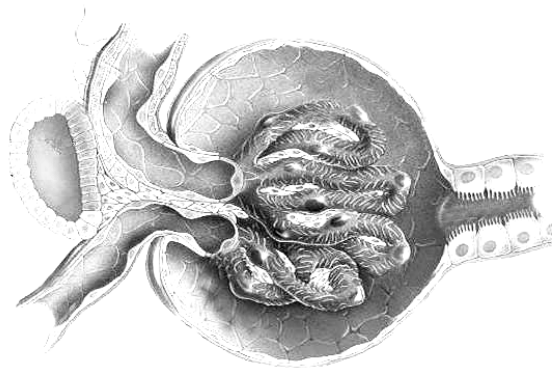




U. PORTO
FMUP FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

EFEITO DAS INTERAÇÕES ADENOSINA-ANGIOTENSINA II SOBRE A DEPURAÇÃO RENAL NUM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

DANIELA SOUTO PATINHA



© John Wiley & Sons, Inc.

SETEMBRO DE 2008

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Bioquímica apresentada à
Universidade da Beira Interior

Orientador: Prof^a. Doutora Manuela Sofia Rodrigues Morato (Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e Investigadora no Instituto de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)

Co-orientador : Prof^a. Doutora Cândida Assunção Teixeira Tomaz (Professora Auxiliar com Nomeação Definitiva da Universidade da Beira Interior)

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o culminar de um objectivo académico a que me propus e que não seria possível sem a ajuda de um número considerável de pessoas, das quais se destacam:

A Doutora Manuela Morato pela hábil direcção e apoio na superação dos diversos obstáculos, pela perspicácia, conhecimento e sugestões transmitidas durante a elaboração da dissertação. O meu sincero e alargado obrigado por todo apoio, dedicação, atenção, motivação e confiança depositada, pelas agradáveis conversas e momentos de descontração proporcionados;

A Doutora Cândida Tomaz pela disponibilidade e cooperação;

O Professor António Albino Teixeira pela forma cativante como me recebeu;

Os meus colegas do grupo de investigação pela receptividade, companhia e partilha de conhecimentos;

Os companheiros de corredor do Instituto de Farmacologia e Terapêutica pela contribuição na elaboração técnica desta tese, pela constante boa-disposição e sobretudo pelo bem-estar que me proporcionaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria ainda de assinalar o meu apreço e carinho aos amigos que se mantiveram presentes e participativos ao longo de mais um desafio no meu percurso académico.

Finalmente, aos meus pais e irmão, por tudo.

ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
ABREVIATURAS.....	III
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES.....	1
1.2. O RIM COMO ALVO DA DIABETES MELLITUS.....	2
1.3. ADENOSINA E NEFROPATIA DIABÉTICA.....	6
1.4. ANGIOTENSINA II E NEFROPATIA DIABÉTICA.....	8
1.5. INTERAÇÕES ADENOSINA-ANGIOTENSINA II E NEFROPATIA DIABÉTICA.....	10
1.6. OBJECTIVOS.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1. ANIMAIS E INDUÇÃO DA DIABETES.....	12
2.2. IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR.....	12
2.2.1 <i>PROCEDIMENTO CIRÚRGICO</i>	12
2.2.2 <i>PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</i>	13
2.2.3 <i>DOSEAMENTOS</i>	14
2.2.4 <i>CÁLCULO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR</i>	15
2.2.5 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	15
2.3. EFEITO DA 2-CLOROADENOSINA SOBRE A LESÃO RENAL EM ANIMAIS COM DIABETES EXPERIMENTAL.....	15
2.3.1 <i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</i>	15
2.3.2 <i>DOSEAMENTOS</i>	17
2.3.3 <i>CÁLCULO DA CLEARANCE DE CREATININA</i>	17
2.3.4 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	17
2.4. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	18
3. RESULTADOS.....	19
3.1. IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR.....	19
3.2. EFEITO DA 2-CLOROADENOSINA SOBRE A LESÃO RENAL EM ANIMAIS COM DIABETES EXPERIMENTAL.....	23
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	30
4.1. IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR.....	31
4.2. EFEITO DA 2-CLOROADENOSINA SOBRE A LESÃO RENAL EM ANIMAIS COM DIABETES EXPERIMENTAL.....	36
5. REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

A nefropatia diabética é a principal causa de falência renal e, conseqüentemente, factor determinante de morbilidade e mortalidade relacionada com a diabetes mellitus (DM). No estado inicial da DM verifica-se hiperfiltração glomerular. A função glomerular pode ser estimada pela quantificação da taxa de filtração glomerular (GFR). A adenosina regula a GFR, modula o sistema renina-angiotensina (RAS) e o mecanismo de feedback tubuloglomerular. A actividade do RAS renal encontra-se aumentada na nefropatia diabética e contribui para a lesão progressiva da barreira de filtração glomerular. O bloqueio do RAS constitui uma abordagem terapêutica fundamental em doentes diabéticos. O efeito inibitório da adenosina sobre o RAS pode ser importante neste contexto, podendo a adenosina constituir um importante novo alvo terapêutico no contexto da nefropatia diabética. Foram objectivos deste trabalho a implementação de uma metodologia para quantificar a GFR, caracterizar os efeitos da 2-cloroadenosina (2CADO), um análogo estável da adenosina, sobre a função de renal de ratos com diabetes experimental induzida por injeção de estreptozotocina, e relacioná-los com a actividade do RAS renal.

Da implementação da metodologia para quantificar a GFR, foi possível concluir que o melhor método inclui a injeção intravenosa de inulina radioactiva ou fluorescente e determinação do time-course do decaimento no plasma. A administração intraperitoneal de 2CADO aos ratos diabéticos atenuou o não aumento de peso corporal e o aumento da ingestão de comida e bebida, e da excreção de urina. Além disso, atenuou a excreção urinária de glicose e de ureia e normalizou a excreção urinária de proteínas. Os ratos diabéticos apresentaram uma excreção urinária da angiotensinogéneo superior à dos ratos controlo e a 2CADO não alterou este resultado.

Os resultados com a 2CADO demonstram a sua influência benéfica na nefropatia diabética. Estes efeitos da 2CADO podem estar relacionados com a capacidade para baixar a glicemia e melhorar a resistência à insulina mas também com efeitos renais directos e indirectos. São necessários, no entanto, estudos mais aprofundados para avaliar se a interacção adenosina/Ang II participa nesta renoprotecção indirecta.

Palavras chave: Nefropatia Diabética; Adenosina; Angiotensina II.

ABSTRACT

Diabetic nephropathy is the main cause for end-stage renal disease and, consequently, a determinant factor to morbidity and mortality related to diabetes mellitus (DM). Initially, DM is characterized by glomerular hyperfiltration. Glomerular function can be estimated by quantification of glomerular filtration rate (GFR). Adenosine regulates GFR, modulates the renin-angiotensin system (RAS) and the tubuloglomerular feedback. Renal RAS activity is enhanced in diabetic nephropathy and contributes to impairment of glomerular filtration barrier. Pharmacological agents that inhibit RAS have been recommended to diabetic patients. Adenosine inhibitory effect of RAS can be important in this context as a new therapeutical target in diabetic nephropathy. The aims of these study were to implement a new method for GFR quantification and to characterize the effects of 2-chloroadenosin (2CADO), a stable and non-metabolized analogue of adenosine, in renal function of estreptozotocin-induced diabetic rats and relate them with renal RAS activity.

Our results show that the most accurate way to quantify GFR is to inject radioactive or fluorescent inulin, intravenously, and follow plasma decay time-course. The intraperitoneal administration of 2CADO, to estreptozotocin-induced diabetic rats, attenuates the arrest of body weight, and food and water intake, and urine excretion. Furthermore, it attenuates the urinary excretion of glucose and urea and normalizes protein excretion. Estreptozotocin-induced diabetic rats excreted more angiotensinogen than control rats, and 2CADO administration did not change these result.

Taken together, the results express the beneficial effect of 2CADO in diabetic nephropathy. 2CADO effects may be related to the capacity to improve glicemia and insulin resistance, but also with direct and indirect renal effects. Further studies are required to evaluate if the adenosine/angiotensin II interaction participates in these indirect renoprotection.

Keywords: Diabetic nephropathy; Adenosine; Angiotensin II.

ABREVIATURAS

2CADO	2-cloroadenosina
Ang II	Angiotensina II
ATP	Adenosina trifosfato
DM	Diabetes mellitus
DPSPX	1,3-dipropil-8-sulfopenilxantina
GFR	Taxa de filtração glomerular
IV	Intravenoso
RAS	Sistema renina-angiotensina
STZ	Estreptozotocina
TGF	Feedback tubuloglomerular

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a diabetes atinge aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo o mundo e estima-se que até 2025 o número de doentes chegue aos 300 milhões (6% da população mundial)¹. A diabetes mellitus (DM) assumiu recentemente proporções epidémicas, em parte devido ao aumento de 2 a 5% de incidência da diabetes tipo I em crianças². A DM é uma doença metabólica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia) e na urina (glicosúria). Segundo a Associação Americana de Diabetes, concentrações plasmáticas de glicose superiores a 126 mg/dL após um período de 8 h de jejum, concentrações de glicose superiores a 200 mg/dL no teste de tolerância a glicose ou indícios de hiperglicemia como poliúria, polidipsia e perda inexplicada de peso, são indicadores clínicos de diabetes³. A DM pode ser classificada em dois tipos. Na DM tipo 1, a produção de insulina é insuficiente devido à destruição das células β do pâncreas. Na DM tipo 2 observa-se uma menor sensibilidade à insulina (resistência à insulina). A falta de insulina ou a resistência à mesma afecta o metabolismo de hidratos de carbono, ácidos gordos e proteínas. Este distúrbio metabólico apresenta como órgãos-alvo o coração, os olhos, o cérebro e o rim.

1.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIABETES

Os resultados com a 2CADO demonstram a sua influência benéfica na nefropatia diabética. Estes efeitos da 2CADO podem estar relacionados com a capacidade para baixar a glicemia e melhorar a resistência à insulina mas também com efeitos renais directos e indirectos. São necessários, no entanto, estudos mais aprofundados para avaliar se a interacção adenosina/Ang II participa nesta renoprotecção indirecta.

No estudo da diabetes tipo I e tipo II são frequentemente usados modelos animais⁴. No caso da diabetes tipo I existem modelos espontâneos como o rato BB (bio breeding) ou o rato LETL (Long Evans Tokushima Lean), ambos muito dispendiosos⁴. A DM tipo I pode ser induzida experimentalmente de várias formas. Um dos métodos consiste em remover o pâncreas^{4,5}. Este procedimento cirúrgico implica a remoção de

90-95% do órgão, caso contrário as ilhéus de Langerhans remanescentes podem secretar a quantidade de insulina suficiente para satisfazer as necessidades metabólicas⁵. Outra das formas é a administração de fármacos que lesam as células β pancreáticas, como é o caso do aloxano⁶ e da estreptozotocina (STZ)⁷. O aloxano é uma substância hidrofílica e instável. O efeito necrótico sobre as células pancreáticas é responsável pela indução de diabetes tipo I. O intervalo de concentração de aloxano para indução de diabetes é muito estreito; uma sobredosagem, ainda que ligeira, pode resultar na morte dos animais devido ao efeito tóxico sobre as células tubulares renais⁸. O aloxano não é, por isso, muito usado na indução experimental da diabetes tipo I. A STZ é um derivado da nitrosurea isolado de *Streptomyces achromogenes*, também conhecido pela sua actividade antibiótica e anti-neoplásica⁹. O uso de STZ inicia uma resposta autoimune que resulta na destruição das células β das ilhotas de Langarhans, dando origem a DM num período de 2-4 dias⁷. Verifica-se hiperglicemia, hipoinsulinemia, polifagia, poliúria e polidipsia^{5,10,11}. Hiperfiltração, subsequente proteinúria¹² e dano estrutural glomerular¹³ ocorrem com o passar do tempo. Na primeira semana após tratamento com STZ verifica-se um aumento marcado da taxa de filtração glomerular (GFR - glomerular filtration rate) e da proteinúria. A GFR começa a diminuir, na quinta semana, até valores semelhantes aos de ratos controlo, enquanto que a excreção urinária de proteínas vai aumentando ao longo do tempo¹⁴. A glicose plasmática aumenta nos primeiros dias após indução de diabetes com STZ e depois mantém-se constante ao longo do tempo^{14,15}. Este modelo tem sido extensivamente usado para clarificar a fisiopatologia da nefropatia diabética por ser simples, de baixo custo e de fácil acesso.

1.2. O RIM COMO ALVO DA DIABETES MELLITUS

Os rins desempenham um papel central na manutenção da homeostase, por adaptarem a excreção renal de fluidos e electrólitos às necessidades corporais. Cada rim é composto por duas regiões distintas: o córtex, região mais externa, e a medula, região mais interna (figura 1 A e B). A unidade funcional do rim é o nefrónio (figura 1 C). Cada nefrónio é composto por um glomérulo, onde ocorre a filtração sanguínea, e um túbulo ao longo do qual o fluido filtrado é convertido em urina. O glomérulo consiste numa

extensa rede de capilares localizados na cápsula de Bowman. Os nefrónios podem ser classificados como corticais ou justaglomerulares. Nos primeiros, o glomérulo situa-se no córtex externo e as ansas de Henle são pequenas (apenas uma pequena parte penetra na medula). Nos nefrónios justaglomerulares, o glomérulo está localizado no córtex, perto da medula, e as ansas de Henle são longas e penetram na medula. Os túbulos apresentam regiões com diferentes características. À parte inicial denominada túbulo proximal, segue-se a ansa de Henle, o túbulo contornado distal e, finalmente, o ducto colector. Os nefrónios regulam o volume plasmático e os equilíbrios hidrostático, ácido-base e electrolítico corporais, através da filtração sanguínea sob pressão e posterior reabsorção e secreção de uma percentagem de fluido e moléculas.

Duas das principais acções que ocorrem no rim são a filtração glomerular e o feedback tubuloglomerular (TGF - tubuloglomerular feedback). A GFR, que reflecte a quantidade de fluido filtrada pelo glomérulo, permite estimar a função glomerular. A clearance da inulina plasmática é um bom indicador da GFR, uma vez que a inulina é livremente filtrada pelo glomérulo e não sofre reabsorção ou secreção ao longo do nefrónio¹⁷. A inulina é, por isso, considerada a substância de referência para quantificar a GFR^{18,19,20}. A determinação da clearance de inulina, no Rato, implica a infusão contínua da mesma e a recolha de amostras de sangue e de urina, a intervalos constantes. Os animais têm de ser previamente sujeitos a cirurgia para canular uma veia, uma artéria e a bexiga, de modo a permitir a infusão de inulina e a recolha de amostras de sangue e de urina, respectivamente.

