

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

EMERSON NUNES COSTA

**EFEITOS DO BLOQUEIO TRIPLO EXPERIMENTAL DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NO DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA
DIABÉTICA**

UBERLÂNDIA - MG

2013

EMERSON NUNES COSTA

**EFEITOS DO BLOQUEIO TRIPLO EXPERIMENTAL DO SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NO DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA
DIABÉTICA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia, como requisito
parcial à obtenção do título de mestre em Biologia
Celular e Estrutural Aplicadas**

**Área de Concentração: Mecanismos de Reparo e
Plasticidade Tecidual**

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva

UBERLÂNDIA-MG

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837e Costa, Emerson Nunes, 1973-
2013 Efeitos do bloqueio triplo experimental do sistema renina-angiotensina-aldosterona no desenvolvimento da nefropatia diabética / Emerson Nunes Costa. -- 2013.
57 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Coelho Balbi.

Coorientador: Luiz Borges Bispo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Rins - Doenças - Teses. I. Balbi, Ana Paula Coelho. II. Silva, Luiz Borges Bispo da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

A minha Esposa Cláudia e aos meus Filhos Silvio, Otávio e Pedro, pelo carinho, força e compreensão.

Ao meu Pai José Eustáquio (*in memoriam*) e minha Mãe Margareth, pela maior contribuição, que independente das dificuldades, sempre me disponibilizaram e incentivaram - o estudo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi pela brilhante e inestimável orientação deste trabalho e sua grandiosa compreensão e companheirismo nas adversidades ocorridas.

Ao Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva pela ilustre colaboração, já iniciada na entrevista classificatória do mestrado, e sua disponibilidade ao ensino do manejo e abordagem cirúrgica dos animais.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Moreira da Silva pela valiosa colaboração na análise histológica.

Aos funcionários da ARFIS e Laboratório de Histologia e aos alunos de Iniciação Científica – Richarlisson Borges de Moraes, Nathane França Silva e Natácia Oliveira (orientados pela Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi) - pelo auxílio no manejo e cuidados com os animais e no preparo do material para análise.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti e ao Prof. Dr. Marcus Vínicius de Pádua Netto pelo exemplo profissional dado nestes anos de amizade.

“Não considere que a vida seja um assunto resolvido, roteiro sem improvisação, plano preestabelecido que bastaria ser executado mecanicamente. Pelo contrário, ela tem que ser construída, uma estátua a ser esculpida, uma glória a ser estabelecida”

Roger-Pol Droit, filósofo francês

RESUMO

O Diabetes Melito (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas, com hiperglicemia resultante de defeitos na secreção (DM1) e/ou ação (DM2) da insulina, promovendo a elevação das taxas glicêmicas, que pode lesionar órgãos-alvo (olhos, rins, nervos ou coração). Nos rins manifesta-se como a nefropatia diabética (ND), caracterizada pelos níveis aumentados de excreção urinária de albumina (EUA), que poderá evoluir até a insuficiência renal crônica terminal, dialítica. O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) é um importante mediador das alterações fisiopatológicas da ND. O bloqueio farmacológico deste sistema tem-se mostrado como um aliado ao tratamento da ND, diminuindo a EUA. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do bloqueio triplo do SRAA na estrutura e função renais, bem como na proteinúria, de ratos Wistar diabéticos com ND em desenvolvimento. A indução do diabetes nos ratos foi feita com a administração intravenosa de aloxano (50mg/Kg) diluída em solução salina 0,9% e a glicemia verificada 12h, 24h e 48h após a indução do diabetes, animais com glicemia acima de 200mg/dL foram considerados diabéticos e divididos em 5 grupos: I) grupo controle – sem qualquer tratamento (CO); II) grupo experimental 1 – tratados com enalapril (EN) (iECA); III) grupo experimental 2 – tratados com losartan (LO) (BRA); IV) grupo experimental 3 – tratados com alisquireno (AL) (IR); V) grupo experimental 4 – tratados com iECA-BRA-IR (EN+LO+AL). Após 90 dias de tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina 24 horas e, posteriormente, de sangue para determinação da proteinúria e taxa de filtração glomerular, através do clearance de creatinina. Em seguida, os animais foram anestesiados e tiveram seus rins retirados para estudos histológicos e imunohistoquímicos. Os animais de todos os grupos se apresentaram hiperglicêmicos após a indução e as glicemias se mantiveram elevadas durante todo o tempo de tratamento. A histologia mostrou no CO a deposição de colágeno glomerular e tubulointersticial, dilatação tubular, expansão do espaço capsular e presença de infiltrado inflamatório, alterações que foram atenuadas pelos tratamentos com EN, LO, AL e EN+LO+AL. Os tratamentos reduziram a expressão de α -SMA glomerular (EN $p<0,01$; LO $p<0,01$; AL $p<0,05$; EN+LO+AL $p<0,01$) e tubulointersticial (EN $p<0,05$; AL $p<0,01$; EN+LO+AL $p<0,05$) quando comparados ao CO. Não houve diferenças significativas no número de células PCNA glomerulares positivas e nas análises das concentrações plasmáticas de sódio, potássio e uréia entre os grupos; entretanto, EN e LO preservaram o maior número de células em proliferação tubulointersticial. Os ratos tratados com AL ($p<0,05$) e EN+LO+AL ($p<0,05$) tiveram uma maior taxa de filtração glomerular, quando comparados ao CO, EN e LO. AL e EN+LO+AL reduziram significativamente a proteinúria desses animais, quando comparados ao CO ($p<0,01$). O tratamento com EN+LO+AL reduziu a expressão de α -SMA glomerular e tubulointersticial, além de preservar um maior número de glomérulos, função renal e EUA, comuns nos quadros de ND. No entanto, a administração de AL resultou em dados semelhantes.

ABSTRACT

The Diabetes Mellitus (DM) is a group of metabolic diseases, with hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion (type 1 DM) and / or action (type 2 DM), promoting the elevation of blood glucose levels, which can damage target organs (eyes, kidneys, nerves, heart). In the kidney presents as diabetic nephropathy (DN), characterized by increased levels of urinary albumin excretion (UAE), which could progress to end stage kidney disease. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is an important mediator of the pathophysiological changes of DN. The pharmacological blockade of this system has been shown as a combined treatment of DN, decreasing urinary albumin excretion. The aim of this study was to evaluate the effects of triple RAAS blockade on kidney structure and function, as well as albuminuria in diabetic Wistar rats with DN in development. Induction of diabetes in rats was performed with intravenous administration of alloxan (50mg/kg) diluted in 0.9% saline and glycemia observed 24h after the induction of diabetes; animals with blood glucose greater than 200 mg/dL were considered diabetic and were divided into 5 groups: I) control group - no treatment (CG); II) experimental group 1 - treated with enalapril (EN) (angiotensin converting enzyme inhibitor - ACEI), III) experimental group 2 - treated with losartan (LO) (angiotensin receptor blocker - ARB), IV) experimental group 3 - treated with aliskiren (AL) (direct renin inhibitor - DRI); V) experimental group 4 - treated with triple blockade ACEI-ARB-DRI (EN+LO+AL). After 90 days of treatment, animals were placed in metabolic cages to collect 24-hour urine and thereafter for determination of blood, proteinuria, and glomerular filtration rate by creatinine clearance. Then, the animals were anesthetized and had their kidneys removed for histological and immunohistochemical studies (α -SMA and PCNA). After induction, all animals that became diabetic, remained with high glycemic levels throughout the treatment period. Histology showed on CG glomerular collagen deposition and tubulointerstitial, tubular dilation, space capsule expansion and inflammatory infiltration; those changes were attenuated by treatments with EN, LO, AL and EN+LO+AL. The treatments reduced the expression of α -SMA glomerular (EN $p < 0.01$; LO $p < 0.01$; AL $p < 0.05$, EN+LO+AL $p < 0.01$) and tubulointerstitial (EN $p < 0.05$, AL $p < 0.01$, EN+LO+AL $p < 0.05$) compared to CG. There were no significant differences in the number of PCNA glomeruli positive cells and in the analysis of plasma concentrations of sodium, potassium and urea between groups. However, EN and LO preserved a largest number of proliferating tubulointerstitial cells. Rats treated with AL ($p < 0.05$) and EN+LO+AL ($p < 0.05$) had a higher glomerular filtration rate (GFR) when compared to CG, EN and LO. AL and EN+LO+AL significantly reduced proteinuria in these animals when compared to CG ($p < 0.01$). The treatment with EN+LO+AL reduced the expression of α -SMA glomerular and tubulointerstitial, preserved a greater number glomeruli, GRF and UAE. However, administration of AL resulted in similar data.

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Valores de albuminúria utilizados para o diagnóstico de ND	12
Tabela 2	Estágios da ND	13
Figura 1	Resumo dos mecanismos metabólicos e hemodinâmicos da lesão tecidual do DM	16
Figura 2	Esquema do sistema renina-angiotensina-aldosterona	18
Figura 3	Gráficos dos valores médios da glicemia apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) após a indução do DM e ao final dos tratamentos propostos	27
Figura 4	Gráfico dos valores médios de volume urinário de 24 horas eliminado pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	28
Figura 5	Gráfico da variação média de peso corporal apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	28
Tabela 3	Valores médios de glicemia, volume urinário de 24 horas e variação de peso corporal apresentados pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) após a indução do DM e ao final dos tratamentos propostos	29
Figura 6	Cortes de tecido renal corados com Tricrômico de Masson dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	30
Figura 7	Gráfico do número de glomérulos presentes por área de secção renal dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).	31
Figura 8	Gráfico da relação peso do rim/peso do corpo dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	31
Figura 9	Imunorreação para α -SMA no córtex renal de animais não-diabéticos e dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	32
Figura 10	Gráficos da quantificação da imunorreação de α -SMA glomerular e tubulointersticial no córtex renal dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	33
Figura 11	Imunorreação para PCNA no córtex renal de animais não-diabéticos e dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	34
Figura 12	Gráficos da quantificação do número de células PCNA positivas glomerular e tubulointersticial no córtex renal dos animais dos grupos	35

CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)

Tabela 4	Contagem do número de glomérulos, imunorreações para α -SMA e PCNA nos glomérulos e compartimento tubulointersticial do córtex renal e relação peso do rim/peso do corpo dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	35
Tabela 5	Dosagens das concentrações plasmáticas de sódio, potássio e uréia dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	36
Figura 13	Gráfico da dosagem plasmática de sódio apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	36
Figura 14	Gráfico da dosagem plasmática de potássio apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	37
Figura 15	Gráfico da dosagem plasmática de uréia apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	37
Figura 16	Gráfico da TFG apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	38
Figura 17	Gráfico da EUA média apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	39
Tabela 6	Determinação da TFG (mL/min) e EUA (mg/dL) dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL)	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS

AL	Grupo de Ratos Diabéticos em Uso de Alisquereno
AngII	Angiotensina II
BRA	Bloqueadores dos Receptores AT1 da Angiotensina II
CO	Grupo de Ratos Diabéticos Controle
DM	Diabetes Melito
DM1	Diabetes Melito tipo 1
DM2	Diabetes Melito tipo 2
DRC	Doença Renal Crônica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EN	Grupo de Ratos Diabéticos em Uso de Enalapril
EUA	Excreção Urinária de Albumina
iECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
IR	Inibidores Diretos da Renina
LO	Grupo de Ratos Diabéticos em Uso de Losartan
MEC	Matriz Extracelular
ND	Nefropatia Diabética
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin

SUMÁRIO

1) Introdução	12
2) Objetivos	22
3) Materiais e Métodos	23
4) Resultados	27
5) Discussão	40
6) Conclusão	45
7) Referências Bibliográficas	46

1) INTRODUÇÃO:

1.1) **Diabete Melito e Nefropatia Diabética:**

O Diabete Melito (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas, com uma hiperglicemia resultante de defeitos na produção e secreção da insulina (diabetes melito tipo 1 – DM1) e/ou ação da insulina (diabetes melito tipo 2 - DM2), sendo estes a maior prevalência dos casos (ADA, 2004). O DM1 é uma doença auto-imune caracterizada pela destruição das células beta produtoras de insulina, em que o organismo deixará de produzir insulina (ou apenas produzirá uma quantidade muito pequena), com elevação das taxas glicêmicas; o DM2 apresenta uma combinação de resistência à insulina nos tecidos periféricos (músculo, fígado, tecido adiposo) com uma deficiência relativa na produção deste hormônio. (DIB & CHACRA, 2007; ZECCHIN & SAAD, 2007)

Os critérios utilizados para diagnóstico de DM são: glicose plasmática de jejum maior que 126 mg/dL, em duas dosagens diferentes; glicose plasmática casual (colhida a qualquer hora do dia, independente de refeição) maior 200 mg/dL; glicose plasmática pós-sobrecarga com 75g de glicose maior que 200 mg/dL. (ADA, 2004)

A hiperglicemia, com o passar dos anos, pode afetar os órgãos do corpo, como vasos sanguíneos, olhos, rins, nervos e coração. (TURATTI & RODRIGUES, 2005)

Nos rins, suas complicações manifestam-se como a nefropatia diabética (ND), caracterizada por lesões estruturais e funcionais dos rins, com níveis aumentados de excreção urinária de albumina (EUA), progressivamente de microalbuminúria a macroalbuminúria, podendo evoluir até a insuficiência renal crônica terminal, sendo inclusive um preditor de mortalidade nestes pacientes. (OLUGBENGA et al, 2004; GROSS et al, 2005; SCHMID & BERTOLUCI, 2009; SILVEIRO et al, 2010; BERHANE et al, 2011)

Os valores laboratoriais para a albuminúria, de acordo com o método utilizado, são divididos conforme a tabela 1 (KIRSZTAJN & BARROS, 2010):

Tabela 1 - Valores de albuminúria utilizados para o diagnóstico de ND:

ESTÁGIO / MÉTODO	Urina 24h (mg/24h)	Índice albumina/creatinina amostra isolada (mg/g)	Urina com Tempo Marcado (µg/min)
Normoalbuminúria	< 30	< 30	< 20
Microalbuminúria	30 - 299	30 - 299	20 - 199
Macroalbuminúria	≥ 300	≥ 300	≥ 200

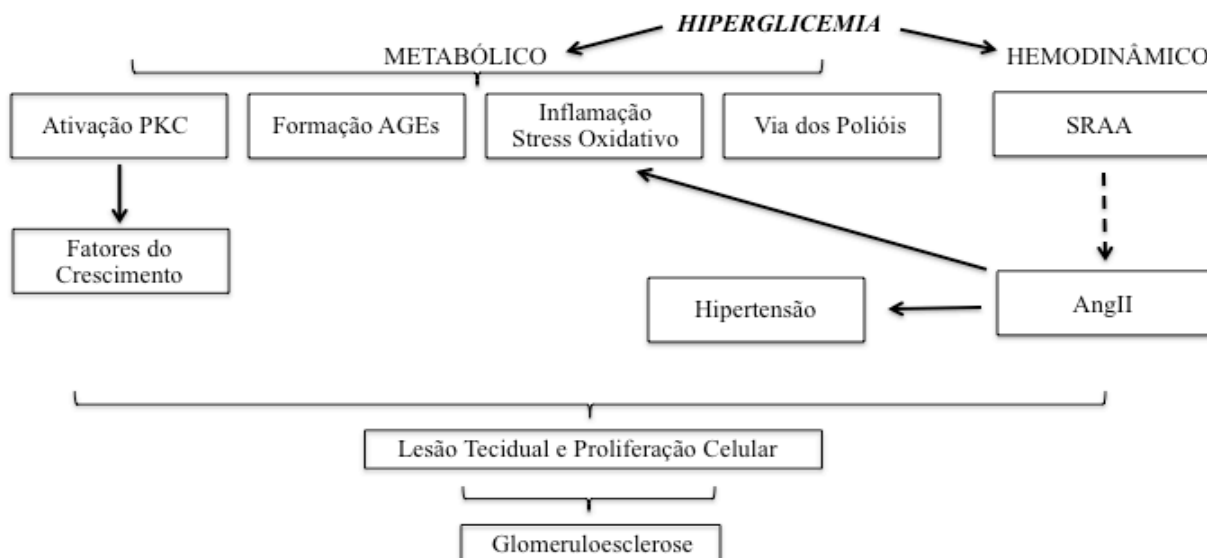
FONTE: Adaptado de KIRSZTAJN & BARROS (2010).

