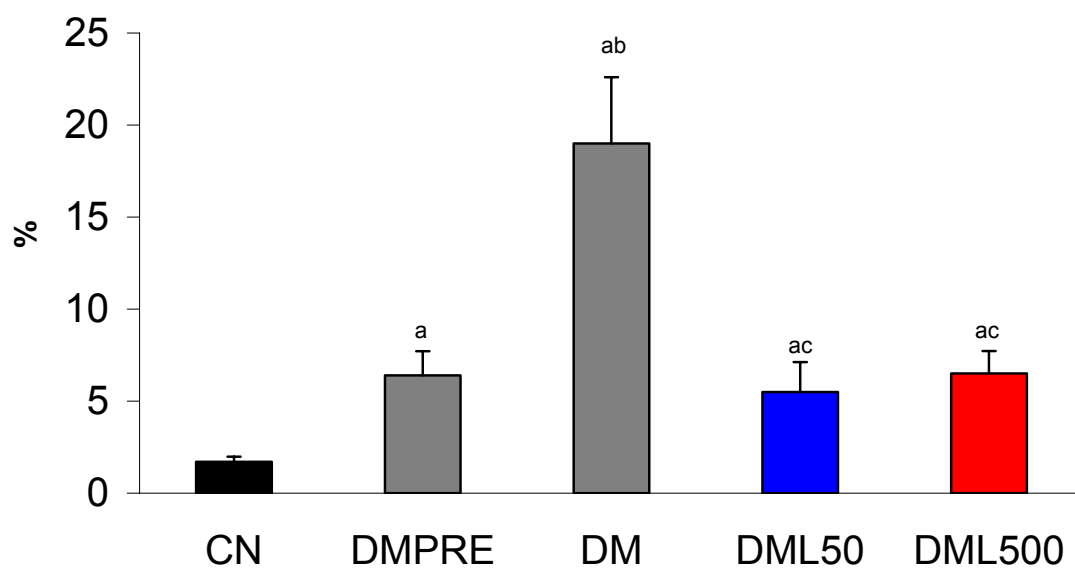
Figura 4 - Albuminúria



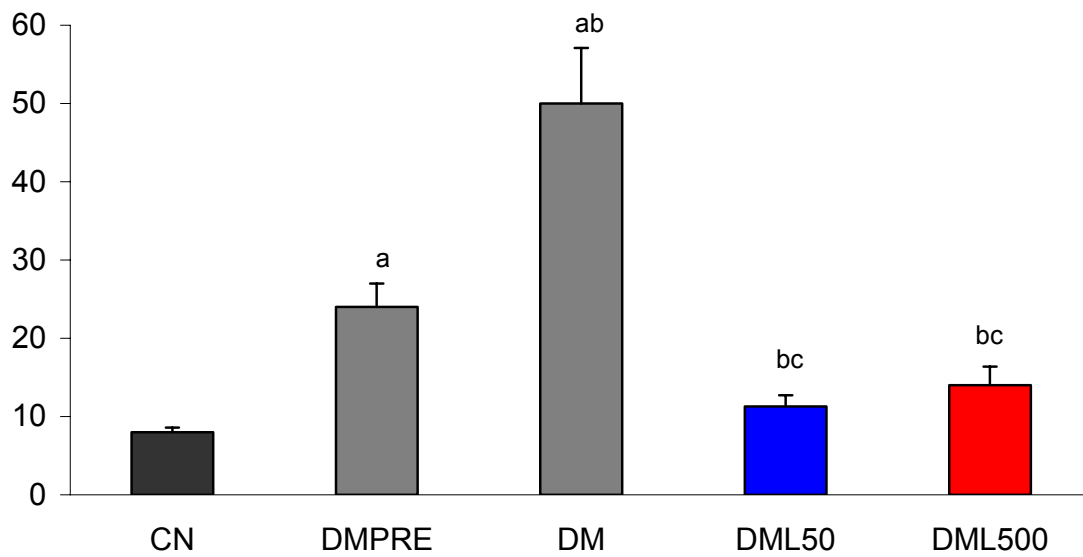
^a $p < 0,05$ vs CN; ^b $p < 0,05$ vs DM

Figura 5 - Expansão Mesangial

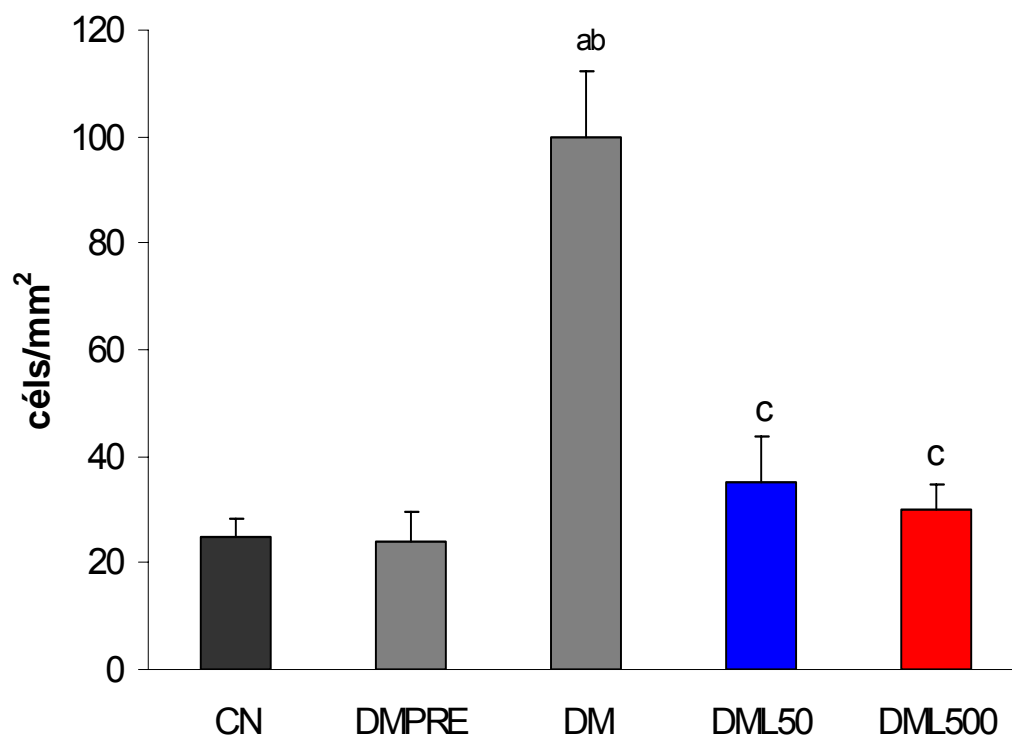
^a $p < 0,05$ vs CN; ^b $p < 0,05$ vs DMPRE, ^c $p < 0,05$ vs DM