A autorregulação renal é definida como a capacidade para manter constante o fluxo sanguíneo e a GFR numa larga escala de pressão de perfusão²¹. Deste modo, a entrada de solutos no sistema tubular é relativamente estável, o que permite uma regulação precisa da reabsorção e da secreção. Existem dois mecanismos responsáveis pela autorregulação: a resposta miogénica e o TGF. A resposta miogénica é uma propriedade intrínseca da vasculatura, relacionada com a contracção das fibras do músculo liso dos vasos, o que aumenta a pressão de perfusão. O aparelho justaglomerular (figura 1 D), pequena região de contacto entre as arteríolas aferente e eferente e o túbulo contornado distal, é formado por células da mácula densa (na porção inicial do túbulo distal) e células justaglomerulares (localizadas na parede das arteríolas aferente e eferente). Quando se verificam alterações na concentração de soluto, as células da mácula densa transmitem informação à arteríola aferente e às células mesangiais para contraírem ou dilatarem, e assim manterem constante a composição do fluido filtrado²². Este processo é denominado por TGF.

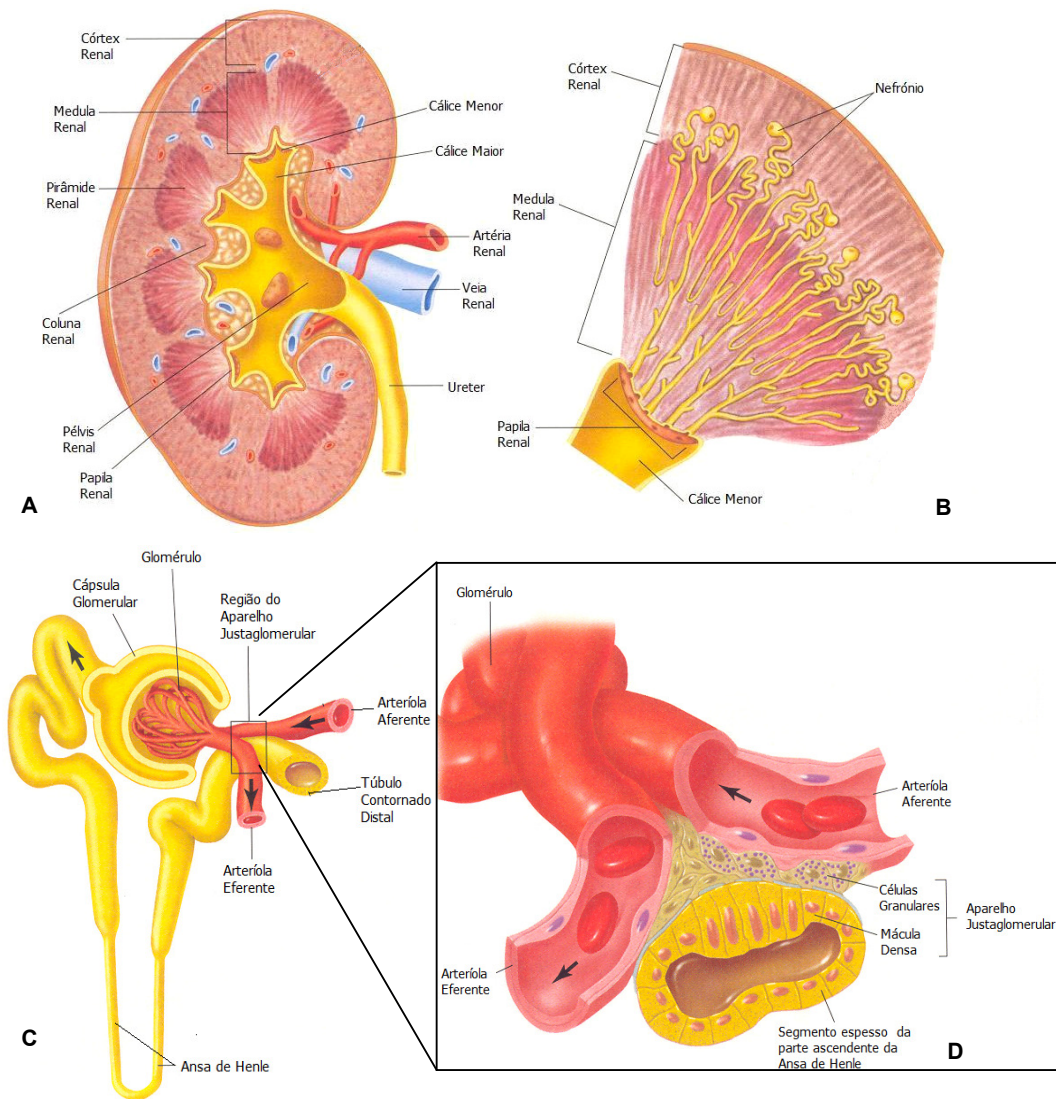


Figura 1. Representação esquemática da anatomia renal **A)** secção renal com os vários componentes, **B)** pirâmide renal, **C)** nefrônio e **D)** aparelho justaglomerular (adaptado de¹⁶).

A nefropatia diabética é a principal causa de falência renal²³ e, conseqüentemente, factor determinante de morbidade e mortalidade relacionada com a DM. O estado inicial da diabetes é caracterizado por hiperfiltração glomerular^{12,24} e desregulação da contractilidade vascular²⁵, o que está intimamente relacionado com a progressão da nefropatia diabética^{24,26}. A nefropatia diabética é também caracterizada por alterações ultraestruturais nos compartimentos renais. As alterações incluem espessamento da membrana basal glomerular²⁷ e proliferação das células mesangiais ou intersticiais.

Subsequentemente, verifica-se deposição marcada de matriz extracelular, com oclusão capilar glomerular e atrofia tubular, que causam glomeruloesclerose (figura 2) e fibrose tubulointersticial, respectivamente^{28,29,30}. Albuminúria, uremia e hiperfiltração no estado inicial, com posterior diminuição progressiva da função renal e elevação da pressão arterial, são indicadores clínicos que acompanham o desenvolvimento da nefropatia diabética³¹. O controlo rigoroso da glicemia e da pressão arterial são fundamentais para retardar a progressão da lesão renal na diabetes³². No entanto, não existe nenhum tratamento que pare ou reverta a diminuição progressiva da função renal.

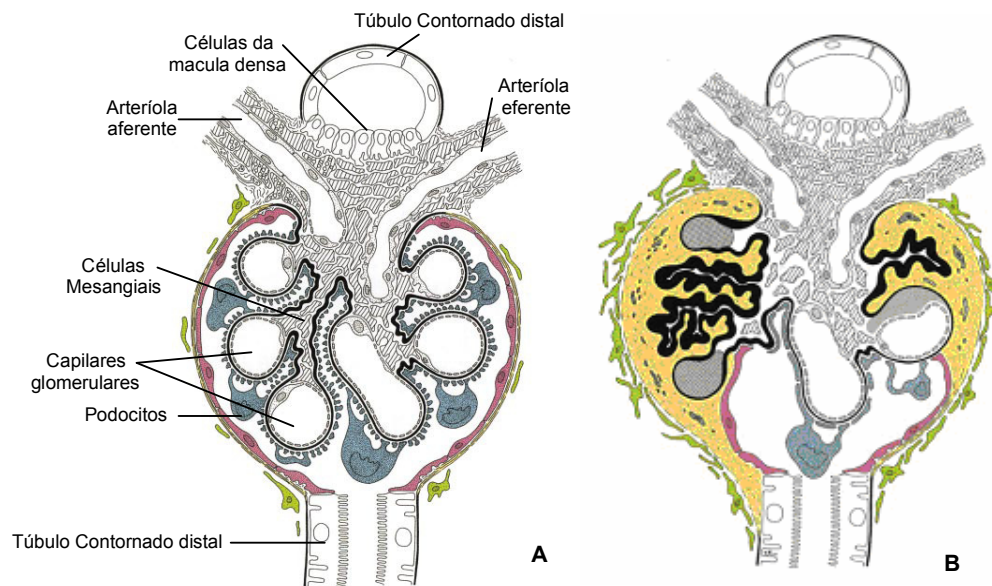


Figura 2. Representação esquemática de (A) glomérulo normal, (B) glomérulo esclerótico. (adaptado de³³)

1.3. ADENOSINA E NEFROPATIA DIABÉTICA

A adenosina é uma purina ubiqüitária que desempenha importantes acções no rim. As acções renais da adenosina são mediadas por receptores A_1 e A_2 , que se encontram acoplados a proteínas G_i e G_s , respectivamente^{34,35}. A estimulação de receptores A_1 causa contracção da arteríola pré-glomerular (arteríola aferente; figura 1 D)^{36,37} e contracção glomerular³⁸. Os receptores A_{2A} e A_{2B} medeiam a vasodilatação³⁵. Apesar de a adenosina ser predominantemente vasodilatadora no coração e noutros tecidos vasculares não renais, no rim funciona como vasoconstritora³⁹ da porção pré-glomerular da arteríola aferente.

A adenosina renal pode ter origem na desfosforilação sequencial de adenosina trifosfato (ATP) intracelular – via intracelular⁴⁰, na libertação de nucleotidos de adenina convertidos a adenosina por acção de ecto-enzimas – via extracelular⁴¹, ou na hidrólise de S-adenosil-L-homocisteína que origina L-homocisteína e adenosina – via da transmetilação⁴².

A adenosina participa na regulação da função renal, nomeadamente na regulação da GFR^{39,43,35}. Como já foi referido, o aparelho justaglomerular (figura 1 D) é um importante regulador do balanço entre a GFR e a reabsorção tubular. O mecanismo de TGF faz o balanço entre a reabsorção tubular e o fluido filtrado, por regulação da GFR⁴⁴. Em situações de fluxo tubular aumentado verifica-se um aumento da incorporação de sódio nas células da mácula densa⁴⁵. A posterior libertação do mesmo para o espaço extracelular implica o consumo de ATP^{46,47}. A adenosina, formada por degradação do ATP, pode depois difundir-se no interstício renal e activar receptores A_1 localizados na arteríola aferente adjacente, resultando em vasoconstricção da mesma. A vasoconstricção provocada funciona como estabilizador da GFR. Estudos recentes indicam que animais que não possuem receptores A_1 da adenosina não possuem TGF^{48,49}. Nas células justaglomerulares (figura 1 D), a adenosina inibe a libertação de renina^{50,51,52}, modulando assim o sistema renina-angiotensina (RAS – renin-angiotensin system). Nas células epiteliais dos túbulos renais, a activação de receptores A_1 aumenta o sim-
porte Na^+ -glicose e Na^+ -fosfato⁵³. O antagonismo dos mesmos receptores causa diurese e natriurese imediata, ou seja, a adenosina desempenha um papel importante na mediação de transporte de sódio no túbulo proximal^{54,55}.

As acções da adenosina são também importantes no contexto da nefropatia diabética. Na lesão glomerular, as células mesangiais replicam e aumentam a produção de matriz extracelular proteica, o que resulta em glomeruloesclerose. As células mesangiais expressam receptores A_1 e A_2 da adenosina⁵⁶. A activação de receptores A_1 causa contracção das células mesangiais⁵⁷, enquanto que a activação de receptores A_{2B} inibe a proliferação celular mesangial⁵⁸. Na fase em que se verifica hiperfiltração, a produção renal de adenosina é superior em animais diabéticos em relação a animais controlo⁵⁹. Por outro lado, os animais com diabetes experimental têm baixa actividade do TGF⁶⁰. A vasculatura renal de ratos com diabetes experimental apresenta maior sensibilidade para a adenosina quer libertada endogenamente quer administrada exogenamente⁶¹. A administração de dipiridamole, um inibidor da recaptação da adenosina (aumentando a sua concentração intersticial e urinária), a ratos diabéticos, aumenta o TGF⁶², previne a hiperfiltração glomerular, reduz a poliúria e a proteinúria e normaliza a excreção de sódio e potássio⁶³. O controlo rigoroso da glicemia é fundamental para prevenir e retardar a lesão renal associada à diabetes. Em animais com diabetes experimental tipo I, a activação dos receptores A_1 da adenosina aumenta o consumo de glicose pelos tecidos e a síntese de glicogénio, diminuindo a glicose plasmática⁶⁴. A activação do receptor A_1 por agonistas parciais também melhora a resistência à insulina em animais com diabetes experimental tipo II⁶⁵. Esta acção está relacionada com a inibição da lipólise e diminuição concentração de ácidos gordos circulantes⁶⁶. Estes ácidos gordos diminuem a captação de glicose (dependente da insulina) pelo músculo e aumentam a produção e secreção de triglicerídeos pelo fígado^{67,68}. A hiperglicemia verificada na diabetes é um factor determinante para a iniciação e progressão da lesão glomerular. A influência benéfica da adenosina sobre a incorporação de glicose pode retardar o desenvolvimento da nefropatia diabética.

Os efeitos da adenosina na nefropatia diabética não estão completamente elucidados, sendo, por isso, importante aprofundar o estudo dos seus mecanismos de actuação nesta patologia. A adenosina tem um tempo de semi-vida muito curto, o que complica os estudos dos possíveis efeitos da mesma. A 2-cloroadenosina (2CADO) é um análogo aproximadamente 50 vezes mais potente do que a adenosina. Além disso, a 2CADO não é substrato para a adenosina desaminase, logo, não é metabolizável⁶⁹, o que faz com que tenha um tempo de semi-vida superior. Estas características justificam o uso de 2CADO em trabalhos experimentais com o objectivo de estudar os efeitos da adenosina. A 2CADO diminui o fluxo sanguíneo renal, a fracção de filtração e a

GFR em ratos anestesiados⁷⁰. Estas observações são consistentes com a contracção da arteríola aferente e dilatação da arteríola eferente.

1.4. ANGIOTENSINA II E NEFROPATIA DIABÉTICA

A angiotensina II (Ang II) é o produto efector do RAS, representado na figura 3. O angiotensinogénio formado no fígado é clivado, na circulação, pelo enzima renina, secretado pelas células justaglomerulares, dando origem à angiotensina I. A Ang II é então formada por clivagem da angiotensina I pelo enzima conversor da angiotensina, sintetizado no endotélio pulmonar⁷¹. Recentemente têm sido identificados vários RAS locais, em que a formação dos vários componentes do sistema e a regulação do mesmo é feita localmente⁷². O conteúdo renal de Ang II é superior ao circulante^{73,74,75}, o que sugere uma regulação local e selectiva dos níveis de Ang II. A maioria da Ang II presente no tecido renal é originada a partir da conversão de angiotensinogénio nesse mesmo tecido⁷⁶. O angiotensinogénio renal provém da circulação, mas também é formado nas células do túbulo proximal⁷⁷. A renina formada nas células do aparelho justaglomerular promove a formação de angiotensina I renal, a partir do angiotensinogénio. O enzima conversor de angiotensina I é também abundante no tecido renal⁷⁸. Em ratos knockout para o enzima conversor da angiotensina observa-se uma diminuição de 80% de Ang II intrarrenal, comparando com ratos controlo⁷⁹. Portanto, todos os componentes necessários para a formação de Ang II estão presentes no rim.