Para o desenvolvimento da ND há fatores genéticos (polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina, PPAR γ 2, K121Q e Ala54Thyr) e não-genéticos (controle glicêmico irregular, hipertensão arterial não controlada, tabagismo, dislipidemia, dieta hiperprotéica), que fisiopatologicamente (figura 1) dados a hiperglicemia, suas alterações metabólicas e hemodinâmicas (que inclusive favorecem a disfunção endotelial e aterogênese), promovem a indução da hiperfiltração, hipertensão e hipertrofia glomerular, inflamação tecidual, aumento da permeabilidade glomerular, albuminúria, aumento progressivo da matriz mesangial (podendo haver formações nodulares – nódulos de Kimmelstiel-Wilson), colapso capilar, fibrose, glomerulosclerose, com conseqüente perda da filtração glomerular. (O'DONNELL et al, 1998; ZATZ, 2000; OLUGBENGA et al, 2004; GROSS et al, 2005; SCHMID & BERTOLUCI, 2009; SILVEIRO et al, 2010; LIM & TESH, 2012; KANASAKI, 2013)

As alterações hemodinâmicas induzidas pela hiperglicemia na ND correlacionam-se com o aumento da pressão intra-glomerular e sistêmica e ativação de vias hormonais vasoativas, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e endotelina, que a nível intra-celular, ativarão proteínas segundo-mensageiros (proteína quinase C (PKC), proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAP-K), fatores de transcrição nuclear (NF- κ B), reguladoras de funções vasculares de permeabilidade e contratilidade, de síntese de matriz extracelular (MEC) e transdução de sinais para várias citocinas e hormônios) e fatores de crescimento (fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); favorecendo a proliferação celular). A hiperglicemia também levará, diretamente ou em associação às alterações hemodinâmicas, a alterações metabólicas relacionadas ao acúmulo de produtos avançados da glicosilação não enzimática (AGEs – Advanced Glycation End Products; glicotoxinas, geradas da ligação da glicose à proteínas, lipídeos e/ou ácidos nucléicos, que mediarão reações inflamatórias), ao aumento do stress oxidativo (com liberação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio – ROS, interagindo com receptores para produtos avançados da glicosilação não enzimática – RAGE), inflamação tecidual (liberação de macrófagos, linfócitos e depósitos imunes, liberando interleucinas, fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), entre outros) e ativação intra-renal da via dos polióis (relacionado ao aumento da redução enzimática da glicose a frutose, via aldolase redutase e sorbitol desidrogenase, com acúmulo de sorbitol, promovendo lesão tecidual e redução de prostaglandinas). (TURATTI & RODRIGUES, 2005; SCHLEICHER & FRIESS, 2007; FUKAMI et al, 2008;

HA et al, 2008; SOLDATOS & COOPER, 2008; ZIYADEH, 2008; LIM & TESH, 2012; BUREN & TOTO, 2013; KANASAKI et al, 2013; SUN et al, 2013)

Figura 1: Resumo dos mecanismos metabólicos e hemodinâmicos da lesão tecidual do DM:



Fonte: Adaptado Buren & Toto, 2013

A ND pode ser dividida em estágios, mais evidentes no DM1 (pois a microalbuminúria pode estar presente ao diagnóstico do DM2 em até 10% dos casos), correlacionando-se tempo de DM e alterações histológicas renais encontradas vistos na tabela 2 (OLUGBENGA et al, 2004; GROSS et al, 2007; BUREN & TOTO, 2013):

Tabela 2 - Estágios da ND:

Estágio	Tempo de Diabetes	Manifestações
I	0 a 3-5 anos	Aumento da TFG Hipertrofia Renal
II	3-5 anos ou mais	Diminuição Membrana Basal Expansão Mesangial
III	7-15 anos ou mais	Microalbuminúria Aumento da Pressão Arterial
IV	15-20 anos ou mais	Proteinúria Hipertensão Diminuição da TFG
V	Após 15-25 anos	DRC estágio final

Fonte: Adaptado de OLUGBENGA et al, 2004; GROSS et al, 2007; BUREN & TOTO, 2013.

1.2) Epidemiologia:

Segundo dados norte-americanos, há a prevalência de 25,8 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América com DM diagnosticado, com um custo de 245 milhões de dólares/ano. (ADA, 2013)

A ND é uma complicação crônica do DM que acomete aproximadamente 35% dos pacientes com DM1, sendo a principal causa de morte neste grupo, aumentando o risco de óbito em 100 vezes. Nos pacientes com DM2, sua prevalência varia de 10 a 40%, estando associada a um aumento da mortalidade de aproximadamente 5 vezes. (OLUGBENGA et al, 2004; GROSS et al, 2005; GROSS et al, 2007; SCHMID & BERTOLUCI, 2009; SHLIPAK, 2010; SILVEIRO et al, 2010; HOOGWERF, 2010)

O DM é a principal causa de admissão em programas de diálise em países desenvolvidos, ao lado da hipertensão arterial. Nos Estados Unidos, cerca de 48% dos novos casos de pacientes em programa de substituição renal são portadores de DM. No Brasil, os pacientes diabéticos representam aproximadamente 26% dos pacientes em programas de diálise, com uma sobrevida média de apenas 26 meses. (GROSS et al, 2005; GROSS et al, 2007; SCHMID & BERTOLUCI, 2009; SHLIPAK, 2010; SILVEIRO et al, 2010)

Verifica-se, portanto, uma importante causa de morbi-mortalidade e de saúde pública referente a estes pacientes.

1.3) O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

No DM, em nível tecidual renal, a hiperglicemia estimula uma produção de renina elevada, ativando o SRAA (figura 2), e consequentemente, diante dos efeitos da ação tecidual da angiotensina II (AngII), tem-se um importante mediador das alterações fisiopatológicas da ND (O'DONNELL, et al, 1998; ZATZ, 2000; VIDOTTI et al, 2004; ZANELLA, 2005; DURVASULA & SHANKLAND, 2008; SUN et al, 2013).

Fisiologicamente, o SRAA relaciona-se com a necessidade do organismo de manter a estabilidade hemodinâmica e evitar uma hipoperfusão tecidual (ZATZ, 2000; ATLAS, 2007; GRACIANO & NORONHA, 2010).

O SRAA é regulado pela renina, produzida e armazenada no aparelho justaglomerular. A liberação da renina está associada a condições que promovem alterações hemodinâmicas, como depleção do volume sanguíneo, perda ou dieta pobre de sódio, hipovolemia funcional (como na cirrose hepática, insuficiência cardíaca, síndrome nefrótica), estímulo adrenérgico, inibição da AngII e aumento de prostaglandinas. Pelos componentes

clássicos do SRAA, a renina ao ser liberada por estes estímulos hemodinâmicos, quebra o angiotensinogênio existente no plasma, em angiotensina I. Este é convertido pela enzima conversora de angiotensina (ECA) no metabólito ativo – AngII (produção sistêmica e tecidual). AngII, através de seus receptores AT1, estimula a síntese de aldosterona (na zona glomerulosa do córtex da glândula supra-renal) e liberação de hormônio anti-diurético (sistema nervoso central), aumentando a reabsorção urinária de sódio/água e a excreção urinária de potássio; estimula o sistema nervoso simpático, promovendo uma liberação adrenérgica, com vasoconstrição sistêmica e renal, aumentando a filtração glomerular (como resultado da vasoconstrição renal da arteríola eferente). Assim a AngII promove um aumento da volemia e compensação pressórica. (ZATZ, 2000; ATLAS, 2007; GRACIANO & NORONHA, 2010)

Além deste efeito hemodinâmico, a AngII e seus receptores AT1 a nível celular, atuam sobre a proliferação e reparo celular, e expansão da MEC (gerando hipertrofia e/ou hiperplasia renal/cardíaca, inflamação e fibrose tecidual), através da liberação de fatores do crescimento e stress oxidativo. O estímulo de receptores AT2 promove liberação de outras substâncias vasoativas (prostaglandinas e óxido nítrico), causando efeito vasodilatador; também tem uma ação anti-apoptótica e anti-proliferativa. Existem outros 2 receptores, AT3 (função ainda desconhecida) e AT4 (modulação da função endotelial). A AngII é degradada a AngIII (estimula processo inflamatório e fibrose tecidual) e AngIV (que através de amino e carboxipeptidases, podendo ativar AT4). (ATLAS, 2007; GRACIANO & NORONHA, 2010; KAGAMI, 2012; CROWLEY, 2012)

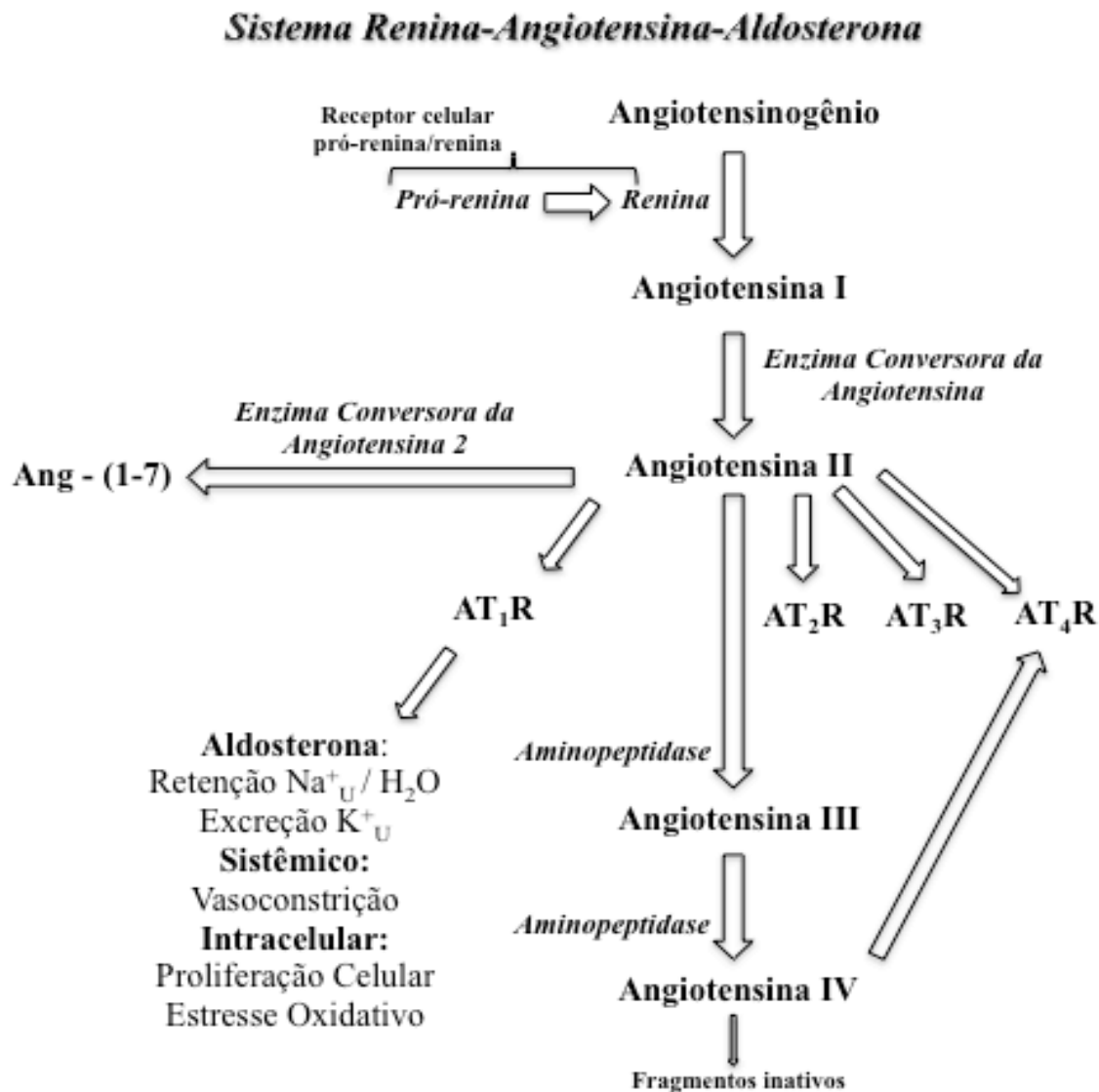
Paralelamente ao chamado esquema clássico, ocorre uma ativação de outros metabólitos derivados da AngII, através da ação enzimática da ECA2 (enzima homóloga da ECA), produzindo Ang(1-7), produzindo um efeito contrário a via clássica, promovendo vasodilatação, natriurese e efeitos anti-proliferativos. Por outro lado, há também a presença de receptores teciduais específicos para renina e pró-renina (renal e vascular), sinalizando a ativação tecidual de toda uma cascata de efeitos pró-fibróticos. (ATLAS, 2007; GRACIANO & NORONHA, 2010; KAGAMI, 2012; CROWLEY, 2012)

A ativação de aldosterona, além de efeitos tubulares renais, potencializa os efeitos pressóricos sobre os receptores AT1 da AngII, inibe liberação de óxido nítrico, estimula fenômenos pró-trombóticos (estímulo do inibidor do ativador do plasminogênio 1 – PAI-1) e fatores de crescimento, podendo contribuir com a glomerulosclerose e nefrite túbulo-intersticial (EPSTEIN, 2001; SCHJOEDT et al, 2005; BIANCHI et al, 2006).