Figura 6 - % Esclerose glomerular

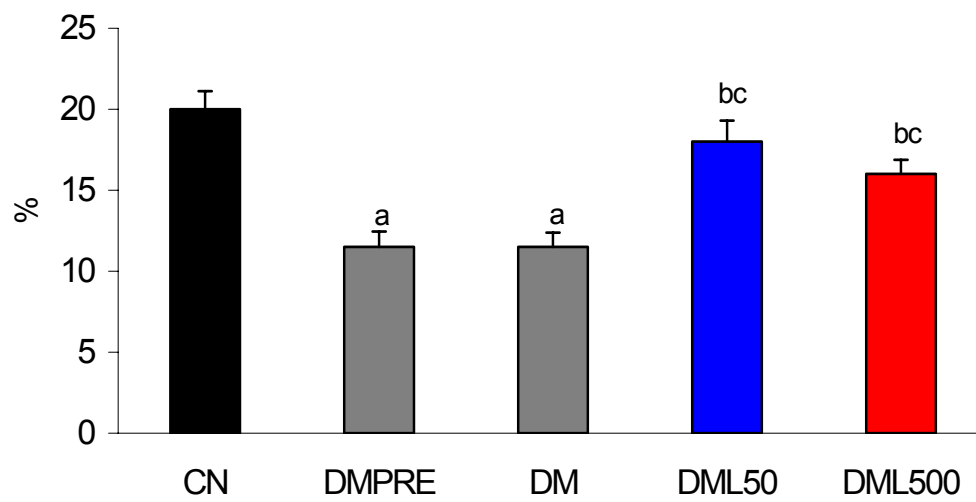
^a $p < 0,05$ vs CN; ^b $p < 0,05$ vs DMPRE, ^c $p < 0,05$ vs DM

Figura 7 - Índice de esclerose glomerular

^a $p < 0,05$ vs CN; ^b $p < 0,05$ vs DMPRE; ^c $p < 0,05$ vs DM

Figura 8 - Macrófagos

^a $p < 0,05$ vs CN; ^b $p < 0,05$ vs DMPRE, ^c $p < 0,05$ vs DM

Figura 9 - Vimentina glomerular

^a $p < 0,05$ vs CN; ^b $p < 0,05$ vs DMPRE, ^c $p < 0,05$ vs DM

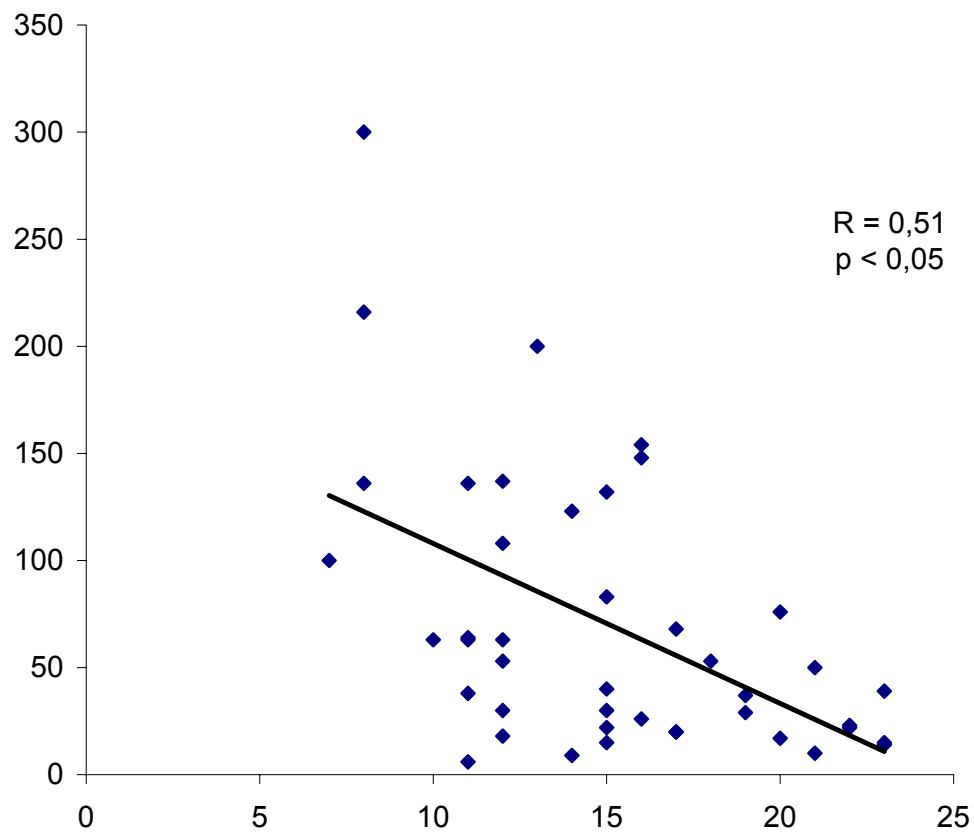
Figura 10 - Correlação entre vimentina e U_{alb} 