As acções da Ang II são mediadas por receptores AT₁ e AT₂. Por activação do receptor AT₁, a Ang II causa vasoconstrição e promove a retenção de água e sódio através da estimulação da produção de aldosterona pela medula adrenal, aumentando assim a pressão sanguínea sistémica⁷¹. A activação de receptores AT₂ da Ang II geralmente origina respostas opostas às mediadas pelo receptor AT₁.

Além do papel fisiológico, a Ang II produzida localmente induz inflamação, proliferação e crescimento celular, apoptose, migração e diferenciação celular, regula a expressão de genes que codificam para substâncias bioactivas e activa várias cascatas de sinalização intracelular⁷². Todas estas acções podem contribuir para a lesão

tecidualar. A Ang II diminui a GFR e o fluxo plasmático renal e contrai as arteríolas aferente e eferente^{81,82}. As células mesangiais expressam receptores AT₁ e AT₂ da Ang II⁸³. A activação de receptores AT₁ da Ang II estimula a produção de matriz extracelular⁸⁴ e promove a hipertrofia e proliferação das células mesangiais^{85,86}, dando origem a glomeruloesclerose. A acção da Ang II sobre as células mesangiais e musculares lisas vasculares aumenta a sensibilidade aos estímulos do TGF⁷², aumentando-o indirectamente^{87,88}. Ratos knockout para o receptor AT₁ têm uma resposta diminuída do TGF ao aumento da taxa de perfusão tubular^{89,90}. Nos túbulos renais, a Ang II influencia a excreção de sódio funcionando como um poderoso antinatriurético. A infusão intrarenal de angiotensina I (percursor da Ang II) reduz a excreção de sódio⁸².

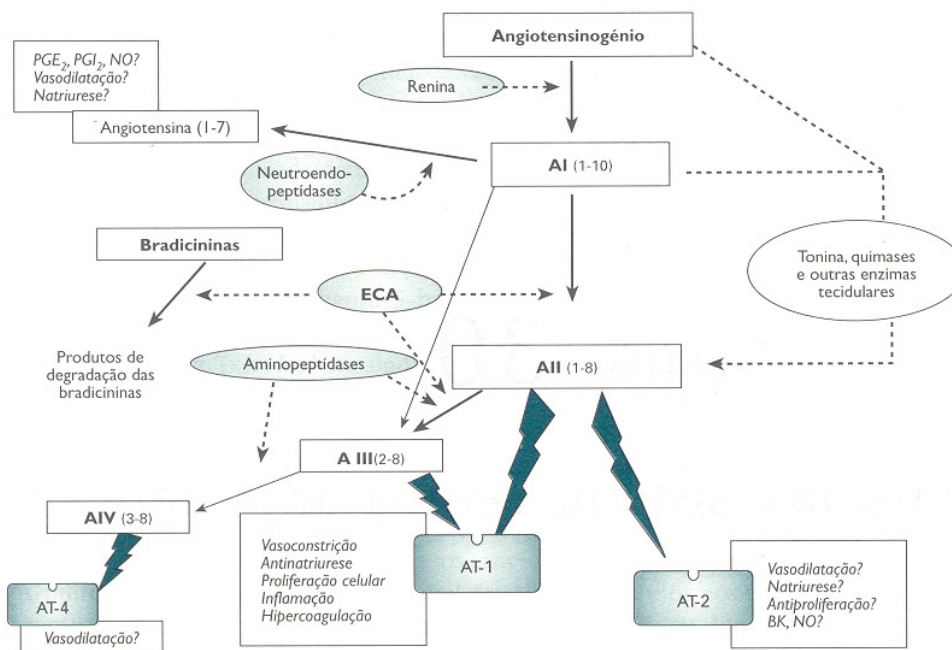


Figura 3. Representação esquemática do sistema renina-angiotensina. O angiotensinogénio, sintetizado maioritariamente no fígado e no tecido adiposo, é o precursor da Ang II. Este precursor é convertido pela renina a angiotensina I que é depois convertida a Ang II por acção do enzima conversor da angiotensina (adaptado de⁸⁰).

A activação do RAS é extremamente importante tanto na iniciação como no estado tardio da nefropatia diabética³¹. Ratos com diabetes experimental apresentam um aumento de renina intra-renal^{85,91,92}, expressão de mRNA para renina e angiotensinogénio, aumento da expressão do enzima conversor da angiotensina⁸⁵ e da concentração de Ang II no interstício renal⁹³, o que sugere activação local do RAS. A infusão

aguda de Ang II, em doses suficientes para alterar a hemodinâmica renal, não induz proteinúria⁹⁴. No entanto, um aumento contínuo de Ang II intrarenal em doses subpressoras induz proteinúria e lesão progressiva da barreira de filtração glomerular^{95,96}, por acumulação de matriz extracelular via estimulação da produção de factor de crescimento tumoral β ⁸⁴. Estudos *in vitro* demonstram uma expressão aumentada de Ang II em células mesangiais e tubulares em resposta à glicose^{97,98}.

A intervenção farmacológica dirigida para o bloqueio das acções da Ang II tem sido uma abordagem terapêutica importante em doentes diabéticos. A resposta hemodinâmica renal ao bloqueio das acções da Ang II, com inibidores do enzima conversor da angiotensina ou com antagonistas do receptor AT_1 da Ang II, é variável devido à diminuição da pressão arterial, que pode iniciar mecanismos de compensação renal. As guidelines actuais recomendam o uso de bloqueadores do RAS em doentes diabéticos por promoverem renoprotecção, independente da diminuição da pressão arterial^{31,72,99,100,101,102,103}. O uso de inibidores do enzima conversor da angiotensina dilata a arteríola eferente e reduz a pressão glomerular¹⁰⁴, diminui a proteinúria e atenua as alterações estruturais glomerulares¹⁰⁵.

1.5. INTERACÇÕES ADENOSINA-ANGIOTENSINA II E NEFROPATIA DIABÉTICA

Existe uma dependência mútua e cooperação entre a adenosina e a Ang II para produzir vasoconstrição na arteríola aferente. Num estudo feito em arteríolas aferentes isoladas observou-se que a resposta contráctil à combinação de adenosina e Ang II é superior à soma dos efeitos de cada um destes fármacos¹⁰⁶. Isto indica a existência de sinergismo para produzir contracção, apesar de cada um dos agentes poder provocar vasoconstrição arteriolar renal independentemente. A acção vasoconstritora da adenosina endógena e exógena pode ser antagonizada por antagonistas do receptor AT_1 da Ang II^{107,46,108}. Ratos knockout para o receptor AT_1 da Ang II têm uma resposta vasoconstritora reduzida quando estimulados por agonistas de receptores A_1 ¹⁰⁹. Ratos knockout para o receptor A_1 da adenosina demonstram menor efectividade da angiotensina II para contrair a arteríola aferente e para reduzir a GFR¹¹⁰.

A adenosina inibe a libertação de renina pelas células justaglomerulares¹¹¹ e este efeito é potenciado quando o RAS é activado¹¹². Em ratos knockout para o receptor A₁ da adenosina, verifica-se um aumento da renina plasmática e um bloqueio do mecanismo de TGF⁴⁸. O antagonismo não selectivo dos receptores da adenosina pela 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina (DPSPX) causa hipertensão¹¹³ com aumento da actividade da renina plasmática¹¹⁴ e da concentração plasmática de Ang II¹¹⁵. A hipertensão induzida pelo DPSPX é semelhante à causada por doses subpressoras de Ang II¹¹⁶. Estes factos sugerem o envolvimento do RAS no desenvolvimento da hipertensão causada pelo DPSPX e reforçam a hipótese de a adenosina funcionar como um importante freio do RAS.

1.6. OBJECTIVOS

O trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação teve como objectivos:

- implementar um método para avaliação da GFR;
- caracterizar os efeitos da 2CADO na função renal de ratos com diabetes induzida experimentalmente por injeção de STZ, e avaliar se estes efeitos poderão estar relacionados com alterações da actividade do RAS renal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS E INDUÇÃO DA DIABETES

Durante o estudo foram usados ratos Wistar, machos (Charles River, Barcelona), com peso corporal compreendido entre 240-300 g. Os animais foram mantidos em condições constantes de temperatura (21°C) e alternância de exposição à luz (fotoperíodos de 12 horas noite/12 horas dia) com acesso livre a água e comida.

A diabetes foi induzida por injeção intraperitoneal de STZ (65 mg/Kg) dissolvida em tampão citrato de sódio pH 4,5. Os animais controlo receberam uma injeção de tampão citrato de sódio pH 4,5. Dois dias após a injeção de STZ foi avaliada a glicemia, após um jejum de 5 h, em amostras de sangue obtidas por punção de uma veia da cauda; foram considerados diabéticos os animais com glicemia superior a 270 mg/dL.

2.2. IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

2.2.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (diabéticos 50 mg/Kg; controlo 60 mg/Kg; i.p.). Os animais foram colocados numa mesa com temperatura controlada (37°C) e traqueostomizados, para facilitar a respiração espontânea. Foram cateterizadas (PE10 conectado a PE50) a artéria aorta através da artéria femoral esquerda, para recolha de amostras de sangue, e a veia femoral esquerda para infusão contínua de soro fisiológico contendo pentobarbital sódico (20 mg/Kg/h) e inulina. A bexiga foi exposta, por incisão abdominal, e canulada para recolha de amostras de urina; a uretra foi ligada de modo a assegurar uma recolha completa. Os procedimentos cirúrgicos demoraram, em média, não mais do que 60 min por cada rato.

2.2.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais estão esquematizados na figura 4. Os animais foram sujeitos a um período de estabilização de 60 min, ao fim do qual se esvaziou a bexiga. A partir deste momento, foram colhidas amostras de urina a intervalos constantes (20 min). No meio dos intervalos de colheita das amostras de urina foram colhidas amostras de sangue ($\pm 300 \mu\text{L}$) para seringas contendo heparina (5.000 U.I./mL). As amostras de sangue foram centrifugadas (13.000 rpm, 15 min, 4°C) imediatamente após a colheita, e o plasma sobrenadante foi separado e armazenado a -80°C. As amostras de urina foram também armazenadas a -80°C.

Para otimizar o protocolo experimental, foram testadas diferentes concentrações de inulina, ritmo de infusão e duração do tratamento com STZ:

- 1) Protocolo 1: Inulina 1,5%
Ritmo de infusão: 45 $\mu\text{L}/\text{min}$
Ratos controlo

- 2) Protocolo 2: Inulina 10%
Ritmo de infusão: 45 $\mu\text{L}/\text{min}$
Ratos controlo e ratos diabéticos (7 dias)

- 3) Protocolo 3: Inulina 10%
Ritmo de infusão: 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ + 30 min a 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ (expansão de volume)
Ratos controlo e ratos diabéticos (14 dias)

- 4) Protocolo 4: Inulina 10%
Ritmo de infusão: 20 $\mu\text{L}/\text{min}$
Ratos controlo e ratos diabéticos (14 dias)

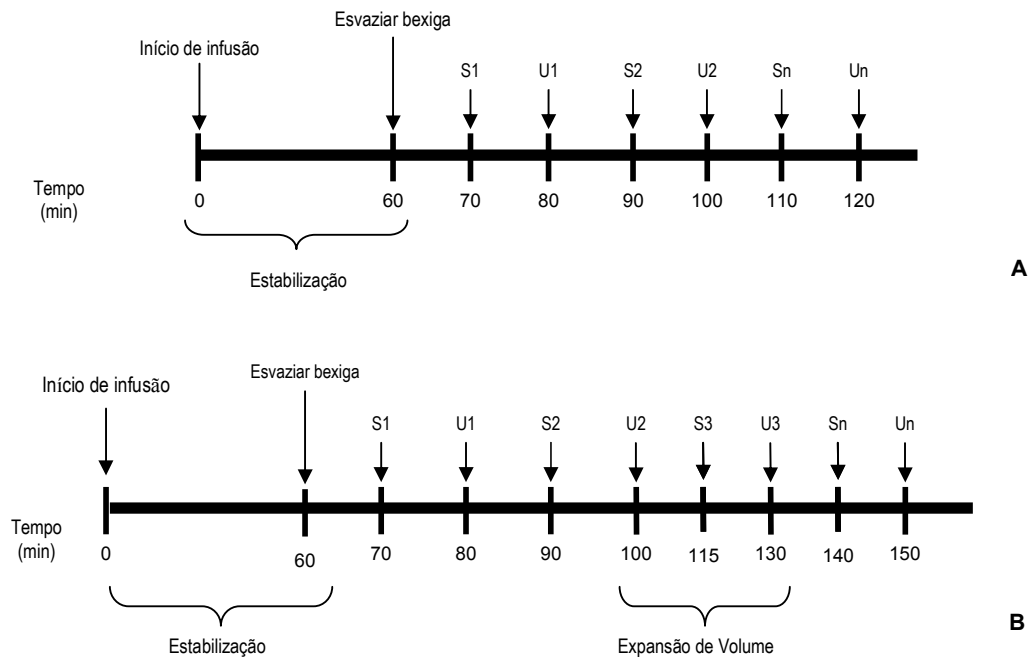


Figura 4: Representação esquemática da recolha de amostras de sangue (S) e urina (U): **A** – protocolos 1, 2 e 4; **B** – protocolo 3.

2.2.3 DOSEAMENTOS

A glicemia foi quantificada por método colorimétrico com detecção electroquímica usando um auto-analisador (Freestyle mini, ABBOTT, EUA). A concentração plasmática e urinária de inulina foi quantificada usando o método de Heyrovsky¹¹⁷ com ligeiras alterações. A 100 μL de plasma diluído (1:5), adicionaram-se 400 μL de ácido tricloroacético 15% para precipitar as proteínas. Após centrifugação (4.000 rpm, 8 min, 4°C), a 100 μL de sobrenadante foram adicionados 50 μL de ácido β -indolilacético 5 mg/mL (em etanol 96%) e 1 mL de ácido clorídrico 37%. Após incubação durante 60 min a 37°C, realizou-se a leitura da absorvância a 530 nm. As amostras de urina foram diluídas (1:400) e a concentração de inulina quantificada usando o protocolo descrito para as amostras de plasma. Foram preparados padrões (0, 20, 40, 60, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), na matriz da amostra correspondente, que foram processados do mesmo modo. Para determinar a concentração de inulina em cada amostra, os valores de absorvância foram interpolados na respectiva curva padrão.

2.2.4. CÁLCULO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

A GFR foi calculada em cada período de clearance (conjunto de uma amostra de sangue e a amostra de urina imediatamente seguinte) usando a fórmula:

$$GFR = \frac{\text{concentração inulina urinária } (\mu\text{g} / \text{mL})}{\text{concentração inulina plasmática } (\mu\text{g} / \text{mL})} \times \text{volume de urina } (\text{mL} / \text{min})$$

2.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média, em que n corresponde ao número de animais. A análise estatística dos resultados foi feita usando o Teste *t* de Student. Foram considerados significativos valores de *p* inferiores a 0,05.