A proliferação celular pode ser verificada no tecido renal com anticorpos específicos para PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), uma proteína nuclear de 36 KD, que está associada com o ciclo celular (HALL et al, 1990). Sua expressão aumenta da fase final “G1” para as fases iniciais “S” do ciclo celular. Vários estudos de imunohistoquímica realizados com anticorpos anti-PCNA mostram que eles são capazes de identificar células em fase de divisão (HALL et al, 1990; MARQUEZ et al, 2002). Young e colaboradores verificaram um aumento no número de células-PCNA positivas em glomérulos de ratos diabéticos que não receberam insulina, esse aumento foi evidente um dia após a indução, atingiu um pico de expressão no terceiro dia, persistindo por 30 dias, sendo a resposta proliferativa totalmente abolida pela terapia com insulina (YOUNG et al, 1995). Em outro estudo, ratos diabéticos tratados com insulina apresentaram menor quantidade de células PCNA-positivas em células mesangiais, podócitos e células tubulointersticiais (GROSS et al, 2003).

A actina é a principal proteína do sistema de microfilamentos de células eucarióticas. A presença de α -SMA (α -smooth muscle actin – alfa-actina de músculo liso) no rim adulto em condições normais é restrita a musculatura lisa dos vasos cuja função principal é a contratilidade (JOHNSON et al, 1991). Tem sido demonstrado que sob condições patológicas, as células mesangiais, tubulares e intersticiais apresentam alterações no seu fenótipo, passando a expressar a proteína α -SMA e algumas proteínas de filamentos intermediários, tornando-se potencialmente capazes de produzirem mais colágeno e outros elementos da MEC (IGNOTZ et al, 1987; JOHNSON et al, 1991; NAHAS et al, 1996). Essas modificações estão relacionadas à proliferação celular e produção de MEC, mostrando que a α -SMA pode ser usada como marcador de ativação da célula mesangial em modelos de glomerulonefrite em ratos (JOHNSON et al, 1991; NAHAS et al, 1996). Um aumento na expressão de α -SMA também foi verificado em glomérulos de ratos diabéticos não tratados com insulina. Esta mudança fenotípica de células mesangiais tem um papel importante no acúmulo de MEC na ND e foi observada em estágios iniciais do diabetes, favorecendo a progressão da fibrose intersticial e glomerulosclerose (YOUNG, et al, 1995; MAKINO et al, 1996; PEDAGOGOS et al, 1997; YONEMOTO et al, 2006; LI et al, 2009), sendo que esta expressão de α -SMA pode ser considerada uma preditora de ND progressiva (ESSAWY et al, 1997). Trabalhos com foco na ação da AngII mostraram uma redução na expressão de α -SMA mesangial e tubulointersticial nos ratos diabéticos tratados com bloqueio do SRAA (TUNÇDEMİR & OZTURK 2008; X et al, 2009).

Figura 2: Esquema do Sistema Renina-Angiotensina –Aldosterona:



Fonte: Adaptado de ATLAS, 2007.

1.4) O Bloqueio Farmacológico do SRAA:

Dada a importância dos componentes do SRAA para o desenvolvimento da ND, vários estudos foram realizados utilizando-se fármacos capazes de interferir no funcionamento desse sistema, entre eles estão:

1.4.1) Inibidores da ECA (iECA):

Agem pela inibição da ECA, bloqueando a transformação da Ang I em II no sangue e nos tecidos, favorecendo o aumento de bradicinina/prostaglandinas (vasodilatação) e diminuindo a formação de AngII, a qual é atuante na vasoconstrição, no stress oxidativo e inflamação (ambos importantes na fisiopatologia das complicações micro/macrovaskulares da DM). São eficazes no tratamento da hipertensão arterial sistêmica (HAS), reduzindo a morbidade e a mortalidade cardiovasculares em pacientes hipertensos, portadores de insuficiência cardíaca e pós-infarto agudo do miocárdio. Atuam na prevenção secundária do acidente vascular encefálico, através do controle pressórico. Reduzem a EUA (efeitor de nefroproteção), retardando o declínio da função renal em pacientes com ND. (VOLPINI et al, 2003; CAREY, 2008; SARAFIDIS et al, 2008; HOOGWERF, 2010; WERNER et al, 2010; LV et al, 2012; VEJAKAMA et al, 2012)

1.4.2) Bloqueadores dos Receptores AT1 da AngII (BRA):

BRA antagonizam a ação da AngII por meio do bloqueio específico de seus receptores AT1. Promovem desta forma, uma redução mecanismos hemodinâmicos e metabólicos da AngII. São eficazes no tratamento da HAS; proporcionam redução da morbidade e mortalidade cardiovascular, mostrando também um efeito benéfico em insuficiência cardíaca congestiva, prevenção do acidente vascular cerebral e nefroproteção em pacientes com DM2, ao reduzir a EUA. (KEANE & LYLE, 2003; CHAN et al, 2004; CAREY, 2008; WERNER et al, 2010; HOOGWERF, 2010; VEJAKAMA et al, 2012; KOBORI et al, 2013)

1.4.3) Inibidores Diretos da Renina (IR):

O Alisquireno, único representante da classe atualmente disponível para uso clínico, promove uma inibição direta da ação da renina com consequente diminuição da formação de AngII e outras como redução da atividade plasmática de renina, bloqueio de receptor celular próprio de renina/pró-renina e diminuição da síntese intracelular de AngII. Tem eficácia anti-hipertensiva e efeito benéfico na morbidade cardiovascular e renal, com a redução de hipertrofia de ventrículo esquerdo e EUA, respectivamente. (POOL, 2007; CAREY, 2008; FELDMAN et al, 2008; DELEA et al, 2009; TRIMARCH, 2011; BONANI & VESTRA, 2012)

1.4.4) Antagonistas da Aldosterona

Representados principalmente pela Espironolactona. Possui efeito na redução pressórica, além de reduzir efeitos inflamatórios, pró-trombóticos e de fibrose tecidual associados a ação da AngII. Seu uso está associado a uma redução da morbi-mortalidade cardiovascular e renal. Em associação a outros fármacos que atuam no SRAA, pode promover um aumento do efeito colateral relativo aos representantes deste grupo, que é a hipercalemia (SCHJOEDT et al, 2005; BIANCHI et al, 2006; FURUMATSU et al, 2008; TYLICKI et al, 2008; WERNER et al, 2010).

1.5) Efeito do Bloqueio Farmacológico do SRAA sobre a ND:

Estudos mostram que o uso de iECA, BRA e IR reduzem a proteinúria, assim como retardam a progressão da ND, tanto em modelos experimentais como em humanos (CHAN et al, 2004; POOL, 2007; CAREY, 2008; FELDMAN et al, 2008; MANN et al, 2008; DELEA et al, 2009; SBC, 2010; HOOGWERF, 2010; PICHLER & BOER, 2010; TRIMARCH, 2011).

Estes efeitos anti-proteinúricos estariam relacionados ao controle pressórico arterial sistêmico, diminuição da pressão glomerular e redução da proliferação da matriz mesangial, estimulados pelo produto final AngII (ZATZ, 2000; GRACIANO & NORONHA, 2010).

A associação entre as medicações que atuam no SRAA, especificamente entre iECA-BRA, BRA-IR tem mostrado efeitos cardio/renoprotetores, com uma maior redução da proteinúria, retardo da ND e doença renal crônica, com uma maior sobrevida dos pacientes. Um efeito colateral inerente a estas associações relaciona-se a hipercalemia. (AZIZI et al, 2004; LYRA, 2005; PARVING et al, 2008; MANN et al, 2008; DOULTON et al, 2009; GRAF et al, 2009; RAVID, 2009; CAGNONI et al, 2010; HOOGWERF, 2010; PICHLER & BOER, 2010; SBC 2010; VARK, 2012; SUSANTITAPHONG et al, 2013).

O efeito do bloqueio triplo do SRAA, utilizando-se iECA, BRA e aldosterona mostrou ser efetivo na redução da proteinúria em pacientes não diabéticos, mas com a necessidade de uso baixas doses de espironolactona ou de resinas de troca iônica associadas (FURUMATSU et al, 2008; TYLICKI et al, 2008).

No entanto, o efeito da associação tripla destas medicações iECA-BRA-IR e seu efeito sobre o desenvolvimento da ND ainda não foi definido.

A utilização de medicamentos que visam minimizar a progressão da ND, reduzindo os efeitos colaterais, bem como, melhorar a qualidade de vida de pacientes diabéticos é

fundamental, dados a importância epidemiológica da morbi-mortalidade de DM, suas complicações principalmente renais que podem evoluir para insuficiência renal terminal, aumentando o número de pacientes que necessitam de terapia renal substitutiva (diálise) e o impacto sócio-econômico da doença. Baseado no que foi exposto, este trabalho pretende avaliar os efeitos do bloqueio triplo experimental do SRAA sobre o desenvolvimento da ND, fornecendo subsídios para uma nova abordagem terapêutica.

2) OBJETIVOS:

2.1) Objetivos gerais:

Avaliar as repercussões do bloqueio triplo experimental do SRAA (iECA – enalapril; BRA – losartan; IR – alisquereno) no desenvolvimento da ND, analisando a estrutura e função renais e EUA em ratos Wistar diabéticos.

2.2) Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão de α -SMA nos glomérulos e compartimento tubulointersticial do córtex renal de ratos Wistar diabéticos tratados com bloqueio triplo experimental do SRAA;
- Avaliar o número de células PCNA-positivas nos glomérulos e compartimento tubulointersticial do córtex renal, assim como contar o número de glomérulos, de ratos Wistar diabéticos tratados com bloqueio triplo experimental do SRAA;
- Determinar a TFG, pelo clearance de creatinina, de ratos Wistar diabéticos tratados com bloqueio triplo experimental do SRAA;
- Analisar a EUA de ratos Wistar diabéticos tratados com bloqueio triplo experimental do SRAA;
- Realizar dosagens de sódio, potássio e uréia plasmáticos de ratos Wistar diabéticos tratados com bloqueio triplo experimental do SRAA;

3) MATERIAL E MÉTODOS:

O presente estudo foi desenvolvido após aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, sob o número de protocolo 122/11.

3.1) Animais:

Foram utilizados ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus albinus*), com peso em média de 350g, mantidos no depósito de animais da área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia em estantes climatizadas a temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas.

3.2) Indução de DM:

A indução do DM foi feita com a administração de aloxano (Sigma-Aldrich), um análogo tóxico da glicose, que produz uma lesão nas células beta pancreáticas, induzindo um modelo de DM1 (DORNAS et al, 2006; LENZEN, 2008).

O protocolo de indução de DM consistiu em manter os ratos em jejum absoluto durante 24h. Após este período, realizou-se anestesia por via peritoneal com tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália) solução a 2,5%, na dosagem de até 25 mg/Kg (FLECKNELL, 1993). O controle da sedação foi efetuado avaliando-se o reflexo de retirada da pata do animal ao estímulo doloroso. Quando necessário, administrou-se uma segunda dose de anestésico, respeitando-se a dosagem máxima. Em seguida, o aloxano foi administrado por via endovenosa (veia peniana), na dosagem de 50 mg/kg de peso corporal, diluído em solução salina 0,9%. Posteriormente, os animais ficavam acondicionados em caixas com maravalha em estantes climatizadas, com ração e água *ad libitum*.

Para confirmação da hiperglicemia, utilizou-se um glicosímetro (Accu Check Active, Roche), após 12h, 24h e 48h de indução, coletando-se uma amostra de sangue da cauda dos animais. Os ratos que apresentaram glicemia maior que 200mg/dL foram considerados diabéticos. Após este período, os que não tinham atingido a meta glicêmica, eram sacrificados, utilizando-se tiopental sódico em dose tóxica por via peritoneal (CLOSE et al, 1996; CLOSE et al, 1997).

Uma vez diabéticos, introduziu-se insulinoterapia com insulina NPH (Humulin N[®], Lilly) uma unidade subcutânea, em dias alternados, visando manter uma hiperglicemia, mas diminuindo os riscos de morte dos animais.

3.3) Grupos de estudo:

Após sete dias de indução, os ratos foram divididos nos seguintes grupos:

- A) grupo controle (n=7): sem tratamento
- B) grupo experimental 1 (n=7): tratado com iECA (enalapril - EN), diluído na água (20 mg/L), oferecido *ad libitum* aos animais (VOLPINI et al, 2003).
- C) grupo experimental 2 (n=6): tratado com BRA (losartan - LO) diluído na água (50 mg/L), oferecido *ad libitum* aos animais (VOLPINI et al, 2003).
- D) grupo experimental 3 (n=8): tratado com IR (alisquereno - AL) (Rasilez[®], Novartis), na dose de 50 mg/Kg/dia, administrado por gavagem (MARTINS-OLIVEIRA et al, 2012). Para a gavagem, macerou-se comprimido de 300 mg de AL e adsorvido em suspensão de carboximetilcelulose 5%, com uma concentração de 60 mg/ml.
- E) grupo experimental 4 (n=6): tratado com a associação iECA (EN), BRA (LO) e IR (AL); EN e LO diluídos na água em associação, nas dosagens de 20 mg/L e 50 mg/L, respectivamente, oferecidos *ad libitum*; AL por gavagem, na dose de 50 mg/Kg/dia, conforme descrito previamente.