Figura 11

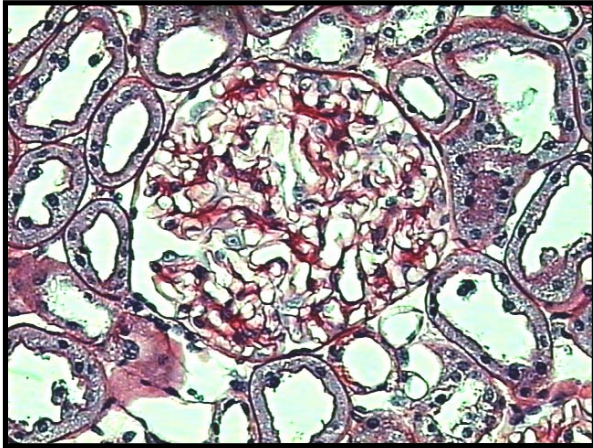


Figura 11A. Glomérulo de rato do grupo CN.
PAS, aumento de 200x

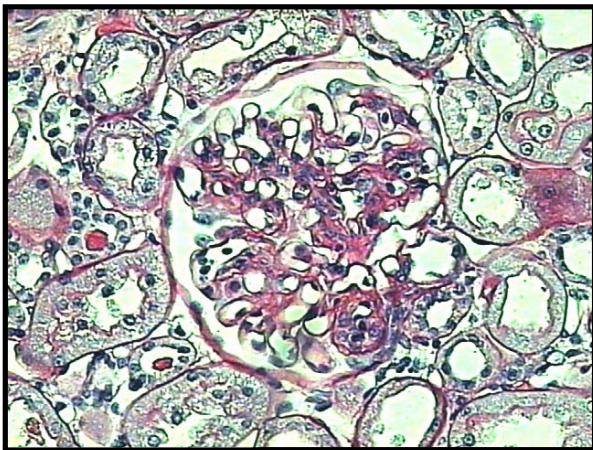


Figura 11B. Glomérulo de rato do grupo DMPRE (10 meses de DM).
PAS, aumento de 200x

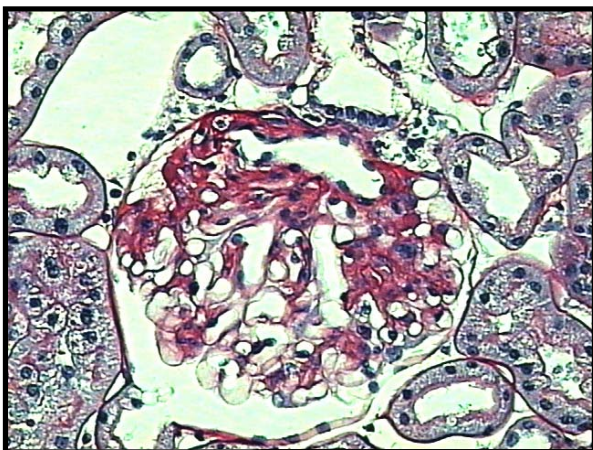
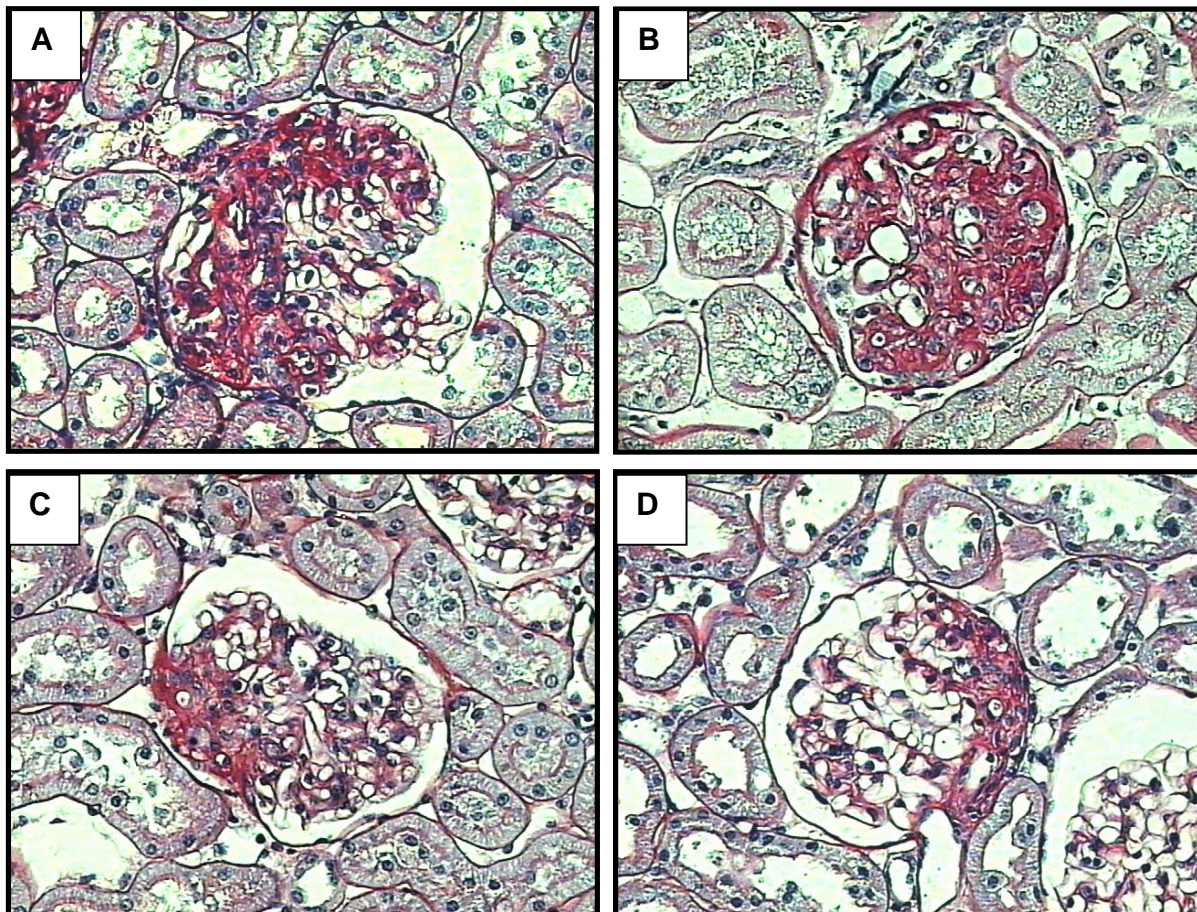