2.3. EFEITO DA 2-CLOROADENOSINA SOBRE A LESÃO RENAL EM ANIMAIS COM DIABETES EXPERIMENTAL

2.3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente distribuídos por quatro grupos experimentais: animais controlo (CON), animais diabéticos (STZ), animais diabéticos tratados com 2CADO 2 mg/Kg (STZ + 2CADO2) ou 5 mg/Kg (STZ + 2CADO5). No dia 0 procedeu-se à indução da diabetes (como descrito em 2.1), no dia 12 iniciou-se o tratamento com 2CADO (7 dias) e no dia 19 os animais foram sacrificados. O protocolo experimental está esquematizado na figura 5. A 2CADO foi administrada recorrendo a mini-bombas osmóticas implantadas intraperitonealmente (Alzet modelo 2ML1; Alza, Palo

Alto, CA, USA), que permitiram uma infusão constante (10 $\mu\text{L/h}$) e contínua durante 7 dias. O reservatório das mini-bombas osmóticas foi preenchido com solução de 2CADO e as mini-bombas colocadas em soro fisiológico durante 4h, a 37°C, com agitação, para estabilização do ritmo de infusão. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg; i.p.) e as mini-bombas implantadas na cavidade peritoneal, através de uma incisão feita na pele e na massa muscular subjacente, na zona média da parede abdominal. A incisão foi suturada por planos. Depois do recobro anestésico, os animais voltaram a ter acesso livre a água e comida. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas dois dias antes dos dias 0, 12 e 19 para se acostumarem ao ambiente. Nos dias 0, 12 e 19 foram colhidas amostras de urina de 24 h (armazenadas a -80°C para posterior análise) e foi quantificada a comida e a água ingeridas no mesmo período. No dia 18 foram colhidas amostras de urina de 24 h para matrizes contendo 0,6 mL de água destilada, 50 μg de pepstatina A, 10 mg de azida de sódio, 300 nmol de enalapril e 125 μmol de EDTA para parar a conversão e a degradação de angiotensinogénio. Estas amostras foram armazenadas a -80°C para posterior quantificação da concentração de angiotensinogénio. No final do estudo (dia 19) os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (diabéticos 50 mg/Kg; controlo 60 mg/Kg, i.p.) e foi colhido sangue do ventrículo esquerdo, para tubos contendo heparina (5.000 U.I./mL). Após centrifugação imediata (3.000 rpm, 20 min, 4°C) o plasma sobrenadante foi armazenado a -80°C para posterior análise.

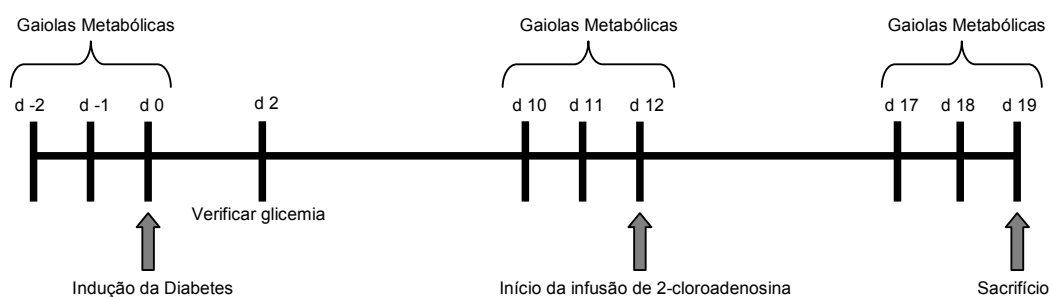


Figura 5: Representação esquemática do protocolo de avaliação do efeito da 2-cloroadenosina sobre a lesão renal em animais com diabetes experimental. d = dia.

2.3.2 DOSEAMENTOS

A glicose foi quantificada pelo método colorimétrico da glucose oxidase (Glucose PAP 100; HORIBA ABX Diagnostics). As proteínas urinárias totais foram quantificadas usando um teste fotométrico com vermelho de pirogalol (Urinary Proteins CP, HORIBA ABX Diagnostics) e as proteínas plasmáticas totais foram quantificadas pelo método colorimétrico da reacção do biureto (Total Protein 250; HORIBA ABX Diagnostics). A creatinina plasmática e urinária foi quantificada pelo método colorimétrico de Jaffé (Creatinine 80; HORIBA ABX Diagnostics) e a ureia foi quantificada por ultravioleta usando o teste enzimático da urease/glutamato desidrogenase (Urea 80; HORIBA ABX Diagnostics). Todas as quantificações foram realizadas usando um multianalisador (Cobas Mira – Roche). O angiotensinogénio urinário foi quantificado por ELISA dupla sandwich usando um kit comercial (Rat Total Angiotensinogen Assay Kit; IBL).

2.3.3 CÁLCULO DA CLEARANCE DE CREATININA

A clearance de creatinina (CL) foi calculada usando a fórmula:

$$CL = \frac{\text{concentração creatinina urinária (mg / dL)}}{\text{concentração creatinina plasmática (mg / dL)}} \times \text{volume de urina (mL / min)}$$

2.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média, em que n corresponde ao número de animais. A análise estatística dos resultados foi feita usando: Teste *t* de Student para comparação entre animais controlo e animais diabéticos; comparações múltiplas seguidas do teste Bonferroni para avaliar diferenças dentro dos grupos em diferentes momentos; comparações múltiplas seguido do teste Dunnett para comparação do grupo de animais diabéticos com os grupos de animais diabéticos tratados com 2CADO. Foram considerados significativos valores de *p* inferiores a 0,05.

2.4. REAGENTES E SOLUÇÕES

Tampão citrato de sódio: citrato de sódio 0,1 M + HCl 1 M (1:3), pH 4,5. O ácido β -indolilacético foi recristalizado em etanol.

Estreptozotocina, inulina, 2-cloroadenosina, pepstatina A, azida de sódio, enalapril e pentobarbital sódico foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido β -indolilacético, ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), ácido clorídrico e citrato de sódio foram obtidos da Merck. A heparina foi obtida da Winthrop.

3. RESULTADOS

A injeção de STZ causou um aumento da glicemia ao fim de 48h. Foram considerados diabéticos os animais com glicemia em jejum superior a 270 mg/dL.

3.1. IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

Os valores da GFR obtidos em animais controlo com uma infusão de inulina a 1,5% a um ritmo de 45 μ L/min (protocolo 1) apresentaram uma ordem de grandeza não concordante com o descrito na literatura (figura 6)

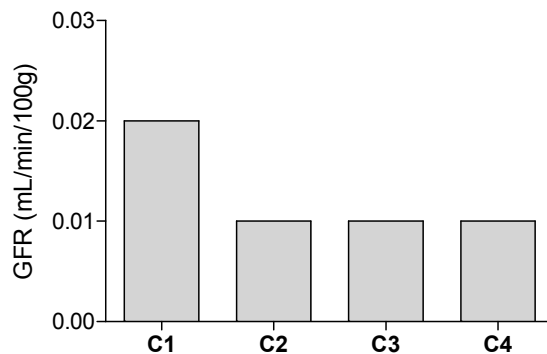


Figura 6: Taxa de filtração glomerular (GFR, mL/min/100g), de ratos controlo nos quatro períodos de clearance (C1, C2, C3 e C4). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; n = 3.

Quando se mudou a concentração de inulina infundida para 10 % (protocolo 2), a ordem de grandeza da GFR passou a estar de acordo com o descrito na literatura para animais controlo. Nestas condições experimentais (protocolo 2) não se verificaram diferenças entre a GFR do grupo de animais diabéticos 7 dias após injeção de

STZ e do grupo de animais controlo (figura 7). No que diz respeito ao volume de urina excretado e às concentrações urinárias e plasmáticas de inulina (tabela 1) os resultados também foram semelhantes entre o grupo de animais diabéticos e o grupo de animais controlo.

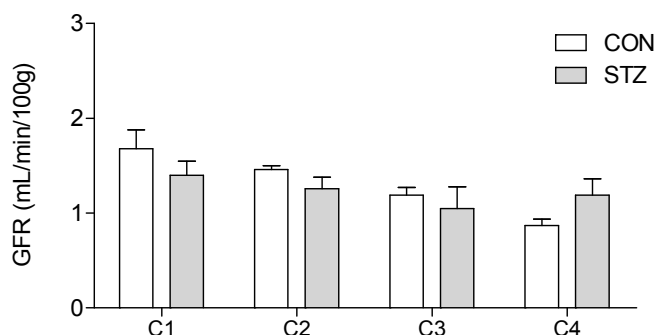


Figura 7: Taxa de filtração glomerular (GFR, mL/min/100g), em ratos diabéticos, 7 dias após a indução de diabetes e em ratos não diabéticos (CON), nos quatro períodos de clearance (C1, C2, C3 e C4). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; CON n = 3; STZ n = 5.

Tabela 1: Volume de urina (U, mL/min), concentração de inulina na urina ([U], μ g/mL) e no plasma ([P], μ g/mL), em ratos diabéticos 7 dias após a indução de diabetes (STZ) e em ratos não diabéticos (CON), nos quatro períodos de clearance (C1, C2, C3 e C4). Concentração de inulina infundida: 10%.

	CON			STZ		
	U (mL/min)	[U] (μ g/mL)	[P] (μ g/mL)	U (mL/min)	[U] (μ g/mL)	[P] (μ g/mL)
C1	0,02 \pm 0,00	30,54 \pm 3,72	0,17 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	28,92 \pm 3,49	0,15 \pm 0,01
C2	0,02 \pm 0,00	35,40 \pm 4,22	0,17 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00	30,84 \pm 3,46	0,15 \pm 0,01
C3	0,02 \pm 0,00	37,87 \pm 3,20	0,20 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	38,42 \pm 5,72	0,18 \pm 0,01
C4	0,02 \pm 0,00	33,23 \pm 7,41	0,22 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	37,80 \pm 2,36	0,18 \pm 0,01

Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; CON n = 3; STZ n = 5.

Na figura 8 estão representados os valores da GFR, obtidos com o protocolo 3. Neste protocolo infundiu-se uma solução de inulina a 10% a animais controlo e a animais diabéticos 14 dias após a indução de diabetes com STZ. O ritmo de infusão foi de 20 μ L/min, tendo-se feito uma expansão de volume durante 30 min (ritmo de

infusão 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; C3). Antes da expansão de volume (C1 e C2), o grupo de animais com diabetes experimental apresentou uma GFR superior à dos animais controlo. Durante a expansão de volume e no período de clearance seguinte (C3 e C4, respectivamente) a GFR foi semelhante entre o grupo de animais diabéticos e o grupo de animais controlo. Após a expansão de volume (C5 a C7), o grupo de animais diabéticos apresentou uma GFR inferior à do grupo controlo.

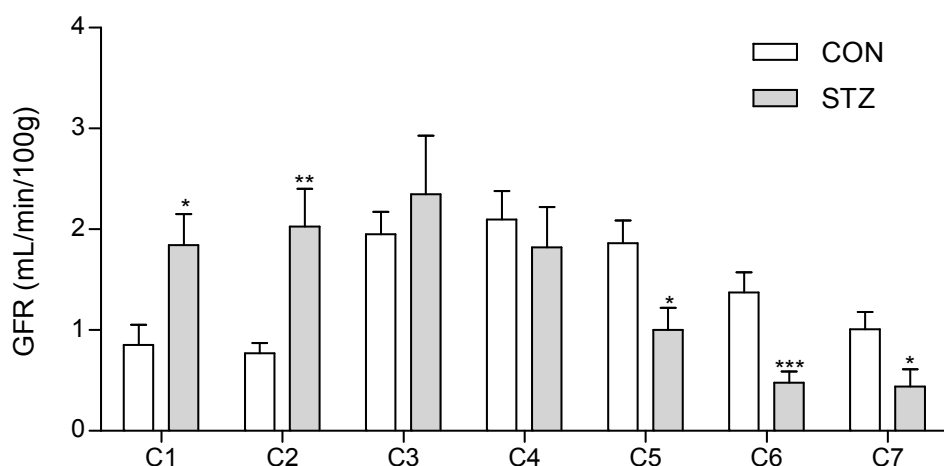


Figura 8: Taxa de filtração glomerular (GFR, mL/min/100g) em ratos diabéticos 14 dias após a indução de diabetes (STZ) e em ratos não diabéticos (CON). Foram efectuados sete períodos de clearance (C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7). No período correspondente a C3 efectuou-se expansão de volume. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; CON n = 8; STZ n = 7; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs CON.

No grupo de animais diabéticos 14 dias após injeção de STZ, o volume de urina excretado, nos três primeiros períodos de clearance (antes e durante a expansão de volume) foi superior ao excretado pelo grupo de animais controlo (tabela 2). Após a expansão de volume (C4, C5, C6 e C7) o grupo de animais diabéticos excretou um menor volume de urina do que o grupo de animais controlo (tabela 2). As concentrações de inulina no plasma e na urina foram semelhantes nos dois grupos em estudo, nos vários períodos de clearance, com excepção de C5 e C6. Em C5 e C6, a concentração urinária de inulina foi inferior no grupo de animais diabéticos, quando comparada com a concentração observada no grupo de animais controlo (tabela 2).

Tabela 2: Volume de urina (U, mL/min), concentração de inulina na urina ([U], $\mu\text{g}/\text{mL}$) e no plasma ([U], $\mu\text{g}/\text{mL}$), em ratos 14 dias após a indução de diabetes (STZ) e em ratos não diabéticos (CON). Nos sete períodos de clea-

rance (C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7). Em C3 efectuou-se uma expansão de volume. Concentração de inulina infundida: 10%.

	CON			STZ		
	U (mL/min)	[U] ($\mu\text{g/mL}$)	[P] ($\mu\text{g/mL}$)	U (mL/min)	[U] ($\mu\text{g/mL}$)	[P] ($\mu\text{g/mL}$)
C1	0,02 \pm 0,00	83,65 \pm 11,55	0,50 \pm 0,04	0,03 \pm 0,00*	88,30 \pm 11,35	0,39 \pm 0,10
C2	0,01 \pm 0,00	100,61 \pm 19,49	0,48 \pm 0,06	0,02 \pm 0,00*	103,87 \pm 16,10	0,47 \pm 0,16
C3	0,03 \pm 0,00	92,34 \pm 10,17	0,51 \pm 0,07	0,04 \pm 0,01**	84,31 \pm 10,09	0,54 \pm 0,13
C4	0,05 \pm 0,00	50,91 \pm 7,85	0,40 \pm 0,05	0,03 \pm 0,01***	32,88 \pm 2,58	0,49 \pm 0,23
C5	0,04 \pm 0,00	63,50 \pm 11,31	0,44 \pm 0,08	0,02 \pm 0,00**	33,02 \pm 5,16*	0,41 \pm 0,12
C6	0,04 \pm 0,00	57,43 \pm 12,14	0,53 \pm 0,10	0,01 \pm 0,00***	28,40 \pm 4,13*	0,38 \pm 0,11
C7	0,03 \pm 0,00	62,19 \pm 12,48	0,59 \pm 0,11	0,01 \pm 0,00***	31,81 \pm 5,90	0,50 \pm 0,15

Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs basal; n = 8.