Após 90 dias de tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta de urina e, posteriormente, de sangue, para determinação da EUA, TFG (através do clearance de creatinina), potássio, uréia e creatinina sanguíneos.

Em seguida, os animais foram anestesiados com halotano (Cristália) (CLOSE *et al*, 1996; CLOSE *et al*, 1997) e tiveram seus rins retirados (rim esquerdo por padronização), pesados, fixados em methacarn e incluídos em parafina para as demais etapas analíticas.

3.4) Análise Histológica e Imunohistoquímica:

Secções de 5 µm de tecido renal foram coradas com tricrômico de Masson para a análise histológica.

A contagem de glomérulos foi feita por uma secção transversal central do rim esquerdo de todos os animais dos grupos propostos.

Outros cortes de 5 µm de tecido renal dos animais foram desparafinizados e submetidos à análise imunohistoquímica, sendo inicialmente incubados com os seguintes anticorpos primários (BALBI et al, 2008):

- **anti- α -SMA** (1/1000), monoclonal (DAKO Corporation, Denmark), *overnight* a 4°C.

- **anti-PCNA** (1/1000), monoclonal (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) durante 60 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, foram incubados com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo. O produto da reação é detectado com o sistema avidinabiotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e a cor desenvolvida pela adição de 3,3 diaminobenzidina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) na presença de água oxigenada. As ligações inespecíficas são bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primários e secundários com solução de PBS, contendo albumina bovina 1%. Os controles negativos são feitos substituindo o anticorpo primário por IgG de camundongo (monoclonal) em concentrações equivalentes. A contracoloração é feita com *metilgreen*. (BALBI et al, 2008)

3.5) Avaliação dos resultados imunohistoquímicos

A avaliação dos resultados da imunorreação para α -SMA foi feita através da análise da porcentagem do glomérulo ou do córtex renal marcado, atribuindo um escore de 0 a 4.

O escore 0, equivale em 0 a 5% do campo marcado, o escore 1, entre 5 e 25%, o escore 2, entre 25 e 50%, o escore 3, entre 50 e 75% e o escore 4, entre 75 e 100% (KLIEM *et al*, 1996).

A análise das imunorreações para PCNA foi feita pela contagem de células positivas por glomérulo ou por área do córtex renal medindo 0,245 mm². Determinou-se um escore ou número médio de células por campo e por glomérulo para cada rato (BALBI et al, 2008).

3.6) Estudos de Função Renal

A função renal foi avaliada pelo clearance de creatinina. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e toda a urina de 24 horas coletada; posteriormente, uma amostra de sangue (1,5 mL) foi retirada da cauda dos animais. A dosagem de creatinina plasmática e urinária foi feita utilizando-se o método colorimétrico.

3.7) Quantificação de albumina nas amostras de urina

A microalbuminúria foi determinada na amostra de urina de 24h coletada, metodologia por colorimetria, com o auxílio do vermelho de pirogalol (Labtest) nos animais de todos os grupos propostos. Esta substância reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul. A absorbância resultante obtido pela leitura das amostras em espectrofotômetro foi diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

3.8) Análise estatística

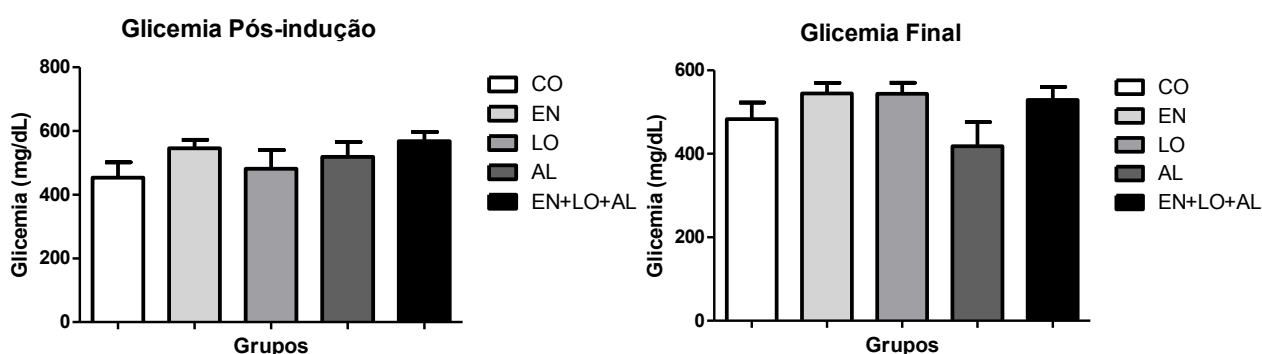
O teste estatístico empregado na avaliação de todos os parâmetros estudados, com o auxílio do software *GraphPad Prism Version 5.00 (Trial)*, foi o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações realizadas entre todos os grupos.

4) RESULTADOS:

4.1) Indução do DM:

A indução do DM foi feita pela administração endovenosa (veia peniana) de aloxana na dose de 50mg/Kg de peso corporal e a glicemia verificada cerca de 12, 24 e 48 horas após a indução. Os animais de todos os grupos se apresentaram hiperglicêmicos (glicemia acima de 200mg/dL) após a indução e as glicemias se mantiveram elevadas durante todo o tempo de tratamento com as drogas EN, LO, AL e associação (bloqueio triplo – EN+LO+AL), apesar da insulinoiterapia feita em dias alternados para garantia da sobrevivência desses animais, de acordo com os valores da **Figura 3 e Tabela 3**, não havendo diferenças significativas entre os grupos. A manutenção de glicemia elevada facilitaria o desenvolvimento da ND

Figura 3 – Gráficos dos valores médios da glicemia apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) após a indução do DM e ao final dos tratamentos propostos.



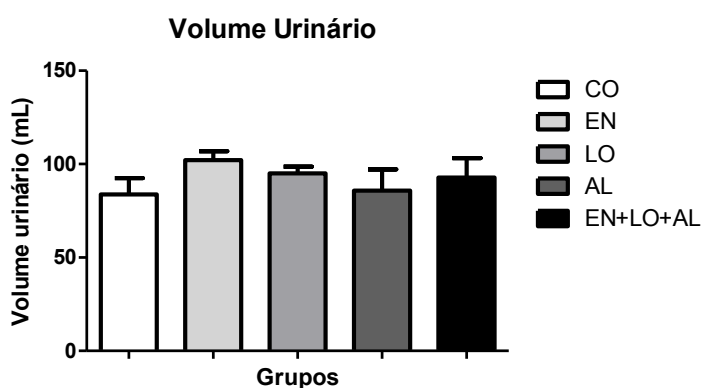
Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média $\pm$ EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Embora os animais de todos os grupos tenham ficado hiperglicêmicos, após a indução e se mantido nestas condições ao longo dos tratamentos, não houve diferenças significativas entre os grupos.

Além da hiperglicemia, o quadro de DM1 pode ser comprovado pela intensa poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso corporal apresentadas pelos animais de todos os grupos estudados. Com relação à poliúria, animais adultos não-diabéticos eliminam cerca de $19,32 \pm 3,55$ mL de urina por dia (dados do laboratório), enquanto que os animais diabéticos acompanhados neste trabalho apresentaram volume urinário diário 4 vezes maior que o basal (**Figura 4 e Tabela 3**), embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre os grupos, para este parâmetro. Quanto à variação de peso corporal, os animais foram pesados antes da

indução do DM e ao final do período de todos os tratamentos. Foi observada perda importante de peso nos animais de todos os grupos, com exceção do grupo AL. No entanto, este ganho não foi significativo, considerando o curto tempo (3 meses) em que os animais foram acompanhados, pois a tendência é que ganhariam peso com o passar do tempo, de qualquer maneira (**Figura 5 e Tabela 3**).

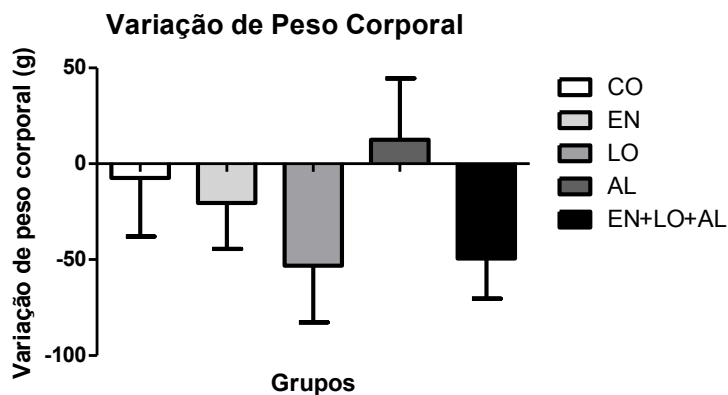
Figura 4 – Gráfico dos valores médios de volume urinário de 24 horas eliminado pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Os valores são expressos como Média±EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Não houve diferenças significativas de volume urinário entre os grupos estudados.

Figura 5 – Gráfico da variação média de peso corporal apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Os valores são expressos como Média±EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Houve perda importante de peso corporal apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO e bloqueio triplo (EN+LO+AL). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Não houve diferenças significativas de variação de peso corporal entre os grupos estudados.

Tabela 3 – Valores médios de glicemia após a indução do DM e ao final dos tratamentos propostos, volume urinário de 24 horas e variação de peso corporal apresentados pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).

Glicemia (mg/dL)	CO	EN	LO	AL	EN+LO+AL
Pós-indução	453,9 ±47,6	545,4 ±27,1	481,5 ±58,7	519,3 ±46,5	568,3 ±28,8
Final	483,1 ±39,7	544,7 ±25	543,8 ±26,7	418,4 ±57,9	529,0 ±31,2
Volume Urinário diário (mL)	83,83 ±8,8	102,1 ±4,7	95,0 ±3,7	85,83 ±11,3	92,83 ±10,3
Variação de peso corporal (g)	-7,43±30,54	-20,43±23,96	-53,17±29,46	12,50±32,05	-49,50±2,83

Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média ± EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

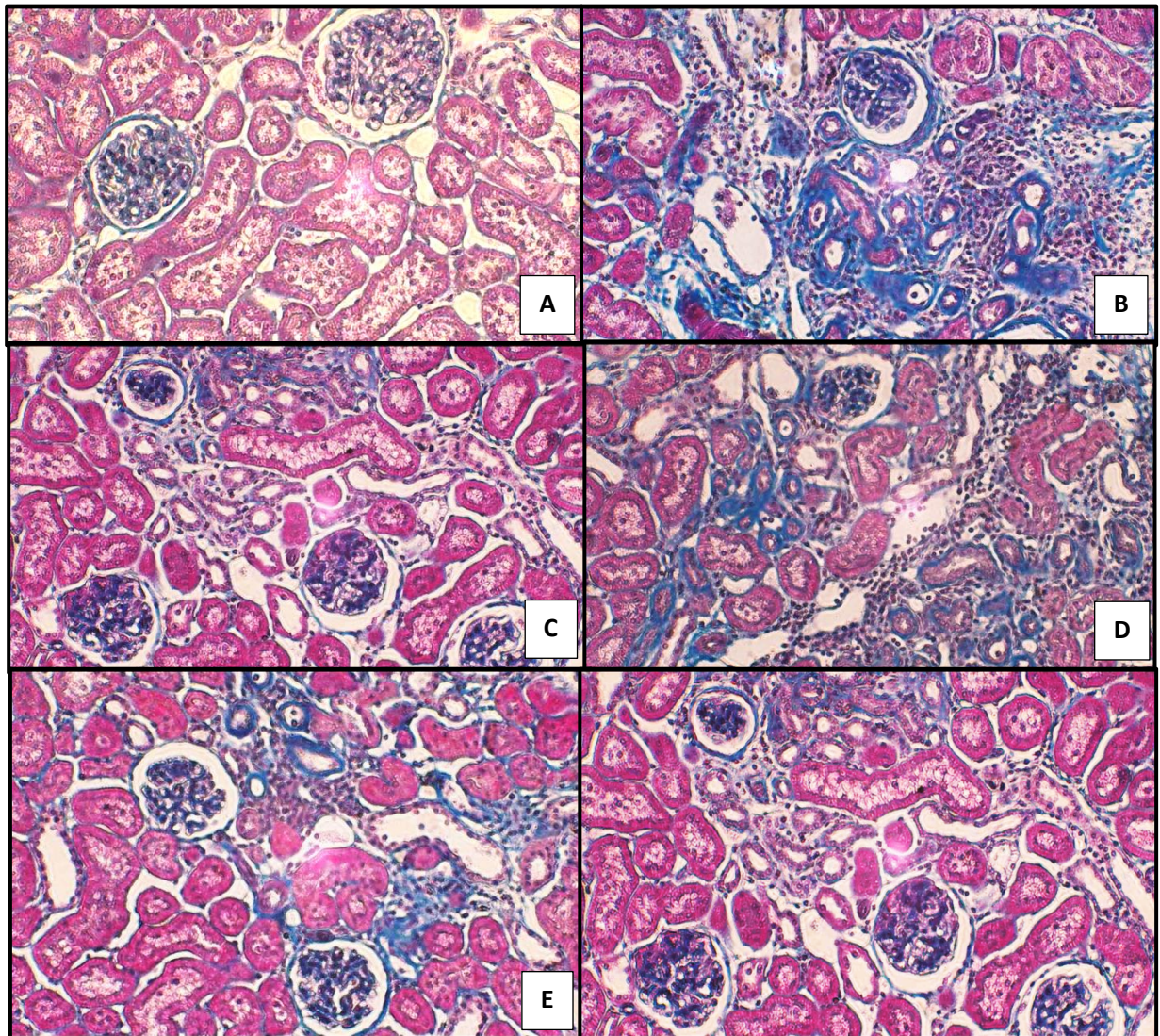
4.2) Análises histológica e imunohistoquímica:

A análise histológica foi feita em cortes de tecido renal corados com tricrômico de Masson. No córtex renal de animais adultos não-diabéticos pode-se observar integridade estrutural dos glomérulos e túbulos, presentes na região cortical (**Figura 6A**). Já no córtex de animais diabéticos (CO), constatou-se deposição de colágeno glomerular e compartimento tubulointersticial, dilatação tubular, expansão do espaço capsular e presença de infiltrado inflamatório (**Figura 6B**), alterações que foram atenuadas pelos tratamentos com EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) (**Figura 6C, D, E e F, respectivamente**).