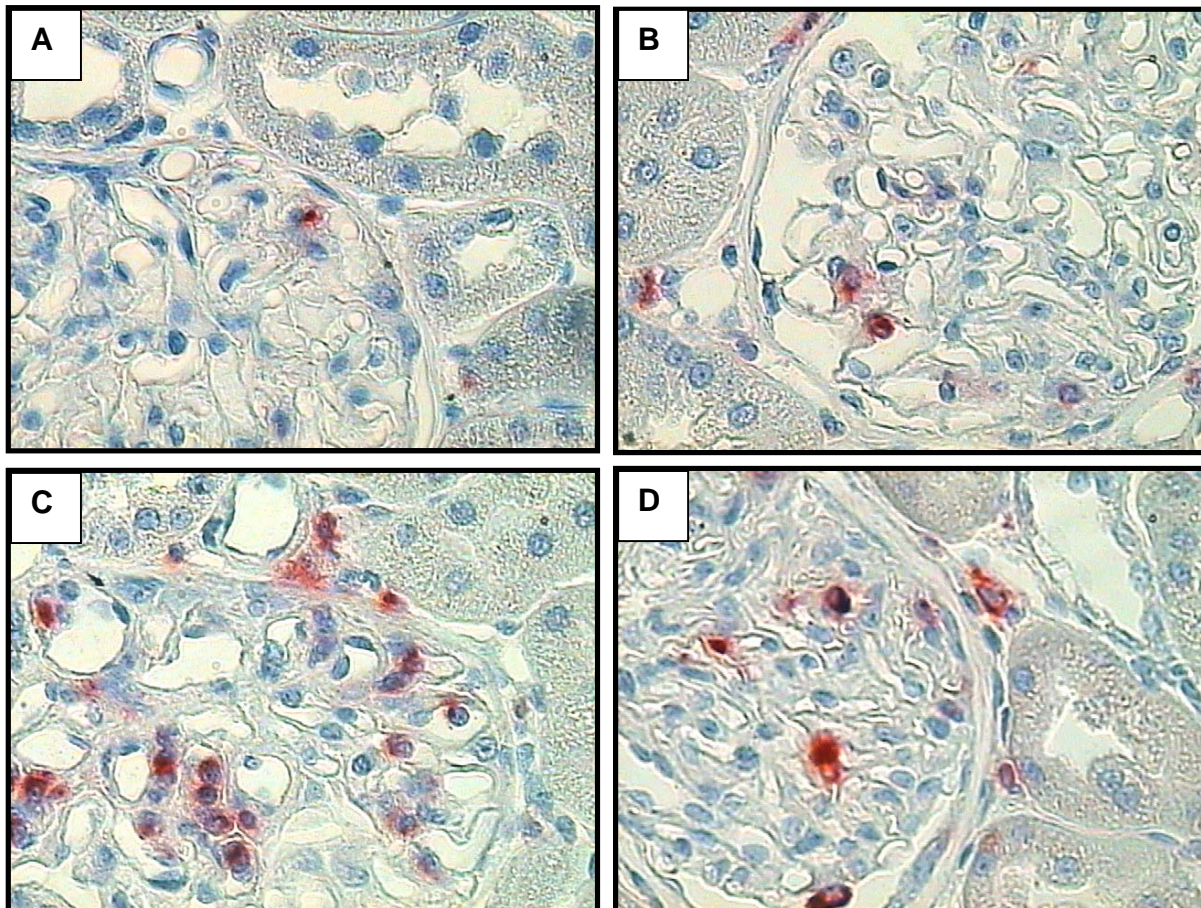
Figura 11C. Glomérulo de rato do grupo DM (12 meses de DM).
PAS, aumento de 200x

Figura 12



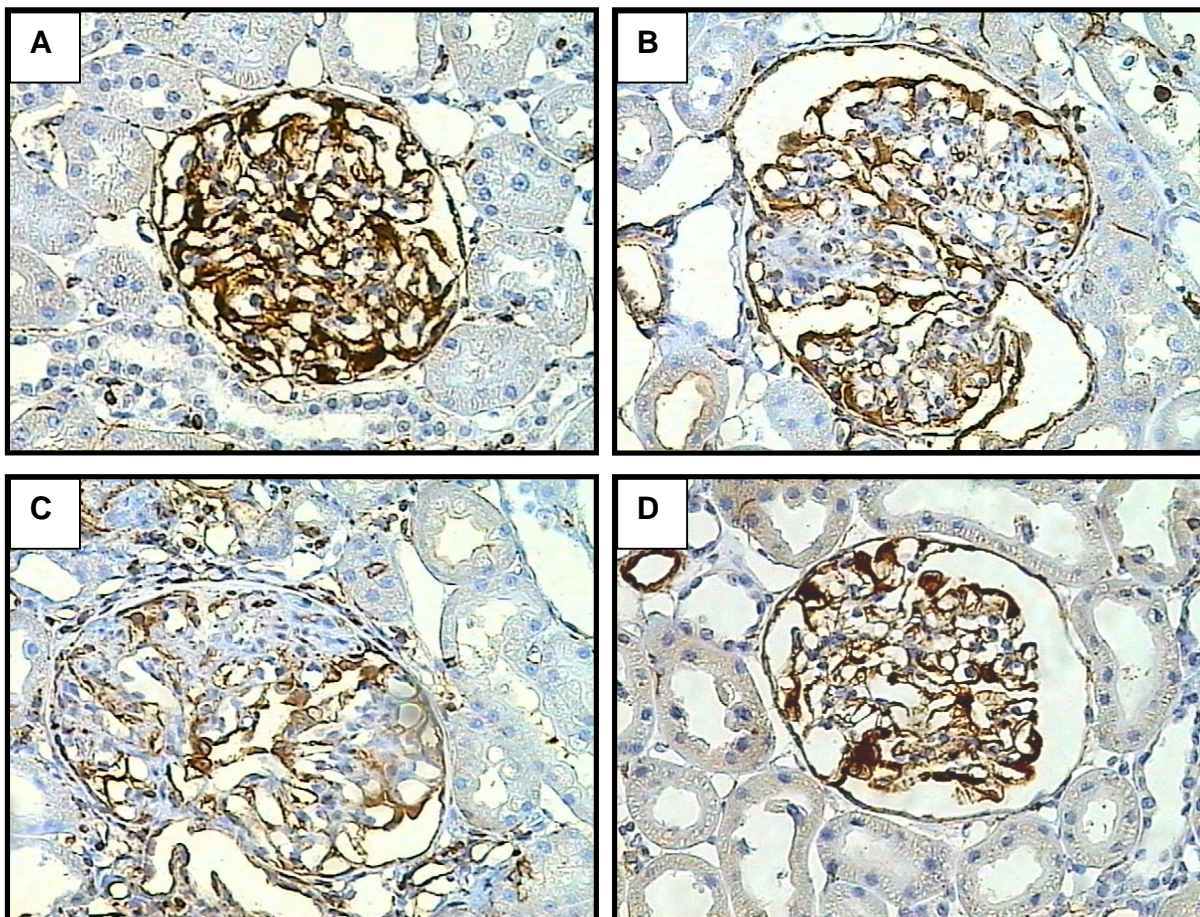
A) glomérulo de rato do grupo DMPRE demonstrando área de glomeruloesclerose com adesão à cápsula de Bowman (sinéquia); B) glomérulo de rato do grupo DM demonstrando progressão da glomerulosclerose; C) e D) glomérulos de ratos dos grupos DML50 e DML500, respectivamente, demonstrando redução no grau da lesão glomerular, porém com manutenção da área de sinéquia.