Quando se repetiram as condições experimentais definidas no protocolo 3, mas apenas na fase anterior à expansão de volume (protocolo 4), o grupo de animais diabéticos 14 dias após injeção de STZ, apresentou uma GFR semelhante à observada para o grupo de animais controlo (figura 9).

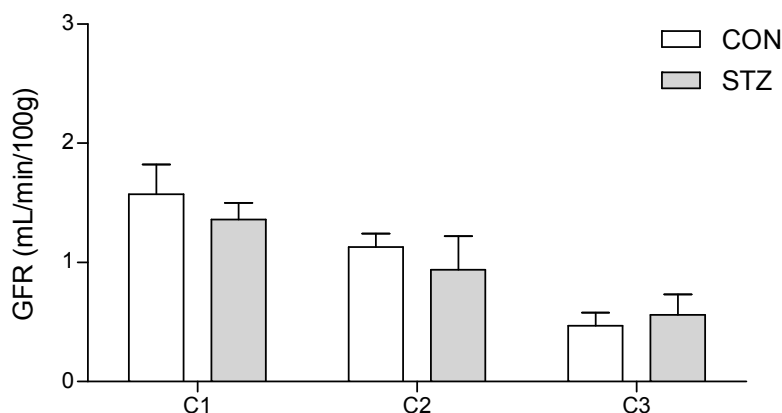


Figura 9: Taxa de filtração glomerular (GFR, mL/min/100g) em ratos 14 dias após a indução de diabetes (STZ) e em ratos não diabéticos (CON). Foram efectuados três períodos de clearance (C1, C2 e C3). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; CON n = 8; STZ n = 7.

Se analisarmos os valores de volume de urina excretado e as concentrações urinárias e plasmáticas de inulina (tabela 3) verificamos que, no primeiro período de clearance (C1), o volume de urina excretado pelo grupo de animais diabéticos foi superior ao excretado pelo grupo de animais controlo. Nos restantes períodos de clearance (C2 e C3) o volume de urina excretado pelo grupo de animais diabéticos foi

semelhante ao excretado pelo grupo de animais controlo. A concentração de inulina na urina foi superior no grupo de animais diabéticos, nos dois primeiros períodos de clearance (C1 e C2), enquanto que no último período (C3) a concentração de inulina urinária foi semelhante nos dois grupos em estudo. A concentração de inulina plasmática, no primeiro período de clearance (C1), foi superior no grupo de animais diabéticos. Nos dois últimos períodos de clearance (C2 e C3) a concentração de inulina plasmática foi semelhante nos dois grupos em estudo.

Tabela 3: Volume de urina (U, mL/min), concentração de inulina na urina ([U], µg/mL) e no plasma ([P], µg/mL), em ratos diabéticos 14 dias após a indução de diabetes (STZ) e em ratos controlo (CON). Nos três períodos de clearance (C1, C2 e C3). Concentração de inulina infundida: 10%.

	CON			STZ		
	U (mL/min)	[U] (µg/mL)	[P] (µg/mL)	U (mL/min)	[U] (µg/mL)	[P] (µg/mL)
C1	0,02 ± 0,00	89,20 ± 11,21	0,31 ± 0,03	0,03 ± 0,00*	48,20 ± 9,20*	0,57 ± 0,120*
C2	0,02 ± 0,00	94,93 ± 13,05	0,35 ± 0,04	0,02 ± 0,00	48,84 ± 11,38*	0,68 ± 0,22
C3	0,01 ± 0,00	83,63 ± 13,22	0,50 ± 0,07	0,01 ± 0,00	54,32 ± 15,34	0,92 ± 0,33

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. * p < 0,05 vs basal, n = 8.

3.2. EFEITO DA 2-CLOROADENOSINA SOBRE A LESÃO RENAL EM ANIMAIS COM DIABETES EXPERIMENTAL

Na figura 10 está representada a variação do peso corporal, da ingestão de comida e de água e a excreção urinária dos diferentes grupos de animais ao longo do estudo. O grupo STZ apresentou um peso corporal inferior ao do grupo CON, tanto no dia 12 como no dia 19. No grupo CON, observou-se um aumento do peso dos animais, nos dias 12 e 19, em relação ao início do estudo. Nos restantes grupos experimentais não se verificou este aumento do peso corporal, que se manteve constante ao longo do estudo. No final do estudo (dia 19), o grupo STZ+2CADO5 apresentou um peso corporal superior ao grupo STZ. O tratamento com 2CADO2 não

alterou o perfil de evolução do peso corporal observado no grupo STZ. No que diz respeito aos restantes parâmetros, o grupo STZ ingeriu mais comida e água e excretou mais urina do que o grupo CON, quer no dia 12 quer no dia 19. No grupo CON, a ingestão de comida e de água e a excreção urinária mantiveram-se constantes ao longo do tempo. No grupo STZ verificou-se um aumento da ingestão de comida e de água e da excreção urinária no dia 12 que se manteve no dia 19. A administração de 2CADO2 não alterou o perfil do grupo STZ. A administração de 2CADO5 atenuou o aumento da ingestão de comida e de água e da excreção urinária observado no grupo STZ. No dia 19, o volume de urina do grupo STZ+2CADO5 foi inferior ao do grupo STZ.

No grupo STZ a excreção urinária de glicose (figura 11 A) foi superior à do grupo CON, quer no dia 12 quer no dia 19. No grupo CON, a excreção de glicose manteve-se constante ao longo do tempo. No grupo STZ verificou-se um aumento da excreção de glicose urinária no dia 12, que se manteve no dia 19. Este perfil não foi alterado pela administração de 2CADO2. A administração de 2CADO na dose de 5 mg/kg atenuou a excreção urinária de glicose. Este efeito foi observado no grupo STZ+2CADO5 do dia 12 para o dia 19, e entre o grupo STZ e o grupo STZ+2CADO5, no dia 19. Na figura 11 B está representada a concentração de glicose plasmática no final do estudo. O grupo STZ apresentou uma concentração de glicose plasmática marcadamente elevada, quando comparado com o grupo CON. O tratamento com 2CADO2 não alterou o perfil apresentado pelo grupo STZ. No grupo de animais tratados com 2CADO5 a concentração de glicose plasmática foi inferior à do grupo STZ.

Na figura 12 encontra-se representada a excreção urinária de proteínas ao longo do estudo e a concentração plasmática de proteínas no final do estudo. O grupo STZ excretou mais proteínas do que o grupo CON quer no dia 12, quer no dia 19. No grupo CON, a excreção urinária de proteínas manteve-se constante ao longo do tempo. No grupo STZ, a excreção urinária de glicose aumentou no dia 12 e este aumento manteve-se no dia 19. A administração de 2CADO2 não alterou este perfil. No grupo STZ+2CADO5 observou-se normalização da excreção urinária de proteínas. No fim do estudo, a concentração de proteínas plasmáticas (figura 12 B) do grupo STZ era inferior à do grupo CON. O perfil apresentado pelo grupo STZ não foi alterado pela administração de 2CADO, nas duas doses em estudo.

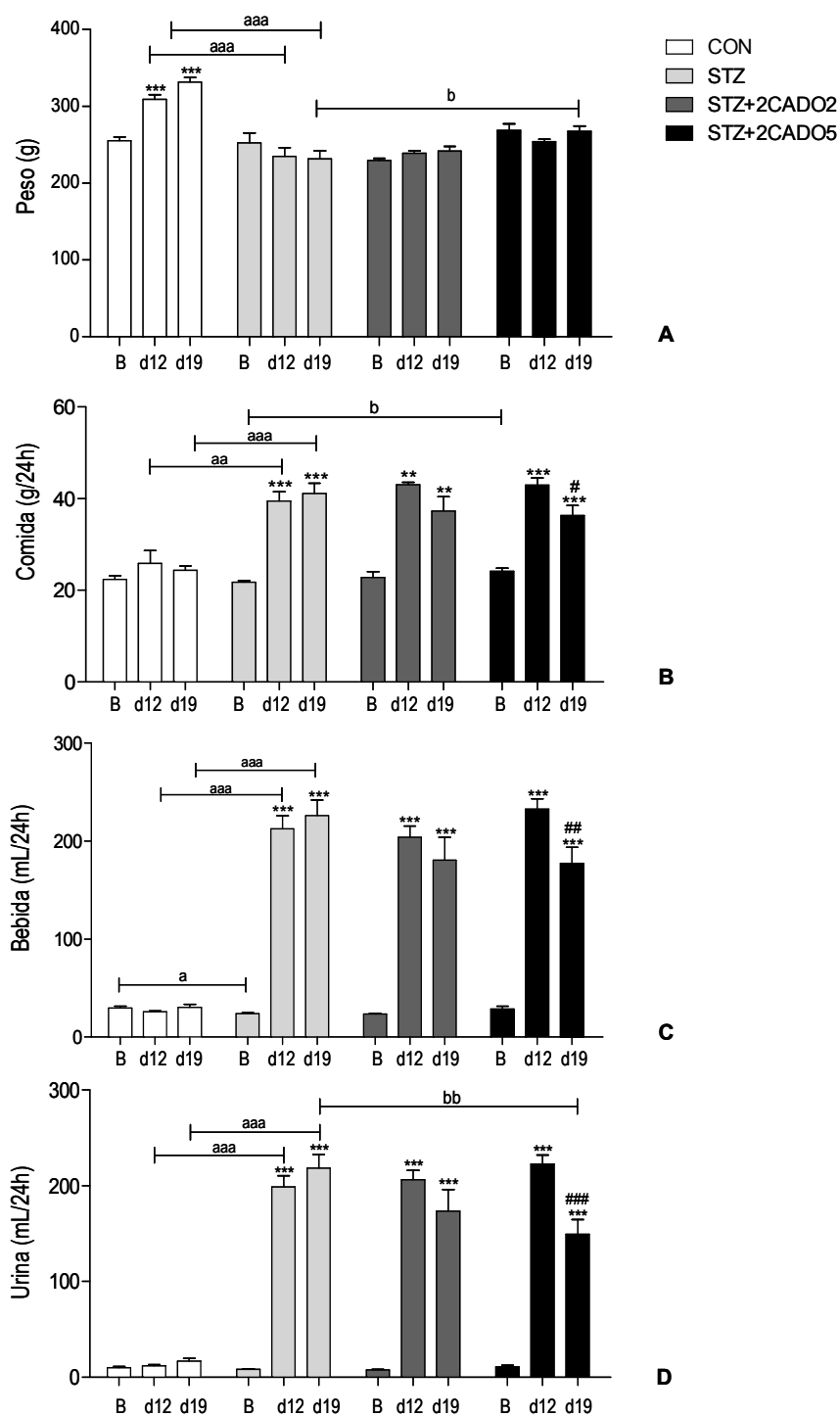


Figura 10: Apresentação de resultados do estudo metabólico. **A)** Variação de peso (g); **B)** ingestão de comida (g/24h); **C)** ingestão de bebida (mL/24h); **D)** excreção urinária (mL/24h) ao longo do protocolo, nos vários grupos em estudo: animais controle (CON), animais com diabetes experimental (STZ), animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 2 mg/Kg (STZ + 2CADO2) e animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 5 mg/Kg (STZ + 2CADO5). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; B – basal, d12 – dia 12, d19 – dia 19; n = 4-9; ^{*}p < 0,01 ^{**}p < 0,001 vs basal; [#]p < 0,05, ^{###}p < 0,01, ^{####}p < 0,001 vs d12; ^ap < 0,05, ^{aa}p < 0,01, ^{aaa}p < 0,001 vs controle; ^bp < 0,05, ^{bb}p < 0,01 vs STZ.

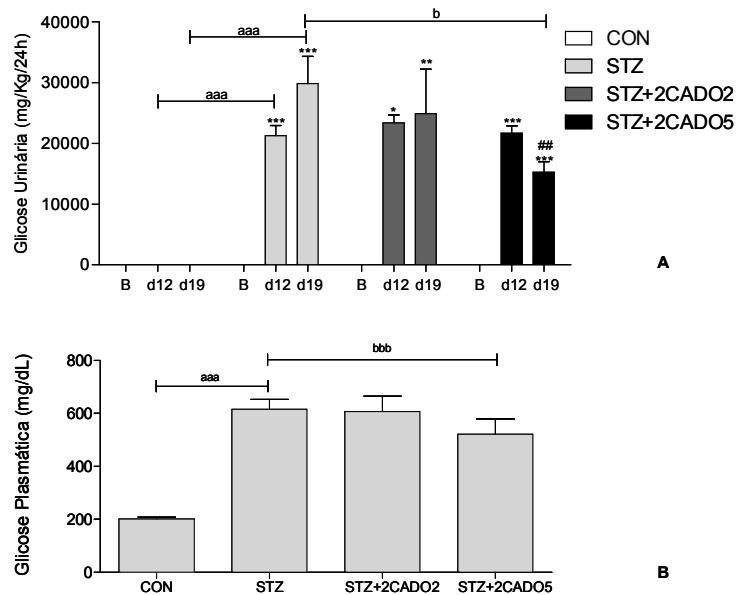


Figura 11: A) Excreção urinária de glicose (mg/Kg/24h) ao longo do protocolo e **B)** concentração plasmática de glicose (mg/dL) no final do estudo (dia 19), ao longo do protocolo, nos vários grupos em estudo: animais controlo (CON), animais com diabetes experimental (STZ), animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 2 mg/Kg (STZ + 2CADO2) e animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 5 mg/Kg (STZ + 2CADO5). Resultados expressos como média ± erro padrão da média; B – basal, d12 – dia 12, d19 – dia 19; n = 4-9; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs basal; ## p < 0,01 vs d12; aaa p < 0,001 vs controlo; ^b p < 0,05, ^{bbb} p < 0,001 vs STZ.

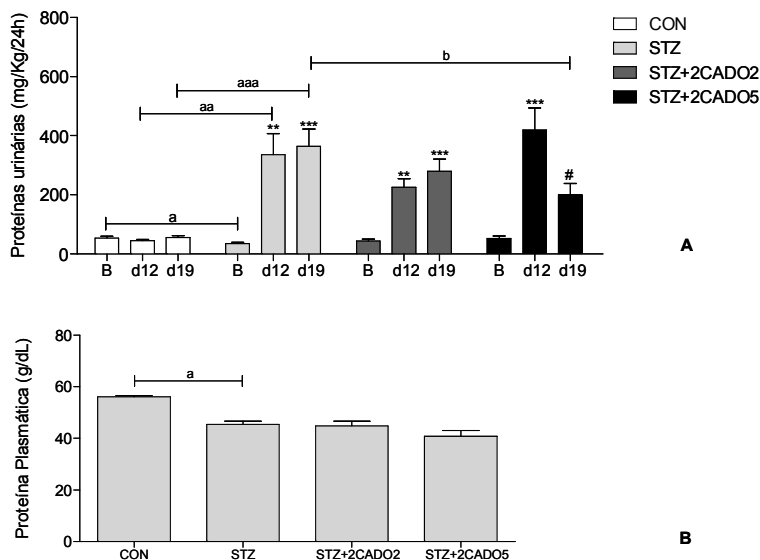


Figura 12: A) Excreção urinária de proteínas (mg/Kg/24h) ao longo do protocolo e **B)** concentração plasmática de proteínas (g/dL) no final do estudo (dia 19), nos vários grupos: animais não diabéticos (CON), animais com diabetes experimental (STZ), animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 2 mg/Kg (STZ + 2CADO2) e animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 5 mg/Kg (STZ + 2CADO5). Resultados expressos como média ± erro padrão da média; B – basal, d12 – dia 12, d19 – dia 19; n = 4-9; ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs basal; # p < 0,05 vs d12; ^a p < 0,05, ^{aa} p < 0,01, ^{aaa} p < 0,001 vs controlo; ^b p < 0,05 vs STZ.