Nos tratamentos com AL (171,4±10,10) e o bloqueio triplo (EN+LO+AL) (161,0±1,30) foi observado um maior número de glomérulos por secção central renal quando comparado aos animais do grupo CO (122,0±11,28), que não receberam tratamento (**Figura 7 e Tabela 4**). Deve-se ressaltar que não foram aplicadas escalas morfométricas.

Os animais de todos os grupos, bem como seus rins esquerdos, também foram pesados para se obter a relação peso do rim/peso do corpo e, para este parâmetro, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados (**Figura 8 e Tabela 4**).

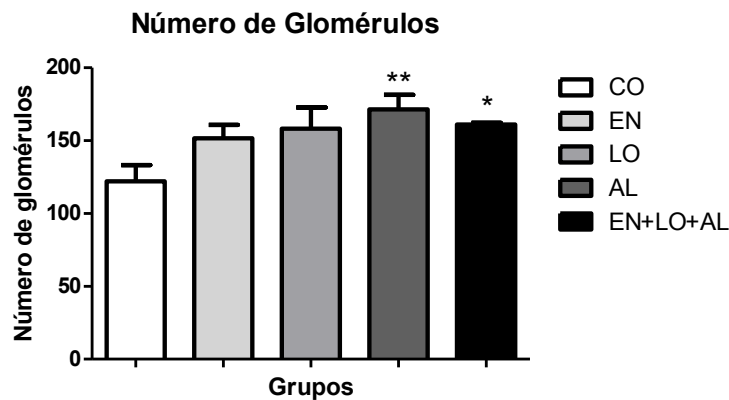
Figura 6 – Cortes de tecido renal corados com Tricrômico de Masson dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Cortes de tecido renal corados com Tricrômico de Masson de animais não-diabéticos (A), e animais dos grupos CO (B), EN (C), LO (D), AL (E) e bloqueio triplo (EN+LO+AL) (F). Observar em B a presença de infiltrado inflamatório, expansão tubular e deposição de colágeno nos glomérulos e compartimento tubulointersticial. Em C, D, E e F observou-se que as alterações estruturais estavam amennizadas nos tratamentos com EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL), respectivamente.

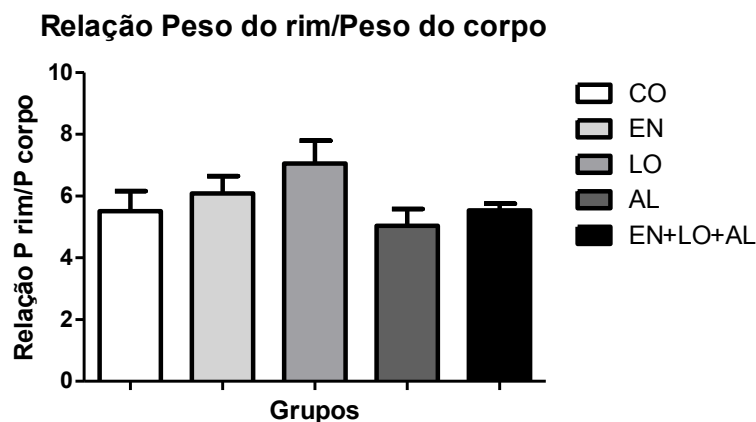
Figura 7 – Gráfico do número de glomérulos presentes por área de secção renal dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Os valores são expressos como Média±EPM. * $p<0,05$ (versus CO), ** $p<0,01$ (versus CO). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$. Observar um maior número de glomérulos no grupos AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) quando comparados com o controle.

Figura 8 – Gráfico da relação peso do rim/peso do corpo dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



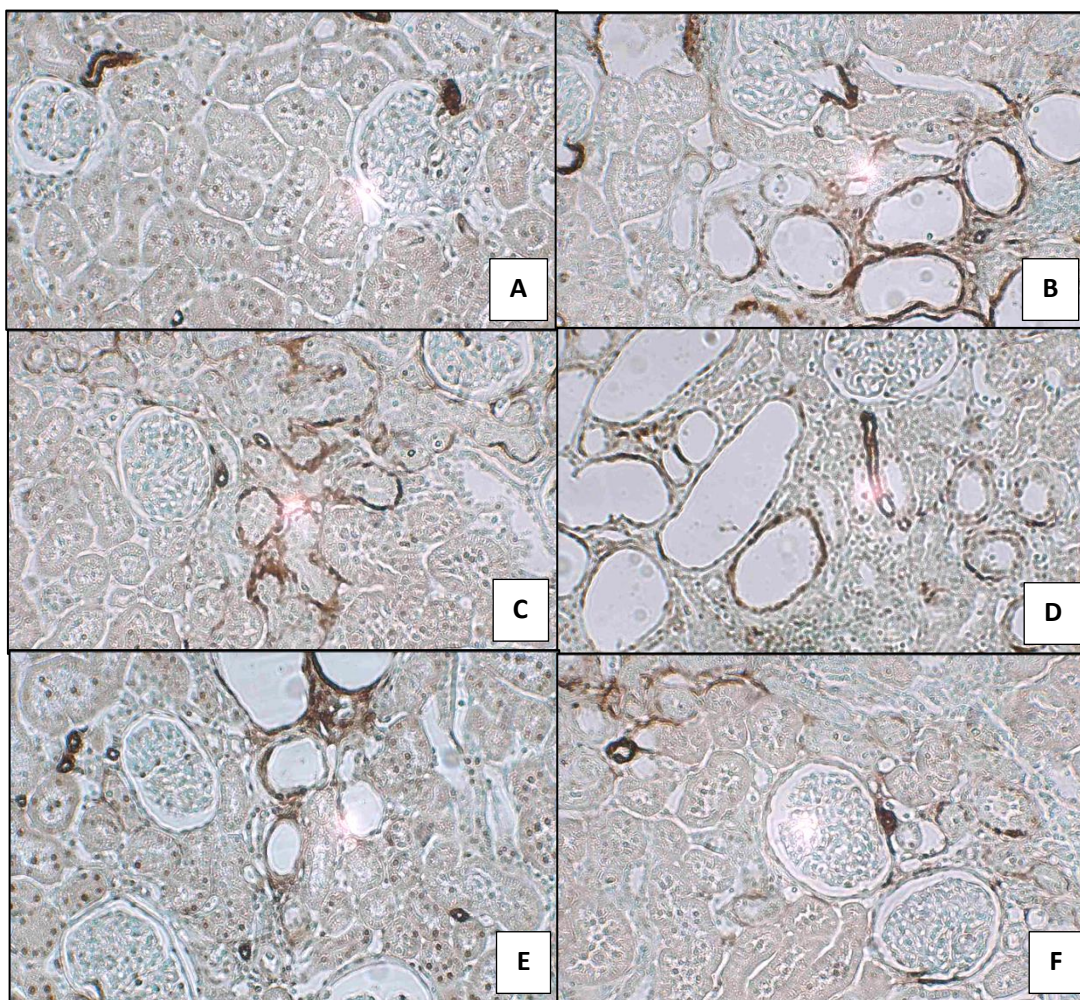
Fonte: O autor.

Os valores são expressos como Média±EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Quanto à imunorreação para α -SMA (**Figura 9 e Tabela 4**), a expressão de α -SMA no córtex renal de animais adultos não-diabéticos encontra-se restrita à parede de vasos (**Figura 9A**), mas em modelos de lesão renal, como durante o desenvolvimento da ND, esta expressão pode estar aumentada nos glomérulos e compartimento tubulointersticial. Nos animais do grupo CO, a expressão desta proteína do citoesqueleto foi maior nos glomérulos e tubulointerstício. No entanto, os tratamentos com EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) reduziram, de forma significativa, a expressão de α -SMA glomerular, e

somente os grupos EN (9C), AL (9E) e bloqueio triplo (EN+LO+AL) (9F) apresentaram menor expressão de α -SMA tubulointersticial, quando comparados aos controles (**Figura 10 e Tabela 4**).

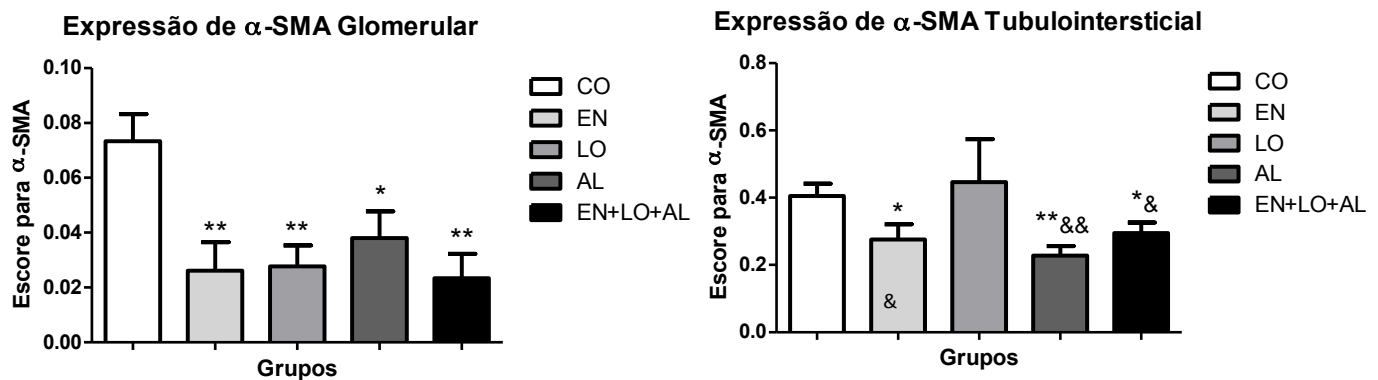
Figura 9 – Imunorreação para α -SMA no córtex renal de animais não-diabéticos e dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Imunorreação para α -SMA no córtex renal de animais não-diabéticos (A) e dos animais dos grupos CO (B), EN (C), LO (D), AL (E) e bloqueio triplo (EN+LO+AL) (F). Observar em A, a expressão de α -SMA restrita à parede de vasos, enquanto que em B, a expressão está aumentada no compartimento tubulointersticial. Os tratamentos com EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) reduziram a expressão de α -SMA glomerular enquanto que EN, AL e bloqueio triplo, diminuíram a expressão tubulointersticial desta proteína.

Figura 10 – Gráficos da quantificação da imunorreação de α -SMA glomerular e tubulointersticial no córtex renal dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).

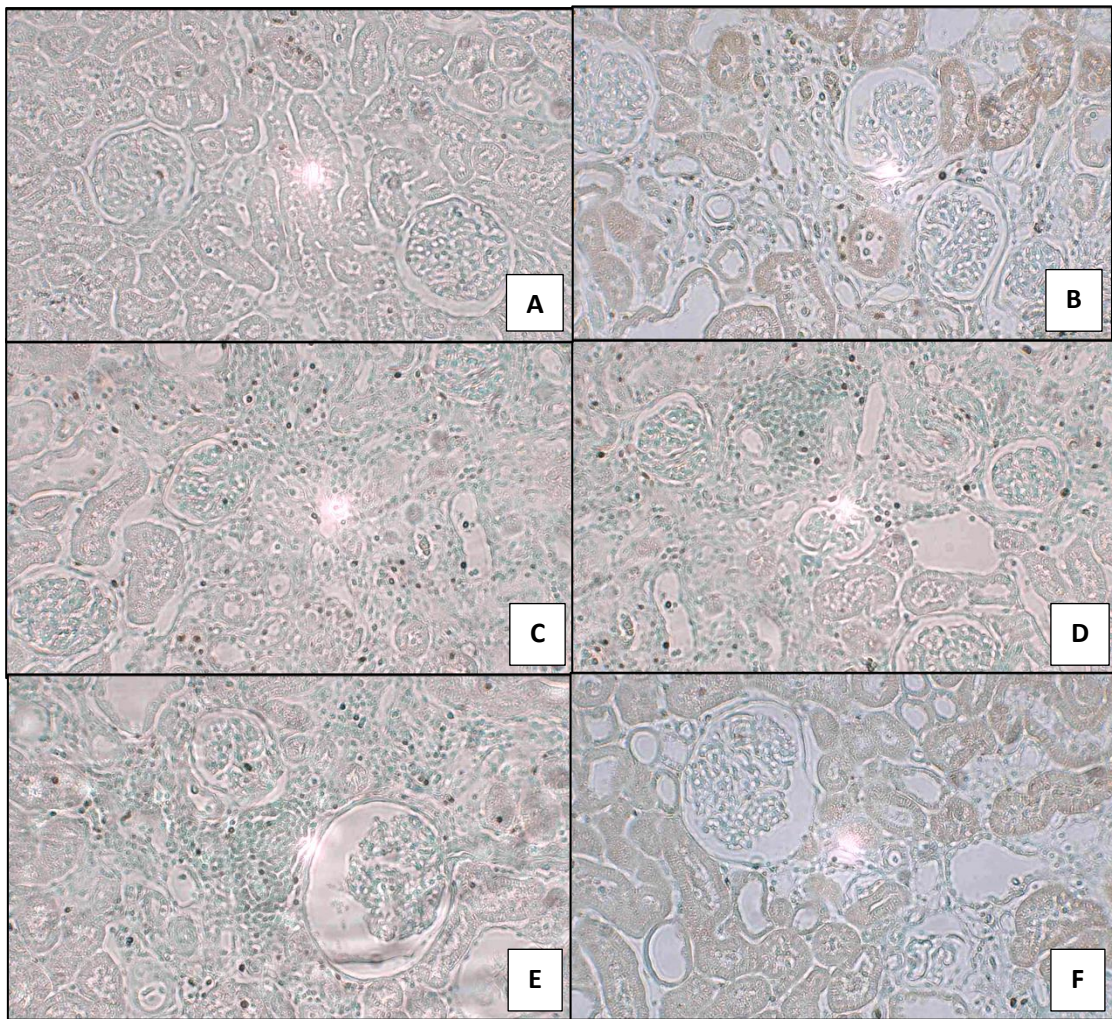


Fonte: O autor.