Figura 13



Imuno-histoquímica para células ED-1 positivas. A) glomérulo de rato do grupo CN; B) glomérulo de rato do grupo DMPRE (10 meses de DM); C) glomérulo do rato DM (12 meses de DM); D) glomérulo de rato tratado com losartan (60 dias pós-tratamento). Tecido renal em parafina. Aumento de 400X.

Figura 14



Imuno-histoquímica para vimentina. A) glomérulo de rato do grupo CN; B) glomérulo de rato do grupo DMPRE (10 meses de DM); C) glomérulo do rato DM (12 meses de DM); D) glomérulo de rato tratado com losartan (60 dias pós-tratamento). Tecido renal em parafina. Aumento de 200X.

Tabela 1: Peso corpóreo

	ZERO	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
CN (n=12)	232 ± 3	339 ± 9	394 ± 6	404 ± 6	415 ± 10	417 ± 10	419 ± 10
DMPRE (n=10)	234 ± 4	289 ± 9 ^a	311 ± 6 ^a	326 ± 7 ^a	341 ± 7 ^a	345 ± 8 ^a	—
DM (n=8)	236 ± 3	293 ± 8 ^a	316 ± 8 ^a	327 ± 7 ^a	342 ± 8 ^a	347 ± 8 ^a	350 ± 9 ^a
DML50 (n=11)	241 ± 6	300 ± 6 ^a	319 ± 6 ^a	332 ± 5 ^a	341 ± 4 ^a	346 ± 5 ^a	345 ± 8 ^a
DML500 (n=12)	241 ± 3	305 ± 5 ^a	324 ± 5 ^a	335 ± 6 ^a	346 ± 3 ^a	357 ± 3 ^a	354 ± 10 ^a

Valores expressos em gramas. ^a p < 0,05 vs. CN.

Tabela 2: Glicemia

	ZERO	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
CN (n=12)	80 ± 6	90 ± 8	94 ± 2	86 ± 8	92 ± 4	80 ± 2	90 ± 7
DMPRE (n=10)	390 ± 16 ^a	420 ± 18 ^a	415 ± 18 ^a	326 ± 20 ^a	405 ± 16 ^a	360 ± 18 ^a	—
DM (n=8)	360 ± 12 ^a	420 ± 20 ^a	400 ± 15 ^a	370 ± 15 ^a	360 ± 18 ^a	410 ± 16 ^a	430 ± 16 ^a
DML50 (n=11)	370 ± 15 ^a	350 ± 16 ^a	410 ± 19 ^a	448 ± 14 ^a	370 ± 20 ^a	410 ± 15 ^a	396 ± 18 ^a
DML500 (n=12)	410 ± 18 ^a	305 ± 15 ^a	390 ± 16 ^a	390 ± 12 ^a	420 ± 17 ^a	408 ± 19 ^a	390 ± 15 ^a

Valores expressos em mg/dl. ^a p < 0,05 vs. CN.

Tabela 3: Pressão sistólica

	2 meses	10 meses	11 meses	12 meses
CN (n=12)	130 ± 1	135 ± 2	135 ± 5	140 ± 1
DMPRE (n=10)	130 ± 2	135 ± 2	—	—
DM (n=8)	135 ± 1	130 ± 2	135 ± 1	140 ± 3
DML50 (n=11)	130 ± 2	135 ± 1	130 ± 2	120 ± 4 ^{a,b}
DML500 (n=12)	130 ± 2	135 ± 2	125 ± 2	115 ± 4 ^{a,b}

Valores expressos em mmHg. ^a p < 0,05 vs CN; ^b p < 0,05 vs DM

Tabela 4: Albuminúria

	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	11meses	12 meses
CN (n=12)	4 ± 1	5 ± 1	8 ± 1	16 ± 2	24 ± 3	30 ± 5	35 ± 3
DMPRE (n=10)	9 ± 2	16 ± 3 ^a	32 ± 4 ^a	65 ± 11 ^a	112 ± 15 ^a	—	—
DM (n=8)	11 ± 2	18 ± 3 ^a	34 ± 3 ^a	54 ± 8 ^a	114 ± 20 ^a	120 ± 20 ^a	131 ± 22 ^a
DML50 (n=11)	12 ± 1	22 ± 3 ^a	36 ± 9 ^a	63 ± 8 ^a	114 ± 15 ^a	64 ± 20 ^a	40 ± 10 ^{b,c}
DML500 (n=12)	10 ± 1	18 ± 4 ^a	33 ± 4 ^a	76 ± 10 ^a	113 ± 18 ^a	46 ± 12 ^{b,c}	35 ± 10 ^{b,c}

Valores expressos em mg/dia. ^a p < 0,05 vs CN; ^b p < 0,05 vs DMPRE; ^c p < 0,05 vs DM.