Em relação aos valores de creatinina, o grupo STZ apresentou uma excreção urinária de creatinina superior à do grupo CON, quer no dia 12 quer no dia 19 (figura 13 A). No grupo de animais CON a excreção urinária de creatinina manteve-se constante ao longo do estudo. No grupo de animais STZ verificou-se um aumento da excreção urinária de creatinina no dia 12, que se manteve no dia 19. O grupo STZ+2CADO2 apresentou o mesmo perfil. No grupo de animais STZ+2CADO5 a excreção urinária de creatinina não variou ao longo do estudo. Não se observaram diferenças na creatinina plasmática entre os grupos estudados (figura 13 B). No que diz respeito à clearance da creatinina (figura 13 C), o grupo STZ apresentou uma clearance de creatinina superior à do grupo CON e o tratamento com 2CADO, nas duas doses em estudo, não alterou o perfil apresentado pelo grupo STZ.

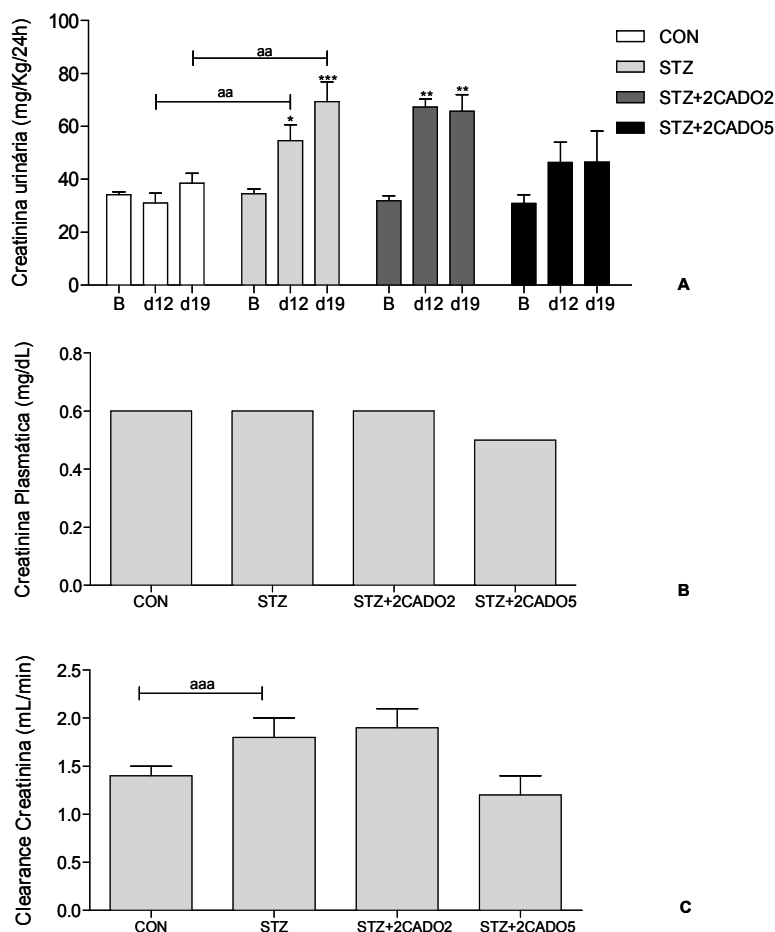


Figura 13: A)Excreção urinária de creatinina (mg/Kg/24h) ao longo do estudo, **B)** concentração plasmática de creatinina (mg/dL) e **C)** clearance de creatinina (mL/min), no final do estudo (dia 19), nos vários grupos em estudo: animais controlo (CON), animais com diabetes experimental (STZ), animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 2 mg/Kg (STZ + 2CADO2) e animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 5 mg/Kg (STZ + 2CADO5). Resultados expressos como média ± erro padrão da média; B – basal, d12 – dia 12, d19 – dia 19; n = 4-9; p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs basal; aaa p < 0,001, aa p < 0,01 vs controlo.

Na figura 14 encontra-se representada a excreção urinária de ureia durante o estudo e a concentração plasmática de ureia no final do estudo. O grupo STZ excretou mais ureia do que o grupo CON, no dia 12 e no dia 19. No dia 19, observou-se um aumento da excreção de ureia no grupo CON. O grupo STZ apresentou um aumento da excreção urinária de ureia no dia 12, que se acentuou no dia 19. Nos grupos que a que foi administrada 2CADO também se verificou um aumento da excreção urinária de ureia no dia 12, mas este aumento manteve-se no dia 19. O grupo STZ apresentou uma maior concentração plasmática de ureia em relação ao grupo CON. A administração de 2CADO não alterou o perfil verificado no grupo STZ.

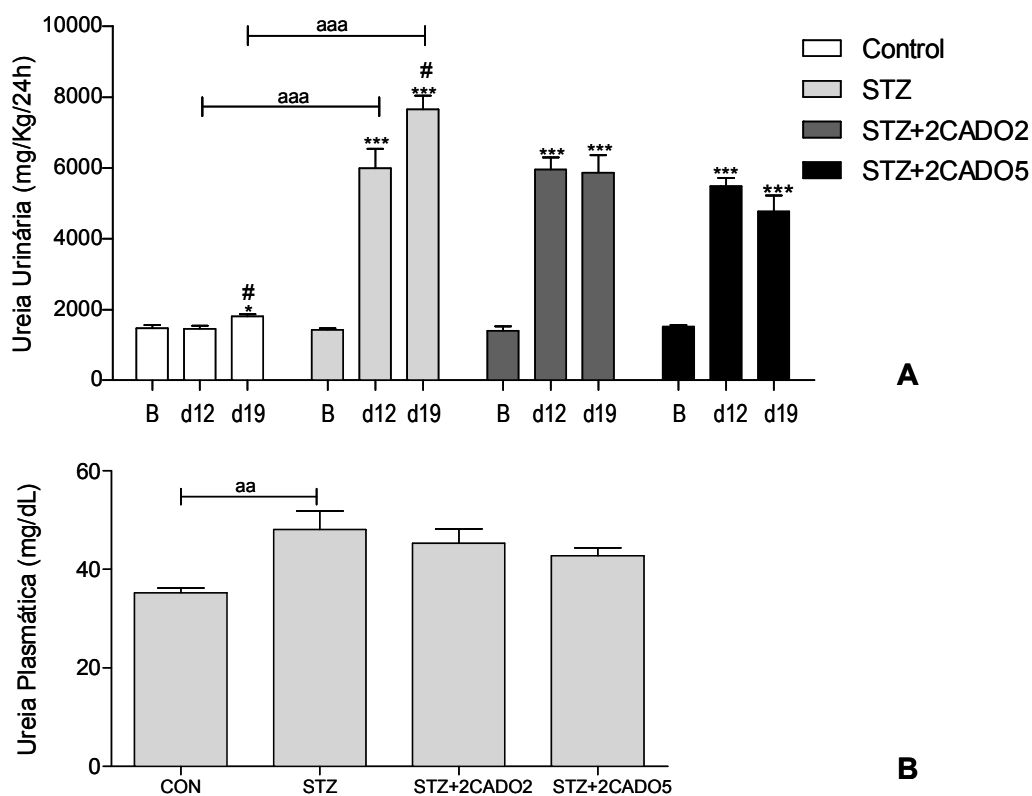


Figura 14: A) Excreção urinária de ureia (mg/Kg/24h) ao longo do protocolo e **B)** concentração plasmática de ureia (mg/dL) no final do estudo (dia 19), nos vários grupos em estudo: animais controlo (CON), animais com diabetes experimental (STZ), animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 2 mg/Kg (STZ + 2CADO2) e animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 5 mg/Kg (STZ + 2CADO5). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; B – basal, d12 – dia 12, d19 – dia 19; n = 4-9; ^{*} p < 0,05, ^{***} p < 0,001 vs basal; [#] p < 0,05 vs d12; ^{aa} p < 0,01, ^{aaa} p < 0,001 vs controlo.

Finalmente, na figura 15 encontra-se representada a excreção urinária de angiotensinogénio no dia 19. O grupo STZ apresentou uma excreção urinária de angiotensinogénio superior à do grupo CON. O tratamento com 2CADO, nas duas doses em estudo, não alterou o perfil apresentado pelo grupo STZ.

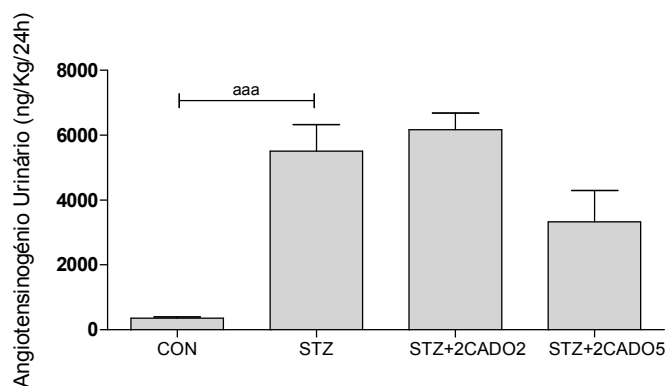


Figura 15: Excreção urinária de Angiotensinogénio (ng/Kg/24h) nos vários grupos em estudo: animais controlo (CON), animais com diabetes experimental (STZ), animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 2 mg/Kg (STZ + 2CADO2) e animais com diabetes experimental tratados com 2-cloroadenosina 5 mg/Kg (STZ + 2CADO5). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média; B – basal, d12 – dia 12, d19 – dia 19; n = 4-9; ^{aaa} p < 0,001 vs controlo.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os principais resultados do trabalho experimental desenvolvido no contexto desta dissertação mostram, pela primeira vez, que a 2CADO é capaz de influenciar favoravelmente o desenvolvimento da nefropatia diabética, nomeadamente por normalizar a proteinúria e atenuar a glicosúria e a uremia. Além disso, foi também observado pela primeira vez que ratos com diabetes experimentalmente induzida por injeção de STZ excretam mais angiotensinogénio do que ratos controlo.

Esta dissertação é parte de um projecto mais abrangente que visa clarificar as interacções entre a adenosina e a Ang II no contexto da nefropatia diabética.

A nefropatia diabética é a principal causa de falência renal e é um importante factor de morbidade e mortalidade associadas à diabetes (ver introdução). A adenosina modula a função renal e as suas acções podem representar uma importante defesa no contexto da nefropatia diabética. Na fase inicial da diabetes a produção renal de adenosina é superior à de animais controlo⁵⁹ e a sensibilidade vascular renal à mesma está aumentada⁶¹. A administração de dipiridamole, um inibidor da recaptação de adenosina, a ratos diabéticos aumenta o TGF⁶², previne a hiperfiltração glomerular, reduz a poliúria e a proteinúria e normaliza a excreção de sódio e potássio⁶³. Na lesão glomerular, as células mesangiais replicam e aumentam a produção de matriz extracelular proteica. As células mesangiais expressam receptores A₁ e A₂ da adenosina⁵⁶. A activação de receptores A₁ causa contracção das células mesangiais⁵⁷. A activação de receptores A_{2B} inibe a proliferação celular mesangial⁵⁸. Além disso, a activação dos receptores A₁ aumenta o consumo de glicose pelos tecidos e a síntese de glicogénio, diminuindo a glicose plasmática em animais com diabetes experimental tipo I⁶⁴. Ainda que indirectamente, o controlo da glicemia pela adenosina pode também contribuir para retardar o desenvolvimento e/ou a progressão da nefropatia diabética.

A activação do RAS contribui de forma marcada para o desenvolvimento da nefropatia diabética³¹. Ratos com diabetes experimental apresentam activação do RAS renal^{85,118,91,92,93}. Um aumento contínuo de Ang II intrarenal em doses subpressoras induz proteinúria e lesão progressiva da barreira de filtração glomerular^{95,96} por acumulação de matriz extracelular⁸⁴. Em resposta à glicose, verifica-se um aumento da Ang II em células mesangiais e tubulares^{97,98}. O uso de inibidores do enzima conversor da angiotensina dilata a arteríola eferente e reduz a pressão glomerular¹⁰⁴, diminui a proteinúria e atenua as alterações estruturais glomerulares¹⁰⁵. Os inibidores do enzima

conversor da angiotensina e os antagonistas dos receptores AT_1 da Ang II são actualmente recomendados em doentes diabéticos, independentemente do valor de pressão arterial destes doentes^{3,100}.

As acções da adenosina e da Ang II estão directa e indirectamente relacionadas. As acções vasoconstritoras da adenosina e da Ang II estão diminuídas quando uma delas não está presente^{46,110,107,108,109}. A adenosina inibe a libertação de renina⁵⁰. Sabe-se que o antagonismo dos receptores da adenosina causa hipertensão com activação do RAS^{113,115,114} e que a inibição da recaptação de adenosina previne as alterações renais resultantes da diabetes⁶³. A activação inapropriada da Ang II renal é tida como sendo um factor determinante no desenvolvimento da lesão renal^{72,119,120}.

Tendo em conta esta evidência, um estudo aprofundado da interacção entre a adenosina e a Ang II pode contribuir para melhor elucidar o desenvolvimento da nefropatia diabética.

4.1. IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

Para quantificar a GFR é frequentemente usada a clearance da inulina uma vez que esta substância é livremente filtrada pelo glomérulo e não sofre reabsorção ou secreção ao longo do nefrónio. Como não existia no laboratório nenhuma metodologia para quantificação da GFR, começámos por implementar uma técnica que o permitisse. Em cada rato foi colocado um cateter na artéria aorta, para colheita de amostras de sangue, um cateter na veia femoral, para infusão contínua de anestésico e de inulina, e um cateter na bexiga, para colheita de amostras de urina. A clearance da inulina foi, então, calculada a partir das concentrações urinária e plasmática da mesma, e da taxa de formação de urina.