Os valores são expressos como Média±EPM, * $p < 0,05$ (versus CO), ** $p < 0,01$ (versus CO), & $p < 0,05$ (versus LO), && $p < 0,01$ (versus LO). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Com relação a marcação para células em proliferação, o número de células PCNA positivas no córtex renal é maior durante o processo de desenvolvimento renal, mas em animais adultos uma certa taxa de proliferação e apoptose ocorrem para manutenção da arquitetura do órgão, como pode ser visto na **Figura 11A**. Não houve diferenças significativas no número de células PCNA positivas expressas nos glomérulos dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) (**Figuras 11 e 12**), embora tenha ocorrido uma tendência ao aumento das células proliferativas nos grupos EN e AL, em relação aos controles. No entanto, os tratamentos com EN e LO (**Figuras 11C e 11D, respectivamente, Figura 12 e Tabela 4**) preservaram um maior número de células em proliferação no compartimento tubulointersticial dos animais, quando comparados aos diabéticos (CO), sem tratamento.

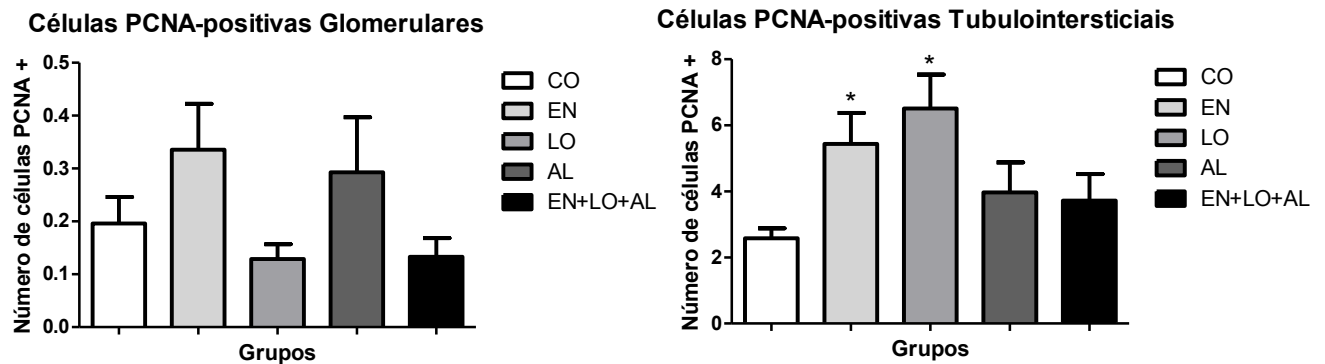
Figura 11 – Imunorreação para PCNA no córtex renal de animais não-diabéticos e dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Imunorreação para PCNA no córtex renal de animais não-diabéticos (A) e dos animais dos grupos CO (B), EN (C), LO (D), AL (E) e bloqueio triplo (EN+LO+AL) (F). Observar em C e D um maior número de células PCNA positivas no compartimento tubulointersticial.

Figura 12 – Gráficos da quantificação do número de células PCNA positivas glomerular e tubulointersticial no córtex renal dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ (versus CO). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 4 – Contagem do número de glomérulos, imunorreações para α -SMA e PCNA nos glomérulos e compartimento tubulointersticial do córtex renal e relação peso do rim/peso do corpo dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).

Reações	CO	EN	LO	AL	EN+LO+AL
α -SMA glomerular	0,073 $\pm$ 0,009	0,026 $\pm$ 0,010 **	0,028 $\pm$ 0,007 **	0,038 $\pm$ 0,009 *	0,023 $\pm$ 0,009 **
α -SMA TBI	0,405 $\pm$ 0,037	0,276 $\pm$ 0,045 *&	0,446 $\pm$ 0,128	0,228 $\pm$ 0,028**&&	0,295 $\pm$ 0,031 *&
PCNA glomerular	0,196 $\pm$ 0,050	0,335 $\pm$ 0,087	0,129 $\pm$ 0,028	0,293 $\pm$ 0,104	0,133 $\pm$ 0,035
PCNA TBI	2,580 $\pm$ 0,303	5,436 $\pm$ 0,942 *	6,509 $\pm$ 1,031 *	3,972 $\pm$ 0,905	3,725 $\pm$ 0,801
Número de glomérulos	122,0 $\pm$ 11,28	151,60 $\pm$ 9,23	158,3 $\pm$ 14,42	171,4 $\pm$ 10,10 **	161,0 $\pm$ 1,30 *
Peso rim / Peso corpo (mcg)	5,51 $\pm$ 0,65	6,09 $\pm$ 0,56	7,05 $\pm$ 0,74	5,04 $\pm$ 0,54	5,54 $\pm$ 0,22

Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ (versus CO), ** $p < 0,01$ (versus CO), # $p < 0,05$ (versus EN), & $p < 0,05$ (versus LO), && $p < 0,01$ (versus LO). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.3) Avaliação funcional (dosagens plasmáticas e urinárias):

As análises das concentrações plasmáticas de sódio, potássio e uréia mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos estudados, ou seja, o DM sem tratamento e os tratamentos que interferem na atividade do SRAA não resultaram em alterações plasmáticas destas substâncias (**Tabela 5 e Figuras 13, 14 e 15**). No entanto, pode-se constatar uma tendência a hipercalemia em todos os grupos, sendo mais evidente nos grupos AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) (**Figura 14**).

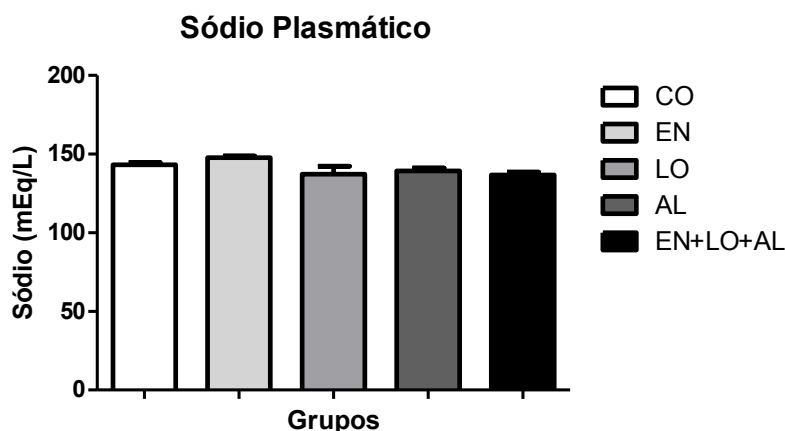
Tabela 5 – Dosagens das concentrações plasmáticas de sódio, potássio e uréia dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).

Substância	CO	EN	LO	AL	EN+LO+AL
Uréia (mg/dL)	129,5 ±56,7	104,0 ±9,8	133,4 ±27,9	94,9 ±6,5	104,4 ±9,0
Sódio (mEq/L)	143,3 ±1,2	147,7 ±1,1	137,3 ±5,1	139,3 ±1,8	136,8 ±1,7
Potássio (mEq/L)	6,63 ±0,36	6,32 ±0,34	6,39 ±0,22	8,21 ±0,51	7,82 ±0,62

Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média±EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

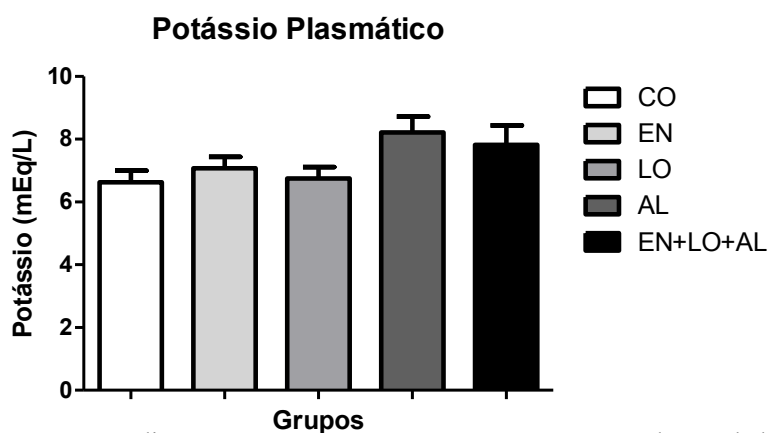
Figura 13 – Gráfico da dosagem plasmática de sódio apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média ±EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

Figura 14 - Gráfico da dosagem plasmática de potássio apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).

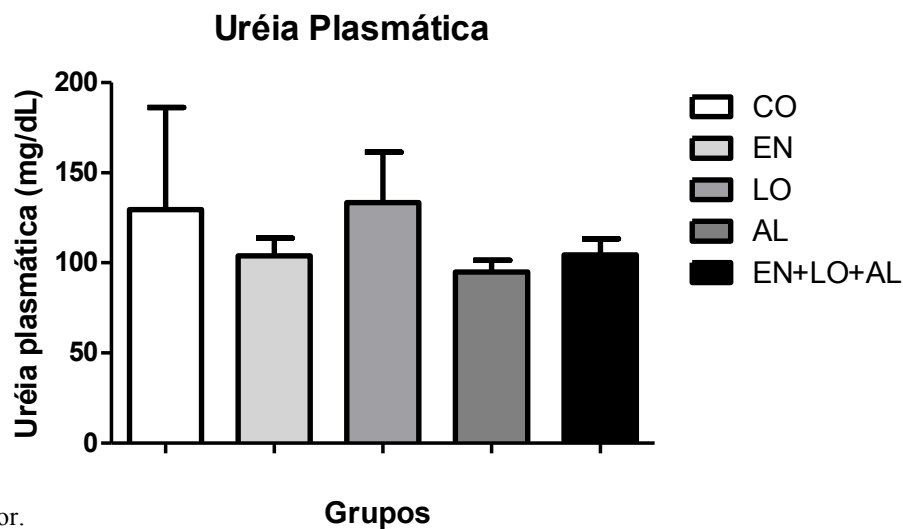


Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média

±EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 15 - Gráfico da dosagem plasmática de uréia apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



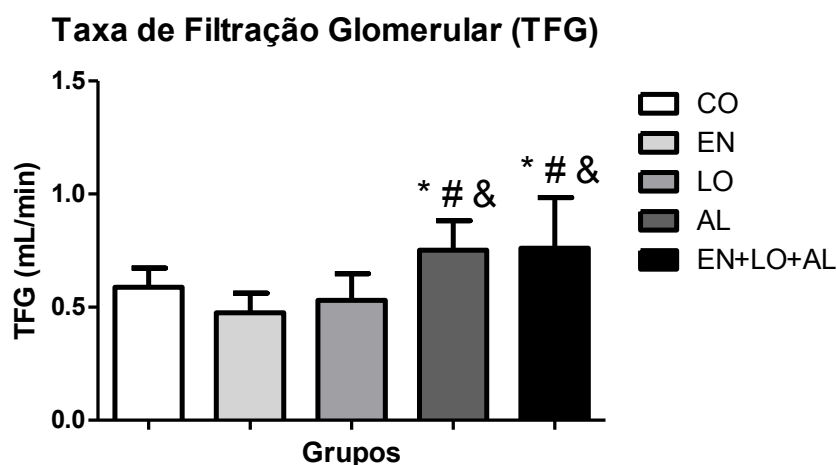
Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média ±EPM. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A determinação da TFG foi obtida pelo clearance de creatinina. É importante destacar que animais adultos não-diabéticos apresentam TFG por volta de $1,53 \pm 0,47$ mL/min (dados do laboratório). Se forem consideradas as TFG dos animais de todos os grupos estudados neste trabalho, percebe-se que o DM prejudicou a função renal de todos animais, de maneira significativa. Comparando-se agora somente os grupos estudados, os animais dos grupos CO, EN e LO apresentaram semelhantes TFG, enquanto que os tratados com AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) tiveram uma maior TFG, quando comparados aos controles e aos grupos EN e LO, respectivamente, ou seja, o AL e o bloqueio triplo (EN+LO+AL) foram efetivos em minimizar a perda de função renal decorrente do quadro de DM nesses animais (**Figura 16 e Tabela 6**).

A hiperglicemia resultante do DM também pode provocar perda de proteínas na urina, como observado nos animais diabéticos deste estudo, mas os tratamentos com AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL) reduziram significativamente a EUA desses animais, quando comparados aos controles (**Figura 17 e Tabela 6**).

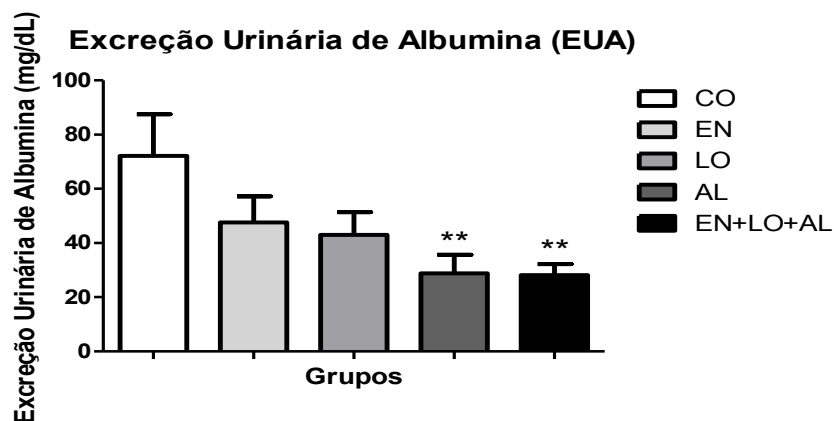
Figura 16 - Gráfico da TFG apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ (versus CO), # $p < 0,05$ (versus EN), & $p < 0,05$ (versus LO). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 17 - Gráfico da EUA média apresentada pelos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).



Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média $\pm$ EPM, ** $p < 0,05$ (versus CO). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 6 – Determinação da TFG (mL/min) e EUA (mg/dL) dos animais dos grupos CO, EN, LO, AL e bloqueio triplo (EN+LO+AL).

Parâmetros	CO	EN	LO	AL	EN+LO+AL
EUA (mg/dL)	72,1 $\pm$ 15,5	47,6 $\pm$ 9,6	43,1 $\pm$ 8,3	28,8 $\pm$ 6,8**	28,2 $\pm$ 4,0**
TFG (mL/min)	0,59 $\pm$ 0,08	0,48 $\pm$ 0,09	0,53 $\pm$ 0,11	0,75 $\pm$ 0,13*#&	0,76 $\pm$ 0,22*#&

Fonte: O autor.