Tabela 5: Índice de expansão mesangial, porcentagem de esclerose glomerular, índice de esclerose glomerular, porcentagem de Interstício, infiltração de macrófagos e expressão de vimentina glomerular ao final do período de observação (10 meses após indução de DM para o grupo DMPRE e 12 meses após indução de DM para os demais grupos).

	IEM	%EG	IEG	INT (%)	Mϕ célis/mm ²	Vim (%)
CN (n=12)	3 \pm 1	2 \pm 0,3	8 \pm 1	1 \pm 0,1	25 \pm 3	20 \pm 1
DMPRE (n=10)	31 \pm 6 ^a	6 \pm 1,0 ^a	24 \pm 3 ^a	1 \pm 0,1	24 \pm 5	11 \pm 1 ^a
DM (n=8)	141 \pm 40 ^{a,b}	19 \pm 3,0 ^{a,b}	50 \pm 7 ^{a,b}	2 \pm 1,0	100 \pm 12 ^{a,b}	11 \pm 1 ^a
DML50 (n=11)	7 \pm 3 ^{b,c}	5 \pm 2,0 ^c	11 \pm 1 ^{b,c}	1 \pm 0,3	35 \pm 9 ^c	18 \pm 1 ^{b,c}
DML500 (n=12)	8 \pm 3 ^{b,c}	6 \pm 1,0 ^c	14 \pm 2 ^{b,c}	1 \pm 0,2	29 \pm 5 ^c	16 \pm 1 ^{b,c}

Os valores são expressos em média \pm erro padrão. IEM, índice de expansão mesangial; %EG, porcentagem de esclerose glomerular; IEG, índice de esclerose glomerular, INT, área fracional do interstício; M ϕ , intensidade de infiltração macrofágica; Vim, expressão glomerular de vimentina. ^a p < 0,05 vs grupo CN; ^b p < 0,05 vs grupo DMPRE; ^c p < 0,05 vs grupo DM.

Tabela 6: Creatinina, potássio e aldosterona ao final do período de observação (10 meses após indução de DM para o grupo DMPRE e 12 meses após indução de DM para os demais grupos).

	Creatinina (mg/dl)	Potássio (meq/l)	Aldosterona (pg/dl)
CN (n=12)	1,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	488 ± 75
DMPRE (n=10)	0,8 ± 0,1	5,0 ± 0,2	659 ± 120
DM (n=8)	1,0 ± 0,1	5,5 ± 0,2	971 ± 141 ^a
DML50 (n=11)	1,0 ± 0,1	5,5 ± 0,2	507 ± 81 ^b
DML500 (n=12)	0,8 ± 0,1	5,5 ± 0,1	524 ± 84 ^b

^a p < 0,05 vs CN; ^b p < 0,05 vs DM.

REFERÊNCIAS

ADAMCZAK M, GROSS ML, KRTIL J, KOCH A, TYRALLA K, AMANN K, RITZ E. Reversal of glomerulosclerosis after high-dose enalapril treatment in subtotally nephrectomized rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14:2833-42.

ANDERSON S, MEYER TW, RENNKE HG, BRENNER BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J. Clin. Invest.* 1985;76:612-9.

ANDERSON S, RENNKE HG, BRENNER BM. Nifedipine versus fosinopril in uninephrectomized diabetic rats. *Kidney Int.* 1992;41:891-7.

ARANDA P, SEGURA J, RUILOPE LM, ARANDA FJ, FRUTAS MA, LÓPEZ V, LOPEZ DE NOVALES E. Long-term renoprotective effects of standard versus high doses of telmisartan in hypertensive nondiabetic nephropathies. *Am. J. Kidney Dis.* 2005;46:1074-79.

BALLERMANN BJ, SKOREEKI KL, BRENNER BM. Reduced glomerular angiotensin II receptor density in early untreated diabetes mellitus in the rat. *Am. J. Physiol.* 1984;247:F110-16.

BATISTA PB, LOPES AA, COSTA FA. Association between attributed cause of end-stage renal disease and risk of death in Brazilian patients receiving renal replacement therapy. *Ren Fail.* 2005;27:651-6.

BOFFA JJ, LU Y, PLACIER S, STEFANSKI A, DUSSAULE JC, CHATZIANTONIOU C. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: Role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14:1132-44.

BORDER WA, NOBLE NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998;31:181-8.

BRENNER BM, COOPER ME, DE ZEEUW D, KEANE WF, MITCH WE, PARVING HH, REMUZZI G, SNAPINN SM, ZHANG Z, SHAHINFAR S. RENAAL Study Investigators. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2001;345:861-9

BROWNLEE M, CERAMI A, VLASSARA H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complication. *N. Engl. J. Med.* 1988;318:1315-21.

BURNS KD. Angiotensin II and its receptor in diabetic kidney. *Am. J. Kidney Dis.* 2000;36:449-67.

CHENG HF, BURNS KV, HARRIS RC. Reduced proximal tubule angiotensin II receptor expression in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1994;46:1603-10.

CRUZADO JM, LLOBERAS N, TORRAS J, RIERA M, FILLAT C, HERRERO-FRESNEDA I, ARAN JM, ALPEROVICH G, VIDAL A, GRINYO JM. Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 2004;53:1119-27.

DCCT – THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N. Engl. J. Med.* 2000;342:381-9.

DEL PRETE D, ANGLANI F, FORINO M, CEOL M, FIORETTO P, NOSADINI R, BAGGIO B, GAMBARO G. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia* 1997;40:1449-54.