A inulina pode ser doseada por espectrofotometria ou por cintilografia líquida. A determinação espectrofotométrica da inulina é um processo barato, simples e sem requisitos especiais de manuseamento, mas demorado e que exige um volume grande de amostra^{121,122,117}. Este problema pode ser ultrapassado usando [³H]-inulina ou [¹⁴C]-

inulina, quantificadas por cintilografia líquida. No entanto, a contaminação resultante da radioactividade obriga a uma manipulação cuidada e restrita da mesma. Além disso, os custos inerentes ao uso de isótopos radioactivos são muito elevados. Optámos por isso usar a inulina não radioactiva.

Começámos por testar (protocolo 1), em animais controlo, a infusão de uma solução de inulina a 1,5% a um ritmo de infusão de 45 $\mu\text{L}/\text{min}$ ¹²³. Verificámos que nestas condições experimentais os valores obtidos para a GFR apresentaram uma ordem de grandeza aproximadamente 100 vezes inferior ao descrito na literatura^{20,63}. Este resultado podia estar relacionado com uma baixa concentração de inulina infundida. As soluções de inulina têm um baixo coeficiente de difusão¹²⁴ o que faz com que sejam necessários longos períodos para atingir o equilíbrio nos compartimentos extracelulares¹²⁵. A dose de 1,5 % pode não ter sido suficiente para que esse equilíbrio fosse atingido em tempo útil para o protocolo experimental. Na literatura há uma grande variedade na concentração de inulina infundida. Decidimos usar uma concentração superior, 10%¹⁸, de modo a atingir o equilíbrio mais rapidamente. De facto, nas condições experimentais do protocolo 2, o grupo de animais controlo apresentou uma GFR de acordo com o descrito na literatura.

Em seguida fomos avaliar, usando o mesmo protocolo (protocolo 2), a GFR 7 dias após a injeção de STZ, porque há evidência de que neste tempo já há hiperfiltração e assim reduz-se o tempo do protocolo experimental. Nas condições experimentais descritas no protocolo 2, o grupo de animais diabéticos apresentou uma GFR semelhante à do grupo de animais controlo. A diabetes induzida experimentalmente com STZ⁷ é caracterizada, numa fase inicial, por hiperfiltração com subsequente proteinúria^{12,14} e lesão estrutural glomerular¹³. Esta hiperfiltração desempenha um papel importante no desenvolvimento da nefropatia diabética^{24,26}. Estudos em que é determinada a GFR ao longo do tempo, descrevem que ao fim da primeira semana os animais diabéticos apresentam já uma GFR aumentada em relação a animais controlo. Este aumento mantém-se até à quinta semana, a partir da qual diminui até voltar a atingir valores semelhantes aos dos animais controlo¹⁵. A ausência de hiperfiltração verificada no grupo de animais diabéticos pode ter estado relacionada com a duração da diabetes. Nos estudos em que se avalia a GFR, há uma grande variabilidade no que diz respeito à duração da diabetes. Apesar de a escolha de 7 dias ser fundamentada, nas nossas condições experimentais a lesão glomerular pode não ter sido suficiente para se traduzir em diferenças entre os grupos, pelo menos no que diz respeito à GFR. Outra

questão importante neste contexto está relacionada com o facto de se observar diurese osmótica em animais diabéticos por injeção de STZ, devido à elevada quantidade de glicose presente no filtrado⁷. Esta diurese marcada traduz-se também em polidipsia nestes animais⁷. Durante o procedimento cirúrgico (cerca de 60 min para cada animal) os animais não tiveram reposição de fluidos. Esta privação pode ter desencadeado, no grupo de ratos diabéticos, mecanismos compensatórios por forma a manter a homeostasia, nomeadamente a retenção de líquidos com vista a manter a volémia e a pressão arterial. O facto de o volume de urina excretado pelo grupo de animais tratados com STZ ser igual ao volume excretado pelo grupo de animais controlo suporta esta hipótese. Apesar de nos parecer que faria sentido infundir os grupos experimentais com ritmos de infusão diferentes (grupo STZ superior ao grupo controlo), nenhum dos autores consultados^{18,20,63} refere infusão a ritmos diferentes.

Nesta altura as condições experimentais ainda não nos permitiam reproduzir o descrito na literatura. O aumento da concentração de inulina infundida (de 1,5% para 10%) aproximou o valor de GFR do descrito na literatura, em animais controlo. No entanto não se verificou a hiperfiltração característica deste modelo experimental de DM. Este facto pode ter estar relacionado com a duração da diabetes e/ou com um aporte insuficiente de fluidos. No protocolo 3 decidimos, então, aumentar a duração da diabetes para 14 dias e usar um protocolo usado por colegas do laboratório em experiências relacionadas com a natriurese. Este protocolo inclui uma expansão de volume. Para tal, durante 30 min é infundido 20 vezes mais fluido, uma vez que em experiências com animais acordados observámos que os animais diabéticos apresentam uma ingestão de água e um volume de urina cerca de 20 vezes superior ao dos animais controlo.

Nas condições experimentais definidas para o protocolo 3, a GFR no grupo de animais diabéticos foi superior à do grupo de animais controlo, antes da expansão de volume (C1 e C2). Este resultado, apesar de estar de acordo com o descrito na literatura, surpreendeu-nos uma vez que o ritmo de infusão foi inferior ao testado nos protocolos anteriores (20 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 45 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente). Se o aporte insuficiente de líquidos (protocolo 2) fosse a causa da ausência de diferenças na GFR entre os ratos diabéticos e os ratos controlo, a redução do ritmo de infusão deveria não alterar os resultados, ou, eventualmente, levar a uma diminuição da GFR nos ratos diabéticos, em resultado de uma diminuição da taxa de formação de urina. A decisão de iniciar o protocolo 3 com um ritmo inicial de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ prendeu-se com o facto de durante a

expansão de volume ser usado um volume 20 vezes superior ao inicial. Usando um ritmo inicial de 45 $\mu\text{L}/\text{min}$ teríamos de usar um ritmo de 900 $\mu\text{L}/\text{min}$ na fase da expansão, o que seria demasiado elevado. Além disso, este protocolo já foi testado por colegas do laboratório e reproduz os resultados esperados em termos de hiperfiltração¹²⁶. Durante e após a expansão de volume no grupo de animais diabéticos deixou de se observar hiperfiltração. Durante a expansão de volume o grupo de animais diabéticos apresentou uma GFR semelhante ao grupo de animais controlo. Após expansão de volume a GFR do grupo de animais diabéticos é inferior à do grupo de animais controlo. Estes resultados sugerem a existência de um mecanismo compensatório do grupo de animais diabéticos. Devido ao tempo decorrido até à fase de expansão de volume talvez haja retenção de fluidos para manter a homeostase, facto suportado pela diminuição da excreção de urina verificada.

Apesar de os resultados obtidos nos dois períodos de clearance (C1 e C2) do protocolo 3 serem difíceis de explicar (tendo em conta a sequência de protocolos testada anteriormente – protocolos 1 e 2), eles reproduzem o descrito na literatura: GFR dos ratos diabéticos superior à dos ratos controlo. Assim sendo, decidimos repetir o protocolo descrito anteriormente, mas sem a expansão de volume (protocolo 4). Ao contrário do que se tinha verificado nas condições experimentais do protocolo 3, o grupo de animais diabéticos não apresentou hiperfiltração. Esta variabilidade e falta de reprodutibilidade de resultados fez-nos por em causa o método usado para determinação de GFR, nomeadamente a quantificação de inulina.

A inulina é de difícil dissolução em água, sendo a sua solubilidade máxima de 3% a 30°C¹²⁷ e de 35% a 90°C¹²⁸ (%peso/volume). Em todas as experiências em que usámos a solução a 10 %, esta apresentava-se esbranquiçada e turva, e ia depositando ao longo do protocolo experimental. O aquecimento não permitiu obter uma solução límpida. Em nenhum dos trabalhos em que a GFR é calculada com base na clearance da inulina se referem as características particulares da solução de inulina. Não sabemos se outros investigadores também se depararam com esta questão, mas pode ser a maior fonte de erro nos nossos resultados.

Tendo em conta os problemas descritos anteriormente, tornou-se necessário pensar num novo método para quantificação da GFR. A quantificação por cintilografia líquida é uma alternativa que poderia contornar as dificuldades que surgiram com a inulina não radioactiva. Este método tem uma sensibilidade maior, o que permite a

quantificação de inulina em volumes de amostras da ordem dos μL . O uso de [^3H]-inulina ou [^{14}C]-inulina torna o processo de quantificação menos moroso e mais prático, mas os custos são elevados e a contaminação radioactiva obriga a uma manipulação cuidada e restrita. A [^3H]-inulina é relativamente mais barata do que a [^{14}C]-inulina. No entanto, a [^3H]-inulina é menos estável e sofre decomposição radioquímica. Estudos cromatográficos demonstram que vários lotes de diferentes fornecedores podem apresentar decomposição marcada^{129,130}. O perfil cromatográfico encontrado indica que existe radioactividade associada a fragmentos de polifrutose com peso molecular inferior ao da molécula original. Além disso, estudos de clearance em ratos demonstram que a clearance do isótopo ^3H decai ao longo da experiência, comparando com a clearance de do isótopo ^{14}C . O valor de GFR pode assim ser subestimado provavelmente devido a reabsorção tubular e acumulação de fragmentos de baixo peso molecular no plasma¹³⁰. Apesar das recomendações de Windfeld, Jonassen e Christensen, publicadas em 2003 em relação à fragmentação da [^3H]-inulina, continuam a ser publicados trabalhos em que é usada como marcador da GFR. De modo a clarificar as dúvidas que tínhamos em relação ao uso de [^3H]-inulina, entrámos em contacto com uma das investigadoras que usa este isótopo para determinar a GFR. Tomámos assim conhecimento de que a inulina radioactiva deve ser dialisada (membrana com poros de 1000 Da) de modo a remover os fragmentos mais pequenos e só depois usada para determinação da GFR. Este facto nunca é descrito na literatura. Segundo a experiência do grupo de investigação contactado, a concentração de inulina não radioactiva infundida tem de ser tão elevada que causa diurese, podendo afectar a determinação da GFR. Outro dos factos de que tomamos conhecimento foi o uso de ritmos diferentes para animais com diabetes experimental e animais não diabéticos (10 mL/Kg/h e 5 mL/Kg/h, respectivamente)¹³¹. Estes ritmos foram estabelecidos tendo em conta a perda de fluidos por via urinária, pulmonar e cutânea (dados não publicados). Esta questão da infusão a ritmos desde sempre nos pareceu pertinente mas, uma vez mais, nunca é referido na literatura.

Na sequência deste contacto, foi recentemente possível visitar o Department of Medical Cell Biology da Universidade de Uppsala, Suécia. Durante esta visita tomámos conhecimento de um novo método de quantificação da GFR baseado no decaimento da radioactividade ou da fluorescência, após injeção de um bólus por via intravenosa (IV), e posterior recolha de amostras de sangue (30-40 μL) de uma veia da cauda, a intervalos de tempo definidos. Este procedimento elimina a cirurgia e a instrumentação praticadas com os protocolos anteriormente descritos, que eram procedimentos morosos, que requeriam elevada destreza técnica e que impunham que o

animal estivesse anestesiado, o que poderia alterar os valores da GFR. Além disso, este método elimina também uma importante fonte de erro que é o não esvaziamento completo da bexiga. O facto de o animal estar consciente durante todo o protocolo torna a medição mais fisiológica, além de ser possível o seguimento dos animais estudados em diferentes períodos de tempo. Tal como a inulina radioactiva, a inulina fluorescente também tem de ser dialisada e é usada em pequenas quantidades, mas tem a vantagem de ser mais barata e elimina o problema da contaminação radioactiva. Esta troca de conhecimentos permitiu-nos definir um novo protocolo que será testado em breve.

4.2 EFEITO DA 2-CLOROADENOSINA SOBRE A LESÃO RENAL EM ANIMAIS COM DIABETES EXPERIMENTAL

Como já foi referido, este estudo demonstra, pela primeira vez, que a 2CADO é capaz de influenciar favoravelmente o desenvolvimento da nefropatia diabética, nomeadamente por normalizar a proteinúria e atenuar a glicosúria e a uremia. Além disso, foi observado pela primeira vez que ratos com diabetes experimentalmente induzida por injeção de STZ excretam mais angiotensinogénio do que ratos controlo.

Com o objectivo de elucidar os efeitos da adenosina na nefropatia diabética foi realizado um estudo metabólico. Neste estudo foi avaliado o peso corporal, a ingestão de comida e bebida, o volume de urina excretado, a excreção urinária de glicose, proteínas, creatinina, ureia e angiotensinogénio, a concentração plasmática de glicose, proteínas, creatinina e ureia, e foi também calculada a clearance da creatinina. Estes parâmetros foram determinados em animais controlo (CON), em animais diabéticos não tratados (STZ) e em animais diabéticos tratados com 2CADO (STZ+2CADO). A 2CADO é aproximadamente 50 vezes mais potente que a adenosina e não é substrato para a adenosina desaminase⁶⁹. Assim sendo, a 2CADO é frequentemente usada para estudar os efeitos da adenosina por ser um análogo estável, não metabolizável, que activa os mesmos receptores. Está descrito que a 2CADO diminui o fluxo sanguíneo renal, a fracção de filtração e a GFR em ratos anestesiados⁷⁰.

Quarenta e oito horas após a indução de diabetes por injeção de STZ, foram quantificados os níveis plasmáticos de glicose. Como era de esperar, verificou-se um aumento do valor de glicemia em jejum, nos animais injectados, o que confirma o estado diabético. A hiperglicemia (valores superiores a 270 mg/dL) observada é característica do modelo em estudo, sendo consequência da hipoinsulinemia resultante da destruição das células β do pâncreas⁷.

No grupo STZ não se verificou o aumento de peso observado no grupo CON. Esta observação é uma característica dos animais com diabetes induzida por STZ, já verificada por vários autores^{15,132,133,134}. Apesar de não se ter verificado aumento do peso corporal, o grupo STZ ingeriu mais comida do que o grupo CON. A polifagia é também uma característica deste modelo^{5,135,63}. A diabetes tipo I é caracterizada por concentrações baixas de insulina circulante. A insulina actua no hipotálamo para regular o peso corporal e a diminuição de insulina está associada a alterações na ingestão de comida, no sentido de a aumentarem¹³⁶. Além disso, a administração de insulina, neste modelo experimental de diabetes, aumenta a leptina plasmática¹³⁷. A leptina é secretada pelos adipócitos e actua no sistema nervoso central promovendo a sensação de saciedade o que implica uma menor ingestão de comida e o aumento do metabolismo energético. A hipoinsulinemia que caracteriza este modelo pode, assim, contribuir para a polifagia que se observa nestes animais.