Os dados são expressos como Média $\pm$ EPM, * $p < 0,05$ (versus CO), ** $p < 0,01$ (versus CO), # $p < 0,05$ (versus EN), & $p < 0,05$ (versus LO). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5) DISCUSSÃO:

Vários trabalhos utilizaram a estreptozotocina (STZ) como agente indutor de DM1, droga altamente citotóxica para células beta pancreáticas (YOUNG et al, 1995; KALENDER et al, 2002; VOLPINI et al, 2003; GROSS et al, 2003; LI et al, 2009; MATAVELLI et al, 2012). Outra opção é a aloxana (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyura-cil), droga que provoca liberação súbita de insulina pelas células beta pancreáticas, seguida por completa supressão da resposta celular à glicose plasmática. Por conta desse efeito, experimentalmente vários animais morrem de hipoglicemia pós-indução, se não forem tratados com solução de glicose nas primeiras 24 horas. A aloxana é uma substância hidrofílica instável que adentra facilmente a célula beta e promove liberação de espécies reativas de oxigênio que fragmentam o DNA celular. Efeito bastante parecido ao da STZ, embora esta droga seja mais efetiva em induzir o DM, resultando em maior sucesso de indução (SZKUDELSKI, 2001). Neste trabalho, optou-se pela aloxana e o modelo de indução foi bastante satisfatório, pois após um jejum total (hídrico e alimentar) de 24 horas e administração endovenosa de aloxana na dose de 50mg/Kg de peso corporal, cerca de 90% dos animais tornaram-se diabéticos com glicemia extremamente elevada. Os níveis glicêmicos alcançados foram mais elevados que os encontrados por VOLPINI et al (2003), após a indução por STZ.

Além da hiperglicemia, foram constatados sintomas clássicos do quadro de DM em todos os animais, como poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso no decorrer do período de acompanhamento. Com tais níveis glicêmicos elevados (maior que 450 mg/dL), objetivou-se o desenvolvimento de ND sem a necessidade de uma nefrectomia unilateral (o que permitiria um desenvolvimento de lesão de ND com glicemias por volta de 300 mg/dL, como descrito em VOLPINI et al, 2003). Sendo assim, dado a hiperglicemia acima dos níveis da literatura, para se evitar uma maior mortalidade, optou-se pela manutenção desses animais por 3 meses, sem nefrectomia e com maiores níveis glicêmicos, cerca de 450 mg/dL, obtidos a partir de insulino terapia em dias alternados.

A partir das análises histológica e imunohistoquímica do tecido renal dos animais diabéticos CO, constatou-se aumento da deposição de colágeno nos glomérulos e compartimento tubulointersticial e presença de infiltrado inflamatório, além de expressão aumentada de α -SMA e poucas células em proliferação, fatores que podem ter contribuído para a reduzida TFG e importante proteinúria apresentadas por esses animais. A ND é

caracterizada por lesão glomerular, conforme já descrito previamente neste trabalho, com níveis aumentados de EUA, de microalbuminúria a macroalbuminúria (OLUGBENGA et al, 2004; GROSS et al, 2005; SCHMID & BERTOLUCI, 2009; SILVEIRO et al, 2010; BERHANE et al, 2011). Os principais componentes da MEC são fibronectina, laminina, tenascina e colágeno (tipo IV, V e VI) (KASHTAN, 1995). Entretanto, no glomérulo esclerótico, além desses componentes há também acúmulo de colágeno tipo I e tipo III, que geralmente não são detectados na MEC do glomérulo normal (HARALSON et al, 1987). O colágeno tipo IV é a proteína mais abundante na matriz mesangial (STRICKER et al, 1984) e sua deposição aumenta com a gravidade da doença glomerular (DOI et al, 1991).

Conforme descrito previamente, o DM lesa, seletivamente, células cujo transporte de glicose não se reduz com a hiperglicemia, como é o caso das células mesangiais, endoteliais da retina e neurônios de nervos periféricos, acarretando maior concentração intracelular de glicose. Vários são os mecanismos envolvidos no dano tecidual causado pela hiperglicemia como aumento do fluxo pela via dos polióis, o que aumenta a sensibilidade ao estresse oxidativo intracelular, produção intracelular aumentada de produtos avançados da glicação não-enzimática (AGEs), ativação da via da PKC e aumento da atividade da via das hexosaminas, gerando aumento de citocinas (BROWNLEE, 2005; TURATTI & RODRIGUES, 2005; SCHLEICHER & FRIESS, 2007; FUKAMI et al, 2008; HA et al, 2008; SOLDATOS & COOPER, 2008; ZIYADEH, 2008; LIM & TESH, 2012; BUREN & TOTO, 2013; KANASAKI et al, 2013; SUN et al, 2013). Estudos com cultura de células mesangiais constataram que a alta concentração de glicose estimulou a atividade de renina intracelular e a geração de AII, promovendo o crescimento celular, proliferação da MEC e inibindo a sua degradação (VIDOTTI et al, 2004).

Os demais animais tratados com medicamentos que interferem na atividade do SRAA (iECA, BRA, AL e bloqueio triplo) apresentaram alterações histológicas mais discretas, além de redução na expressão de α -SMA glomerular, o que garantiu melhor TFG e menor proteinúria, demonstrando novamente que o SRAA é um importante mediador dos danos renais provocados pelo DM. A redução da expressão tubulointersticial de α -SMA apresentada pelos animais tratados com EN, AL e bloqueio triplo foram superiores, inclusive, ao observado no grupo LO, além do AL e bloqueio triplo terem minimizado a diminuição do número de glomérulos por área de secção renal, que foi observada nos animais diabéticos (CO), embora não tenham ocorrido alterações na relação peso do rim/peso do corpo de todos os grupos estudados. Pacientes diabéticos submetidos a biópsia renal para investigação de

glomerulonefrite, sobreposta a ND (ESSAWY et al, 1997; PEDAGOGOS et al, 1997), apresentaram expressão de α -SMA glomerular, tubulointestinal e arteriolar, independente da presença de outra doença associada, sendo que esta característica associa-se a presença da proliferação mesangial e intersticial, auxiliando no estabelecimento da lesão glomerular e na progressão da ND (YOUNG et al, 1997; ESSAWY et al, 1997; PEDAGOGOS, 1997, YONEMOTO et al, 2006; LI et al, 2009). INSERRA et al (1996) e MIZUNO et al (1998) demonstraram uma redução da expressão de α -SMA tubulointersticial em camundongos tratados com enalapril. INSERRA et al (2009), avaliando efeitos do envelhecimento em ratos, verificaram uma redução da expressão de α -SMA após 18 meses de tratamento com enalapril e losartan, além de redução de proteinúria. O losartan também promoveu redução da expressão α -SMA glomerular em ratos diabéticos (TUFESCU et al, 2008). TUNÇDEMIR & OZTURK (2008) em experimentos com animais diabéticos tratados por 30 dias com perindopril (iECA) e irbesartan (BRA) em associação, mostraram uma baixa expressão de α -SMA glomerular, semelhante ao encontrado no grupo controle não-diabético. SATO et al (2012) demonstraram que o alisquereno diminuiu a expressão patológica de α -SMA, além de aumentar o fluxo sanguíneo glomerular em animais experimentais. Assim, a inibição do SRAA é um potencial alvo no tratamento e prevenção da ND.

Com relação à imunorreação para PCNA glomerular, um marcador de células em proliferação, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados, embora tenha ocorrido uma tendência ao aumento nos grupos EN e AL. Já no compartimento tubulointersticial, houve um aumento significativo das células proliferativas nos animais dos grupos EN e LO, quando comparados aos controles diabéticos. MAEDA et al (2003) constataram que ratos espontaneamente diabéticos apresentam pico de PCNA tecidual peritubular após 10 dias desenvolvimento de diabetes (fase aguda), sendo que, após este período, há uma queda rápida e progressiva, em 40 dias de acompanhamento. GROSS et al (2003) mostraram uma baixa expressão de PCNA em células tubulointersticiais de ratos diabéticos tratados com iECA. VOLPINI et al (2003) estudando os efeitos dos tratamentos com enalapril e losartan nos eventos que precedem a ND em ratos nefrectomizados unilateralmente, não observaram alterações significativas no número de células PCNA positivas glomerulares e tubulointersticiais, nem na expressão de α -SMA, nos grupos analisados, ressaltando-se que a indução do DM foi feita com STZ. Neste estudo, os animais foram acompanhados por 3 meses e os diabéticos apresentaram poucas células em proliferação no córtex renal, mas a insulino terapia e a inibição do SRAA com EN e LO pode

ter minimizado a perda de células proliferativas. No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram marcação para PCNA em quadros de DM induzido e concomitante administração de medicamentos que atuam no SRAA. Outra análise a ser considerada, é a realização de marcação para células em apoptose no córtex renal durante o DM, para se ter uma idéia do turnover celular ou relação proliferação/apoptose.

O presente estudo também demonstrou uma menor EUA e uma maior TFG em ratos diabéticos tratados com AL e bloqueio triplo, quando comparados aos controles diabéticos, o que evidencia a capacidade desta droga (monoterapia) e sua associação ao EN e LO em preservar a função renal, que tende a se deteriorar com a evolução do DM. Estudos mostram que albuminúria e TFG são importantes preditores de eventos cardiovasculares, insuficiência renal crônica terminal e mortalidade nos pacientes diabéticos (BERHANE et al, 2011). O efeito antiproteinúrico de iECA e BRA, os fazem drogas de primeira linha em pacientes diabéticos hipertensos com ND, promovendo a redução da proteinúria e prevenindo a progressão da nefropatia (BRENNER et al, 2001; KEANE & LYLE, 2003; HOOGWERF, 2010; SHLIPAK, 2010; KOBORI et al, 2013). O tratamento com alisquereno também promoveu redução da proteinúria em pacientes diabéticos hipertensos (PARVING, 2008). Efeitos similares foram encontrados com o bloqueio duplo do SRAA utilizando-se associação de iECA e BRA (PARVING et al, 2008; PICHLER & BOER, 2010; WERNER et al, 2010). Há meta-análises que mostram menor mortalidade em grupos de diabéticos tratados com iECA (VARK et al, 2012). O grande problema da associação está no potencial aumento de efeitos adversos com hipotensão e queda da TFG, evidenciado na associação de iECA e BRA e outros eventos cardiovasculares (infarto não fatal, acidente vascular cerebral) na associação AL e BRA (MANN et al, 2008, BONANI & VESTRA, 2012; McMURRAY et al, 2012; BUREN & TOTO, 2013; LIZAKOWSKI et al, 2013). Um dos efeitos colaterais da associação EN, LO e AL encontrado neste estudo foi a hipercalemia, registrada nos animais de todos os grupos, mas mais evidente nos grupos AL e bloqueio triplo, embora sem significância estatística. Também foram realizadas as dosagens plasmáticas de sódio e uréia, para as quais não houve alterações significativas entre os grupos estudados.

Os efeitos de associações entre medicamentos que interferem no SRAA são comuns na literatura e prática clínica. O bloqueio triplo utilizando-se iECA, BRA e bloqueador de receptor mineralocorticóide (antagonistas da aldosterona) já foi avaliado em pacientes renais crônicos e na nefropatia não-diabética, reduzindo a proteinúria (FURUMATSU et al, 2008; KURIYAMA et al, 2009). Outro exemplo de bloqueio triplo com combinação entre EN, LO e

AL foi analisado em pacientes com glomeruloesclerose segmentar focal e síndrome nefrótica após transplante renal, quando constatou-se também efeito antiproteinúrico (FREIBERGER et al, 2009). No entanto, os efeitos do bloqueio triplo com EN, LO e AL sobre o desenvolvimento da ND, ainda não tinham sido investigados.

Por fim, os dados apresentados neste estudo que foram, eventualmente, diferentes dos constantes na literatura, podem ser resultado de diferenças no protocolo experimental proposto, droga utilizada para indução do DM, níveis glicêmicos mantidos durante o tratamento e resposta da espécie animal utilizada.

6) CONCLUSÃO:

O AL, bem como sua associação ao EN e LO (bloqueio triplo) foram efetivos em minimizar a queda da TFG, mais do que a monoterapia com EN e LO, e reduzir a EUA apresentadas por animais diabéticos, possivelmente por promoverem redução na expressão de α -SMA no córtex renal desses animais e minimizarem as alterações estruturais renais observadas no DM.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, New York, v. 27, supplement, p. S5-S10, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. **Diabetes Care**, New York, v. 36, n. 4, p. 1033-1046, 2013.

ATLAS, S.A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, Alexandria, v. 13, n. 8, supplement, p. S9-S20, 2007.

AZIZI, M. et al. Pharmacologic demonstration of the synergic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist vasartan on the angiotensin II – renin feedback interruption. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 15, p. 3126-3133, 2004.

BALBI, A.P.C. et al. MAPK and angiotensin II receptor in kidney of newborn rats from losartan-treated dams. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 23, p. 1433-1444, 2008.

BERHANE, A.M., et al. Albuminuria and estimated glomerular filtration rate as predictors of diabetic end-stage renal disease en death. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington v. 6, n. 10, p. 2444-2451, 2011.

BIANCHI, S.; BIGAZZI, R.; CAMPESE, V.M. Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in pacientes with chronic kideny disease. **Kidney International**, New York, v. 70, p. 2116-2123, 2006.

BRENNER, B.M. et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 345, n. 12, p. 861-869, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, Alexandria, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

BONANI, L.; VESTRA, M.D. Oral Renin inhibitors in clinical practice: a perspective review. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, Los Angeles, v. 3, n. 4, p. 173-181, 2012.

BUREN, P.N.V.; TOTO, R. Current uptodate in the management of diabetic nephropathy. **Current Diabetes Reviews**, Saif Zone, v. 9, p. 62-77, 2013.

CAGNONI, F. et al. Blocking the RAAS at different levels: an uptodate on the use of the direct renin inhibitors alone and in combination. **Vascular Health and Risk Management**, Auckland, v. 6, p. 549-559, 2010.

CAREY, R.M. Antihypertensive and renoprotective mechanisms of renin inhibition in diabetic rats. **Hypertension**, Dallas, v. 52, p. 53-64, 2008.

CHAN, J.C.N. et al. Renin angiotensin aldosterone system blockade and renal disease in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, New York, v. 27, p. 874-879, 2004.