DI PAOLO S, GESUALDO L, RANIERI E, GRANDALIANO G, SCHEA FP. High glucose concentration induces the overexpression of transforming growth factor beta through the activation of a platelet-derived growth factor loop in human mesangial cells. *Am. J. Pathol.* 1996;149:2095-106.

ESSAWY M, SOYLEMEZOGLU O, MUCHANETA-KUBARA EC, SHORTLAND J, BROWN CB AND EL NAHAS AM. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997;12:43-50.

FIORETTO P, STEFFES MW, SUTHERLAND DE, MAUER M. Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int.* 1995;48:1929-35.

FIORETTO P, STEFFES MW, SUTHERLAND DE, GOETZ FC, MAUER M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1998;339:69-75.

FORBES JM, HEWITSON TD, BECKER GJ, JONES CL. Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney Int.* 2000;57:2375-85.

FRANKEN AA, DERKX FH, MAN INT VELD AJ, HOP WC, VAN RENS GH, PEPPERKAMP E , DE JONG PT, SCHALEKAMP MA. High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990;71:1008-15.

FUJIHARA CK, PADILHA RM, ZATZ R. Glomerular abnormalities in long-term experimental diabetes: Role of hemodynamic factors and effects of antihypertensive therapy. *Diabetes* 1992;41:286-93.

FUJIHARA CK, MALHEIROS DMAC, NORONHA IL, DE NUCCI G, ZATZ R. Mycophenolate mofetil reduces renal injury in the chronic nitric oxide synthase inhibition model. *Hypertension* 2001;37:170-5.

FUJIHARA CK, VELHO M, MALHEIROS DMAC, ZATZ R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney Int.* 2005;67:1913-24.

FURUTA T, SAITO T, OOTAKA T, SOMA J, OBARA K, ABE K, YOSHINAGA, K. The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney. Dis.* 1993;21:480-5.

GAO X, MAE H, AYABE N, TAKAI T, OSHIMA K, HATTORI M, UEKI T, FUJIMOTO J, TANIZAWA T. Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2002;62:1238-48.

GONÇALVES AR, FUJIHARA CK, MATTAR AL, MALHEIROS DM, NORONHA I DE L, DE NUCCI G, ZATZ R. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: Strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004;286:F945-54.

GREENE EL, KREN S, HOSTETTER TH. Role of aldosterona in remnant kidney model in the rat. *J. Clin. Invest.* 1996;98:1063-8.

GUPTA S, VERFAILLIE C, CHMIELEWSKI D, KIM Y, ROSEMBERG ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int.* 2002;62:1285-90.

HAN SY, JEE YH, HAN HK, KANG YS, KIM HK, HAN JY, KIM YS, CHA DR. An imbalance between matrix-metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006;21:2406-16.

HOSTETTER TH, TROY JL, BRENNER BM. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1981;19:410-15.

IGLESIAS-DE LA CRUZ MC, ZIYADEH FN, ISONO M, KOUAHOU M, HAN DC, KALLURI R, MUNDEL P, CHEN S. Effects of high glucose and TGF- β 1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int.* 2002;62:901-13.

KALE S, KARIHALLOO A, CLARK PR, KASHGARIAN M, KRAUSE DS, CANTLEY LG. Bone marrow stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J. Clin. Invest.* 2003;112:42-9.

KLIEM V, JOHNSON RJ, ALPERS CE, YOSHIMURA A, COUSER WG, KOCH KM, FLOEGE J. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* 1996;49:666-78.

KOMERS R, ALLEN TJ, COOPER ME. Role of endothelium-derived nitric oxide in the pathogenesis of the renal hemodynamic changes of experimental diabetes. *Diabetes* 1994;43:1190-7.

KRIZ W, GRETZ N, LEMLEY KV. Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit ? *Kidney Int.* 1998;54:687-97.

KRIZ W. The pathogenesis of classical focal glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003;18:vi39-44.

LEWIS EJ, HUNSICKER LG, BAIN RP, ROHDE RK. Collaborative Study Group. The effect of angiotensin-converting enzyme on diabetic nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 1993;329:1456-62.

LEWIS EJ, HUNSICKER LG, CLARKE WR, BERL T, POHL MA, LEWIS JB, RITZ E, ATKINS RC, ROHDE R, RAZ I. Collaborative Study Group. Renoprotective effect of the angiotensin receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2001;345:851-60.

MA LJ, NAKAMURA S, ALDIGIER JC, ROSSINI M, YANG H, LIANG X, NAKAMURA I, MARCANTONI C, FOGO AB. Regression of glomerulosclerosis with high-dose angiotensin inhibition is linked to decreased plasminogen activator inhibitor-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16:966-76.

MANCINI GAO, CARBONARO JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965;2:235-54.

MCLENNAN SV, KELLY DJ, COX AJ, CAO Z, LYONS JG, YUE DK, GILBERT RE. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy. Effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 2002;45:268-75.

MIZUNO S, KUROSAWA T, MATSUMOTO K, MIZUNO-HORIKAWA Y, OKAMOTO M, NAKAMURA T. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J. Clin. Invest.* 1998;101:1827-34.

MOGENSEN CE. Glomerular filtration rate and renal plasma flow in long-term juvenile diabetics without proteinuria. *Br. Med. J.* 1972;2:257-9.

MOGENSEN CE, CHRISTENSEN CK, VITHINGHUS E. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983;32:64-78.

MUTSAERS SE, BISHOP JE, MCGROUTHER G, LAURENT GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997;29:5-17.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. DOQI 2000. Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. [on-line]. Available in: <http://www.kidney.org/professionals>.

NERLICH A, SCHLEICHER E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am. J. Pathol.* 1991;139:889-99.

NICHOLAS SB, AGUINIGA E, REN Y, KIM J, WONG J, GOVINDARAJAN N, NODA M, WANG W, KAWANO Y, COLLINS A, HSUEH WA. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency retards diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2005;67:1297-307.

NG YY, HUANG TP, YANG WC, CHEN ZP, YANG AH, MU W, NIKOLIC-PATERSON DJ, ATKINS RC, LAN HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* 1998;54:864-76.

OHKUBO Y, KISHIKAWA H, ARAKI E, MIYATA T, ISAMI S, MOTOYOSHI S, KOJIMA Y, FURUYOSHI N, SHICHIRI M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-

insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-years study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1995;28:103-17.

PARVING HH, LEHNERT H, BROCHNER-MORTENSEN J, GOMIS R, ANDERSEN S, ARNER P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2001;345:870-8.

PERICO N, BENIGNI A, GABANELLI M, PICCINELLI A, ROG M, DE RIVA C, REMUZZI G. Atrial natriuretic peptide and prostacyclin synergistically mediate hyperfiltration and hyperperfusion of diabetic rats. *Diabetes* 1992;41:533-8.

PERKINS BA, FICOCIELLO LH, OSTRANDER BE, SILVA KH, WEINBERG J, WARRAM JH, KROLEWSKI AS. Microalbuminuria and the risk of early progressive renal function decline in type 1 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;18:1353-61.

POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K, RYAN E, WYLES S, NAVARATNARASAH S, JEFERRY R, HUNT T, ALLISON M, COOK T, PUSEY C, WRIGHT NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J. Pathol.* 2001;195:229-35.

RAZZAQUE MS, KOJI T, TAGUCHI T, HARADA T, NAMANE PK. In situ localization of type III and type IV collagen-expressing cells in human diabetic nephropathy. *J. Pathol.* 1994;174:131-38.

REMUZZI A, PERICO N, AMUCHASTEGUI CS, MALANCHINI B, MAZERSKA M, BATTAGLIA C, BERTANI T, REMUZZI G. Short and long-term effect of angiotensin II receptor blockade in rats with experimental diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993;4:40-9.

REMUZZI A, GAGLIARDINI E, DONADONI C, FASSI A, SANGALLI F, LEPRE MS, REMUZZI G, BENIGNI A. Effect of angiotensin II antagonism on the regression of kidney disease in the rat. *Kidney Int.* 2002;62:885-94.

ROSSING K, SCHOEDT KJ, JENSEN BR, BOOMSMA F, PARVING HH. Enhanced renoprotective effects of ultrahigh doses of irbesartan in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Kidney Int.* 2006;68:1190-8.

RUGGENENTI P, PERNA A, GHERARDI G, GASPARI F, BENINI R, REMUZZI G. Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term ramipril: REIN follow-up trial. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). Ramipril Efficacy in Nephropaty. *Lancet* 1998;352:1252-6.

SCHJOEDT KJ, ROSSING K, JUHI TR, BOOMSMA F, ROSSING P, TARNOW L, PARVING HH. Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2005;68:2829-36.

SHANKLAND SJ, LY H, THAI K, SCHOLEY JW. Glomerular expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) in normal and diabetic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996;7:97-104.

SINGH R, ALAVI N, SINGH AK, LEEHEY DJ. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes* 1999;48:2066-73.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. [on line]. Censo 2006 para tratamento dialítico crônico. Disponível em: <http://www.sbn.org.br>.

STACK AG, BLOEMBERGEN WE. Prevalence and clinical correlates of coronary artery disease among new dialysis patients in the United States: A cross-sectional study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001;12:1516-23.

STEFFES MW, OSTERBY R, CHAVERS B, MAUER SM. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes* 1989;38:1077-81.

STOKES MB, HOLLER S, CUI Y, HUDKINS KL, EITNER F, FOGO A, ALPERS CE. Expression of decorin, biglycan and collagen type I in human renal fibrosing disease. *Kidney Int.* 2000;57:487-98.

SUZUKI D, MIYAZAKI M, JINDE K, KOJI T, YAGAME M, ENDO M, NOMOTO Y, SAKAI H. In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1997;52:111-19.

TANJI N, MARKOWITZ GS, FU C, KISLINGER T, TAGUCHI A, PISCHETSRIEDER M, STEM D, SCHMIDT AM, D'AGATI VD. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;11:1656-66.

USRD. Annual Data Report. Incidence and Prevalence, 2001. *Am. J. Kidney Dis.* 2001;38:S37-52.

UTIMURA R, FUJIHARA CK, MATTAR AL, MALHEIROS DMAC, NORONHA IL, ZATZ R. Mychophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 2003;63:209-16.

VALLON V, WEAD LM, BLANTZ RC. Renal hemodynamics and plasma and kidney angiotensin II in established diabetes mellitus in rats: Effect of sodium and salt restriction. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5:1761-67.

VAN DYK DJ, ERMAN A, ERMAN T, CHEN-GAL B, SULKES J, BONER G. Increased serum angiotensin converting enzyme activity in type 1 insulin dependent diabetes mellitus: Its relation to metabolic control and diabetic complications. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994;24:463-67.

VAN VLIET A, BAELDE HJ, VLEMING LJ, DE HEER E, BRUIJN JA. Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J. Pathol.* 2001;193:256-62.

WALLENSTEIN, S; ZUCKER, CL; FLEISS, J.L. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.* 1980;47:1-9.

WEIGERT C, BRODBECK K, KLOPFER K, HARING HU, SCHLEICHER ED. Angiotensin II induces human TGF- β 1 promoter activation: similarity to hyperglycemia. *Diabetologia* 2002;45:889-98.

WOLF G, ZIYADEH FN. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy. Emphasis on nonhemodynamic mechanisms. *Am. J. Kidney Dis.* 1997;29:153-63.

ZATZ R, DUNN BR, MEYER TW, ANDERSON S, RENNKE HG, BRENNER BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J. Clin. Invest.* 1986;77:1925-30.

ZATZ R. A low-cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Anim. Sci.* 1990;40:198-201.

ZIYADEH FN, SHARMA K, ERICKSEN M, WOLF G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J. Clin. Invest.* 1994;93:536-42.

ZIYADEH FN, HOFFMAN BB, HAN DC, IGLESIAS-DE LA CRUZ MC, HONG SW, ISONO M, CHEN S, MCGOWAN TA, SHARMA K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 2000;97:8015-20.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)