CROWLEY, S.D.; COFFMAN, T.M. Recents advances involving the renin-angiotensin system. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 318, n. 9, p. 1049-1056, 2012.

CLOSE, B. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. **Laboratory Animals**, London, v. 30, p. 293-316, 1996.

CLOSE, B. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. **Laboratory Animals**, London, v. 30, p. 293-316, 1997.

DIB, S.A; CHACRA, A.R. Diabete Melito tipo 1. In: SAAD, M.J.A.; MACIEL, M.B.; MENDONÇA, B.B. (ORG.). **Endocrinologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. p. 705-737.

DELEA, T.E. et al. Cost-effectiveness of aliskiren in type 2 dibetes, hypertension, and albuminuria. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 20, p. 2205-2213, 2009.

DOI, T. et al. Glomerulosclerosis in mice transgenic for growth hormone. Increased mesangial extracellular matrix is correlated with kidney mRNA levels. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 173, n. 5, p. 1287-1290, 1991.

DOULTON, T.W.R.; MACGREGOR, G.A. Combination renin-angiotensin system blockade with the renin inhibitor aliskiren in hypertension. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, London, v. 10, n.4, p. 185-189, 2009.

DORNAS, W.C. et al. Aloxano e diabetes. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 81-87, 2006.

DURVASULA, R.V.; SHANKLAND, S.J. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 294, p. F830-F839, 2008.

EPSTEIN, M. Aldosterone as a mediator of progressive renal disease: pathogenic and clinical implications. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 37, n. 4, p. 677-688.

ESSAWY, M. et al. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 43-50, 1997.

FELDMAN, D.L. et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG (mRen-2)27 rats. **Hypertension**, Dallas, n. 52, p. 130-136, 2008.

FLECKNELL, P.A. Anaesthesia of animals for biomedical research. **British Journal of Anaesthesia**, London, v. 71, n.6 , p. 885-894, 1993.

FREIBERGER, V. et al. Effect of a triple blockade of the renin-angiotensin-system in recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation. **Transplantation International**, Heidelberg, v. 22, n. 11, p. 1110-3, 2009.

FUKAMI, K. et al. Role of AGEs in Diabetic Nephropathy. **Current Pharmaceutical Desing**, Schipol, v. 14, p. 946-952, 2008.

FURUMATSU, Y. et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system triple blockade on non-diabetic renal disease: addition of an aldosterone blocker, spironolactone, to combination treatment with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker. **Hypertension Research**, Toyonaka, v. 31, n. 1, p. 59-67, 2008.

GRACIANO, M.L.; NORONHA, I.L. Peptídeos Vasoativos e o Rim. In: RIELLA, M.C. (ORG.). **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010. p. 70-95.

GROSS, M.L. et al. Renal damage in the SHR/N-cp type 2 diabetes model: Comparision of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and endothelin receptor blocker. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 83, n. 9, p. 1267-1277, 2003

GROSS, J.L. et al. Nefropatia Diabética. In: LYRA, R.; CAVALCANTI, N. (ORG.). **Diabetes melittus**. Rio de Janeiro: Sanofi Aventis, 2005. p. 511-528.

GROSS, J.L. et al. Nefropatia Diabética. In: SAAD, M.J.A.; MACIEL, M.B.; MENDONÇA, B.B. (ORG.). **Endocrinologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. p. 859-877.

HA, H. et al. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 82, supplement, s42-s45, 2008.

HALL, P.A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: the index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **The Journal of Pathology**, London v. 162, p. 285-294, 1990.

HARALSON, M.A.; JACOBSON, H.R., HOOVER, R.L. Collagen polymorphism in cultured rat kidney mesangial cells. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 57, n. 5, p. 513-523, 1987.

HOOGWERF, B.J. Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 105, n. 1, supplement, p. 30A-35A, 2010

IGNOTZ, R.A.; ENDO, T.; MASSAGÉ, J. Regulation fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, p. 6443-6446, 1987

INSERRA, F. et al. Renal interstitial sclerosis in aging: effects of enalapril and nifedipine. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 7, n. 5, p. 676-680, 1996.

INSERRA, F. et al. Changes seen in the aging kidney and effect of blocking the renin-angiotensin system. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, London, v.3, n. 5, p. 341-346, 2009.

JOHNSON, R.J. et al. Expression of smooth cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 87, p. 847-858, 1991.

KAGAMI, S. Involvement of glomerular renin-angiotensin system (RAS) activation in the development and progression of glomerular injury. **Clinical and Experimental Nephrology**, Tokyo, v. 16, p. 214-220, 2012.

KANASAKI, K. et al. Renal morphologic lesions reminiscent of diabetic nephropathy. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 4, artigo ,p. 1-15, 2013.

KANASAKI, K.; TADURI, G.; KOYA, D. Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 4, artigo 7, p. 1-15, 2013.

KASHTAN, C.E. Clinical and molecular diagnosis of Alport syndrome. **Proceedings of the Association of American Physicians**, Cambridge, v. 107, n. 3, p. 306-313, 1995.

KALENDER, B. et al. Renoprotective effects of valsartan and enalapril in STZ-induced diabetes in rats. **Acta Histochemica**, Germany, v. 104, n. 2, p. 123-130, 2002.

KEANE, W.F.; LYLE, P.A. Recent advances in management of type 2 diabetes and nephropathy: Lessons from the RENAAL study. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 41, n. 3, supplement, p. S22-S-25, 2003.

KIRSZTAJN, G.M.; BARROS, E.G. Proteinúria e microalbuminúria: determinação em urina de 24 horas ou em amostra isolada de urina ? In: **Diagnóstico Laboratorial em Nefrologia**. São Paulo: Sarvier, 2010. p. 56-69.

KLIEM, V. et al. Mechanism involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney International**, New York, v. 49, supplement, p. 666-678, 1996.

KOBORI, H. et al. Angiotensin II blockade and renal protection. **Current Pharmaceutical Design**, Schipol, v. 19, n. 17, p. 3033-3042, 2013.

KURIYAMA, S. et al. Successful effect of triple blockade of renin-angiotensin-aldosterone system on massive proteinuria in a patient with chronic kidney disease. **Clinical and Experimental Nephrology**, Tokyo, v. 13, n. 6, p. 663-666, 2009.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LI, J.; QU, X.; BERTRAM, J.F. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 175, n. 4, p. 1380-1388, 2009.

LIM, A.K.H.; TESCH, G.H. Inflammation in diabetic nephropathy. **Mediators of Inflammation**, Oxford, p. 1-12, 2012.

LIZAKOWSKI, S.; TYLICKI, L.; RUTKOWSKI, B. Direct Renin inhibition – a promising strategy for renal protection?. **Medical Science Monitor**, Warsaw, v. 19, p. 451-457, 2013.

LV, J et al. Antihypertensive agents for preventing diabetic kidney disease. **The Cochrane Database Systematic Reviews**, Oxford, n.12, 2012.

MAKINO, H. et al. Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. **Diabetes**, Alexandria, v. 45, p. 488-495, 1996.

MANN, J.F.E. et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. **Lancet**, London, v. 372, p. 547-553, 2008.

MAEDA, M. et al. Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 187-195, 2003.

MCMURRAY, J.J.V. et al. Aliskiren, ALTITUDE, and the implications for ATMOSPHERE. **European Journal of Heart Failure**, Amsterdam, v. 14, p. 341-343, 2012.

MARTINS-OLIVEIRA, A. et al. Contrasting effects of aliskiren *versus* losartan on hypertensive vascular remodeling. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, in press, 2012. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br>.

MARQUEZ, M.G. et al. Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. **Anatomy and Embryology**, Berlin, n. 205, v. 5-6, p. 431-40, 2002.

MATAVELLI, L.C.; HUANG, J.; SIRAGY, H.M. Combined aliskiren and amlodipine reduce albuminuria via reduction in renal inflammation in diabetic rats, **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, New York, v. 59, n. 3, p. 281-287, 2012.

NAHAS, E.M. et al. Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. **Kidney International**, New York, v. 49, supplement, p. S23-S27, 1996.

MIZUNO, S. et al. Preventive effect of ACE inhibitor on interstitial myofibroblast formation and matrix deposition in a nephrotic model. **Renal Failure**, London, v. 20, n. 3, p. 481-491, 1998.

O'DONNELL, M.P et al. Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 2, p. 2339-2347, 1998.

OLUGBENGA, E. et al. Diabetic nephropathy: a review of the natural history, burden, risk factors and treatment. **Journal of the National Medical Association**, Washington, v. 96, n.11, p. 1445-1454, 2004.

PARVING, H.H. et al. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 358, n. 23, p. 2433-2446, 2008.

PICHLER, R.H.; BOER, I.H.D. Dual renin-angiotensin-aldosterone system blockade for diabetic kidney disease. **Current Diabetes Reports**, Philadelphia, v. 10, p. 297-305, 2010.

PEDAGOGOS, E. et al. Myofibroblasts and arteriolar sclerosis in human diabetic nephropathy. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 29, n. 6, p. 912-918, 1997.

POOL, J. Direct renin inhibition: focus on aliskiren. **Journal of Managed Care Pharmacy**, Alexandria, v. 13, n. 8, supplement, p. S21-S33, 2007.

RAVID, M. Dual Blockade of the renin-angiotensin system in diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 32, supplement, S410-S413, 2009.

SARAFIDIS, P.A. Effects of renin-angiotensin system blockers on renal outcomes and all-cause mortality in patients with diabetic nephropathy: an updated meta-analysis. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 21, n. 8, p. 922-929, 2008.

SATO, A. et al. Local delivery of a direct renin inhibitor into the kidney ameliorates progression of experimental glomerulonephritis. **Clinical and Experimental Nephrology**, Tokyo, v. 16, n. 4, p. 539-548, 2012.

SCHJOEDT, K.J. et al. Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. **Kidney International**, New York, v. 68, p. 2829-2836, 2006.

SCHLEICHER, E.; FRIESS, U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. **Kidney International**, New York, v. 72, supplement, p. S17-S26, 2007.

SCHIMID, H.; BERTOLUCI, M.C. Tratamento das complicações crônicas do diabetes. In: GRAF, H.; CLAPAUCH, R.; LYRA, R. (ORG.). **Programa de Atualização em Endocrinologia e Metabologia**. Porto Alegre: Artmed/Panamericana Editora, 2009. p. 101-158.

SHLIPAK, M. Diabetic nephropathy: preventing progression. **Clinical Evidence**, p. 1-18, 2010.

SILVEIRO, S.P. et al. Nefropatia Diabética. In: RIELLA, M.C. (ORG.). **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010. p. 556-570.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC); SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (SBH); SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, supplement, p. 1-51, 2010.

SOLDATOS, G; COOPER, M.E. Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 82, supplement, s75–s79, 2008.

SUN, Y.M. et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. **Biochemical and Biophysical Research and Communications**, New York, v. 433, p. 359-361, 2013.

SUSANTITAPHONG, P. et al. Efficacy and safety of combined vs. single renin-angiotensin-aldosterone system blockade in chronic kidney disease: a meta-analysis. **American Journal of Hypertension**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 434-441, 2013.

STRIKER, G.E. et al. Isolation, characterization, and propagation in vitro of human glomerular endothelial cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 160, n. 1, p. 323-328, 1984.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, Praha, v. 50, p. 536-546, 2001.

TRIMARCH, H. Role of aliskiren in blood pressure control and renoprotection. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, Auckland, v.4, p. 41-48, 2011.

TUFESCU, A. et al. Combination of exercise and losartan enhances renoprotective and peripheral effects in spontaneously type 2 diabetes mellitus rats with nephropathy. **Journal of Hypertension**, London, v. 26, n. 2, p. 312-321, 2008.

TUNÇDEMİR, M., OZTURK, M. The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Molecular Histology**, Dordrecht, v. 39, p. 605-61, 2008.

TURATTI, L.A.A.; RODRIGUES, A.C. Mecanismos das complicações diabéticas micro e macrovasculares.. In: LYRA, R.; CAVALCANTI, N. (ORG.). **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: São Paulo: Sanofi Aventis, 2005. p. 491-499.

TYLICKI, L. et al. Triple pharmacological blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in nondiabetic CKD: an open label crossover randomized trial. **American Journal of Kidney Diseases**, New York, v. 52, n. 3, p. 486-493, 2008.

VARK, L.C.V. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158995 patients. **European Heart Journal**, London, v. 33, p. 2088-2097, 2012.

VEJAKAMA, P. et al. Reno-protective effects of renin-angiotensin system blockade in type 2 diabetic patients: a systematic review and network meta-analysis. **Diabetologia**, Berlin, v. 55, p. 566-578, 2012.

VIDOTTI, D.B. et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 286, p. F1039-F1045, 2004.

VOLPINI, R.A., et al. Effect of enalapril and losartan on the events that precede diabetic nephropathy in rats. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 43-51, 2003.

WERNER, C.; PÖSS, J.; BÖHM, M. Optimal antagonism of the renin-angiotensin-aldosterone system: do we need dual or triple therapy? **Drugs**, New York, v. 70 n. 10, p. 1215-1230, 2010.

X, R. et al. Ibersartan ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expression of connective tissue growth factor and alpha-smooth-muscle actin in tubulointerstitium of diabetic rats. **Pharmacology**, Basel, v. 83, n. 2, p. 80-87, 2009.

YONEMOTO, S. et al. Correlations of tissue macrophages and cytoskeletal protein expression with renal fibrosis in patients with diabetes mellitus. **Clinical and Experimental Nephrology**, Tokyo, v. 10, p. 186-192, 2006.

YOUNG, B.A. et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. **Kidney International**, New York, v. 47, p. 935-944, 1995.

ZANELLA, M.T. Efeito do sistema renina-angiotensina-aldosterona nas complicações diabéticas. In: LYRA, R.; CAVALCANTI, N. (ORG.). **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: São Paulo: Sanofi Aventis, 2005. p. 501-510.

ZATZ, R. **Série Fisiopatologia Clínica – Fisiologia Renal**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

ZECCHIN, H.G.; SAAD A.R. Bases Moleculares do Diabetes Tipo 2. In: SAAD, M.J.A.; MACIEL, M.B.; MENDONÇA, B.B. (ORG.). **Endocrinologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. p. 739-766.

ZIYADEH, F.N. Different roles for TGF- β and VEGF in the pathogenesis of the cardinal features of diabetic nephropathy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 82, supplement, s38–s41, 2008.