O grupo STZ apresentou um aumento marcado da ingestão de água e da excreção de urina ao longo do estudo, quando comparado com o grupo CON. A poliúria^{5,63} e consequente polidipsia⁵ são também características dos animais com diabetes causada pela STZ. A poliúria verificada neste modelo experimental deve-se à diurese osmótica causada pelo excesso de glicose no filtrado. A glicose plasmática encontrava-se aumentada no grupo STZ. A hiperglicemia, verificada neste modelo experimental, está directamente relacionada com a hipoinsulinemia. Como já foi referido anteriormente, a hipoinsulinemia é característica da diabetes tipo I e neste modelo experimental é provocada pela destruição das células β do pâncreas por acção da STZ⁷. A insulina medeia a incorporação de glicose na maioria das células, através da activação dos transportadores de glicose¹³⁸. Em situações de hipoinsulinemia os transportadores de glicose não são activados, verificando-se um aumento plasmático da mesma. A hiperglicemia promove o aumento de glicose no filtrado. A reabsorção de glicose ocorre no túbulo proximal por transporte activo secundário mediado por cotransportadores membranares que co-transportam glicose e Na^+ . O transporte mediado por cotransportadores tem a propriedade de saturação. Assim, quando a molécula a transportar está presen-

te em concentrações elevadas, os transportadores podem ficar totalmente ocupados sendo atingido o seu nível máximo de transporte. O aparecimento de glicose na urina (glicosúria) reflecte uma concentração plasmática elevada, superior ao nível máximo de transporte. A presença de solutos em excesso no filtrado, implica um aumento da pressão osmótica do mesmo, o que, em consequência, diminui a absorção de água e causa diurese osmótica. Os nossos resultados confirmam o aumento da excreção urinária de glicose no grupo de animais STZ, descrito por vários autores^{5,132,134}.

Sete dias após a indução da diabetes com STZ não se verificou aumento de peso, observou-se um aumento da ingestão de comida e água, da excreção de urina, e da glicose plasmática e urinária, em relação ao grupo CON. Estes resultados confirmam que os animais injectados com STZ desenvolveram diabetes e consolidam o uso da STZ para indução da diabetes experimental.

A administração de 2CADO na dose de 5 mg/Kg a animais com diabetes experimental causou um aumento do peso corporal, uma atenuação da ingestão de comida e água, da diurese e da glicose plasmática e urinária. A hiperglicemia crónica é o factor com mais impacto na iniciação da nefropatia diabética¹³⁹. O controlo rigoroso da glicemia é fundamental para prevenir e retardar a lesão renal associada à diabetes. Os nossos resultados podem estar relacionados com o aumento de incorporação de glicose pelos tecidos. A adenosina pode baixar a glicemia e melhorar a resistência à insulina. Num estudo em que foi administrado, por via intravenosa, dipiridamole - para aumentar a adenosina endógena - ou N6-ciclopentiladenosina - para activar os receptores A₁ da adenosina - a ratos com diabetes experimental induzida por STZ, verificou-se um aumento do consumo de glicose e da síntese de glicogénio, com diminuição da glicose plasmática⁶⁴. Apesar de o modelo de diabetes experimental induzida por STZ estar associado a hipoinsulinemia, verifica-se também alguma resistência à insulina¹⁴⁰. A activação do receptor A₁ da adenosina, por agonistas parciais, melhora a resistência à insulina em animais com diabetes experimental tipo II⁶⁵. Esta melhoria da resistência à insulina por activação de receptores A₁ contribui para a diminuição da glicose plasmática, neste modelo experimental.

O aumento da captação de glicose pelos tecidos pode, assim, contribuir para o aumento de peso verificado com a administração de 2CADO. No nosso estudo, o tratamento com 2CADO, na dose de 5 mg/Kg, atenuou o aumento da ingestão de comida. A adenosina endógena, formada nos adipócitos aumenta a concentração plasmática de leptina por activação dos receptores A₁ da adenosina¹⁴¹. Uma vez que a leptina promove a sensação de saciedade, a 2CADO pode, assim, contribuir indirectamente para que os animais tratados tenham uma sensação de saciedade aumentada. No rim,

a diminuição de glicose circulante permite ainda uma diminuição da glicose presente no filtrado, uma menor perda de água por osmose e, conseqüentemente, a diminuição da ingestão de fluidos. De facto, a administração de 2CADO na dose de 5 mg/Kg aos animais diabéticos atenuou o aumento da ingestão de água e do volume de urina.

Um dos resultados mais marcantes deste estudo foi a normalização da proteinúria observada após tratamento dos ratos diabéticos com 2CADO na dose de 5 mg/Kg. O aumento da excreção urinária de proteínas observado após injeção de STZ (grupo STZ e grupos STZ+2CADO2 e STZ+2CADO5 no dia 12) é indicador de lesão glomerular e é característico da nefropatia diabética^{133,63}. No rim saudável, a passagem de proteínas para o filtrado é mínima, não se verificando proteinúria. O aumento da glicosilação proteica verificado na diabetes¹⁴² está intimamente relacionado com a lesão glomerular e conseqüente proteinúria. Na diabetes observa-se um aumento da glicosilação proteica devido à hiperglicemia. As proteínas podem ligar-se não-enzimaticamente à glicose e formar estruturas estáveis. O processo de glicosilação altera a estrutura das proteínas e, conseqüentemente, as suas funções. As células mesangiais expressam receptores de elevada afinidade para os produtos de glicosilação, cuja activação promove a libertação de factores de crescimento^{143,144} e proliferação celular mesangial¹⁴⁵. A subsequente deposição marcada de matriz extracelular, com oclusão capilar glomerular causa glomeruloesclerose^{28,29,30}. As alterações da membrana basal são acompanhadas por hiperfiltração e aumento da pressão hidrostática que resulta em microalbuminúria¹⁴⁶.

O tratamento com 2CADO na dose de 5 mg/Kg normalizou a excreção urinária de proteínas. Já tinha sido observado que administração de dipiridamole, um inibidor da recaptção da adenosina^{147,148}, aumenta o TGF⁶² previne a hiperfiltração glomerular, reduz a poliúria e proteinúria⁶³. As células mesangiais expressam receptores A₁ e A₂ da adenosina⁵⁶. A activação de receptores A₁ causa contracção das células mesangiais⁵⁷, enquanto que a activação de receptores A_{2B} inibe a produção de matriz extracelular nas células mesangiais¹⁴⁹ e a proliferação celular mesangial⁵⁸. A activação de receptores A_{2A} da adenosina produz um potente efeito anti-inflamatório^{150,151}. A infusão de agonistas dos receptores A_{2A}, em doses que não afectam a hemodinâmica sistémica, atenuam a inflamação e a lesão renal resultante da nefropatia diabética¹⁵². Por outro lado, nas células justaglomerulares, a adenosina, também por activação de receptores A₁, inibe a libertação de renina^{50,51,52}, modulando os níveis de Ang II no rim. A Ang II estimula a produção de matriz extracelular⁸⁴ e promove a hipertrofia das células mesangiais^{85,86}, contribuindo para a lesão glomerular^{95,84,96}. A Ang II encontra-se

aumentada na diabetes⁹³. A dose de 5 mg/Kg de 2CADO normalizou a excreção urinária de proteínas. A 2CADO é um análogo da adenosina com maior afinidade para os receptores A_1 . Apesar disso, a dose infundida pode ser suficiente para activar também os receptores A_{2A} e A_{2B} , pelo que o resultado da acção da 2CADO5 no rim corresponde ao balanço entre os efeitos mediados pelos receptores A_1 e A_2 . A normalização da excreção urinária de proteínas observada após tratamento dos ratos diabéticos com 2CADO5 sugere reversão da lesão glomerular. Este efeito pode estar relacionado com o efeito anti-inflamatório e anti-proliferativo mediados, respectivamente, pelos receptores A_{2A} e A_{2B} . A inibição da libertação de renina, mediada pelos receptores A_1 , pode também contribuir para os resultados observados, por diminuir a Ang II renal e atenuar a lesão glomerular. O facto de o efeito da 2CADO5 ter sido tão marcado (normalização e não apenas atenuação da proteinúria) sugere que, para além dos efeitos directos da 2CADO, haja activação de mecanismos renoprotectores indirectos. A inibição do RAS pela 2CADO pode ser a principal via de renoprotecção indirecta.

No grupo STZ observou-se uma diminuição das proteínas plasmáticas, quando comparado com o grupo CON. Esta diminuição pode estar relacionada com a proteinúria e com o aumento da glicosilação proteica verificadas na diabetes. Apesar de a proteinúria ter sido normalizada após tratamento com 2CADO na dose de 5 mg/Kg, não se verificaram alterações na concentração de proteínas plasmáticas. Sendo a hiperglicemia o principal factor determinante da lesão glomerular, a manutenção de concentrações plasmáticas elevadas de glicose (o tratamento com 2CADO atenuou mas não normalizou a glicemia) pode ter contribuído para este resultado, promovendo a glicosilação proteica.

O grupo STZ apresentou uma excreção urinária de creatinina aumentada em relação ao grupo CON. Esta excreção aumentada de creatinina reflecte a lesão glomerular, tal como a excreção aumentada de proteínas. A concentração de creatinina plasmática foi semelhante no grupo STZ e no grupo CON. A clearance de creatinina no grupo STZ foi superior à do grupo CON. Este aumento reflecte uma GFR superior nos animais tratados com STZ, como é característico deste modelo^{153,12,154,15,63}.

Após tratamento com 2CADO, nas duas doses em estudo, não se verificaram alterações nos resultados com a creatinina. Apesar dos resultados por nós obtidos, há evidência de que a adenosina tem capacidade para diminuir a GFR. Se consideramos que a creatinina é muitas vezes usada para avaliar a GFR, não é fácil de explicar porque não observamos qualquer efeito da 2CADO. A administração de dipiridamole a ratos diabéticos aumenta o TGF¹⁵⁴, o que, por sua vez induz a contracção da arteríola

aferente pré-glomerular, levando a uma diminuição da GFR. Por outro lado, a adenosina, no rim, funciona como vasoconstritora, por activação de receptores A_1 ^{155,39} de uma pequena porção pré-glomerular da arteríola aferente³⁷. Na diabetes causada por injeção de STZ, a produção renal de adenosina é superior à de animais controlo⁹ e observa-se uma maior resposta da vasculatura renal à adenosina⁶¹, quando comparada com ratos não diabéticos. Este aumento da sensibilidade à adenosina deve-se a um aumento da densidade dos receptores A_1 no glomérulo, sem alterações na afinidade¹⁵⁶. Estudos em que foi usada 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), um antagonista selectivo dos receptores A_1 da adenosina, demonstram que em ratos diabéticos uma pequena fracção de receptores tem de ser activada para obter uma resposta agonista completa⁶¹. Tendo em conta que a 2CADO é aproximadamente 50 vezes mais potente que a adenosina⁶⁹ e que não é metabolizada, a resposta vascular renal devia estar aumentada e, por isso, seria de esperar uma diminuição da GFR. O sinergismo entre a adenosina e a Ang II para contrair a arteríola aferente pode também contribuir para esta resposta aumentada. Na arteríola aferente isolada, a resposta contráctil à combinação de adenosina e Ang II é superior à soma dos efeitos de cada um destes fármacos¹⁰⁶. Na diabetes verifica-se um aumento de Ang II intrarenal⁹³. A adenosina pode, assim, causar diminuição da GFR pelo efeito vasoconstritor directo, ou indirectamente, por potenciar a vasoconstricção induzida pela Ang II e por aumentar o TGF.

No presente estudo, a 2CADO não alterou a excreção urinária, a concentração plasmática ou a clearance da creatinina. A explicação para este resultado pode estar relacionada com o uso da clearance da creatinina para estimar a GFR. Para uma molécula ser um bom marcador da GFR, não deve ser secretado nem reabsorvido, devendo apenas ser filtrado, e não deve ser biologicamente activo. A creatinina é secretada para os túbulos em casos de lesão glomerular^{157,158}, pelo que não é considerada um bom marcador da GFR. A creatinina e a consequente formação de ATP são produto da hidrólise da fosfocreatinina. Em situações normais, a concentração plasmática de creatinina é relativamente constante. Em casos de contracção aumentada do músculo verifica-se degradação da fosfocreatinina para obtenção de energia, produzindo-se, assim, mais creatinina do que o normal¹⁵⁹. Nestes casos, um aumento da creatinina urinária não se deve a hiperfiltração mas sim a catabolismo. Além disso, o método de Jaffé usado para determinação da creatinina não mede apenas a creatinina, mas também outras substâncias, nomeadamente o ácido úrico, a glicose, a fructose, a acetona, ácido pirúvico, acetoacetato e ácido ascórbico^{159,160}. Este facto faz com que a concentração de creatinina determinada seja superior ao real, particular-

mente no sangue. Apesar de conscientes da limitação do uso da clearance da creatinina para estimar a GFR, deste método era o único disponível no laboratório. Num futuro próximo, usando o método baseado no decaimento da concentração plasmática da inulina brevemente descrito anteriormente (secção 4.1), será possível determinar a GFR ao longo do tempo.

No estudo por nós desenvolvido, o grupo STZ excretou progressivamente mais ureia do que o grupo CON. A administração de 2CADO, nas duas doses, preveniu o aumento da excreção de ureia. O modelo experimental em estudo é caracterizado por hiperglicemia resultante da hipoinsulinemia⁷. Na ausência de insulina, o glucagon promove o catabolismo de aminoácidos provocando azotemia, por isso na diabetes existe uma excreção aumentada de azoto sob a forma de ureia¹⁶¹. A ureia é a maior fonte de excreção de azoto em mamíferos, a maioria sendo formada no fígado, a partir do ciclo da ureia. Já foi referido que a diminuição da glicosúria por nós observada após tratamento com 2CADO5, pode estar relacionada com o aumento da captação de glicose pelos tecidos⁶⁴. O aumento de incorporação de glicose pelas células pode diminuir a necessidade de catabolismo de aminoácidos, podendo isso reflectir-se pelo não agravamento da excreção de azoto sob a forma de ureia.

Pela primeira vez foi quantificada a excreção urinária de angiotensinogénio em ratos com diabetes experimental induzida por injeção de STZ. Observou-se uma maior excreção urinária de angiotensinogénio no grupo STZ, em comparação com o grupo CON. Uma vez que o angiotensinogénio urinário reflecte o angiotensinogénio renal e é considerado um bom marcador da actividade do RAS renal⁷⁶, podemos concluir que no modelo experimental de diabetes causada por injeção de STZ se verifica um aumento da actividade do RAS intrarenal. Estes resultados estão de acordo com os observados em ratos Zucker obesos, um modelo de diabetes tipo II⁷². Já tinha sido observado um aumento de angiotensinogénio acompanhado de um aumento de Ang II em extractos glomerulares de ratos Sprague-Dawley com diabetes induzida por STZ¹³². Em ratos com diabetes experimental verifica-se aumento de renina intrarenal^{85,91,92}, maior expressão de mRNA para renina e angiotensinogénio, aumento do enzima conversor da angiotensina⁸⁵ e da concentração de Ang II no interstício renal⁹³. Considerando que têm sido identificados RAS locais, este aumento da actividade do RAS renal em ratos com diabetes experimental induzida por STZ remete para a importância deste sistema na fisiopatologia deste modelo experimental e, mais concretamente, da nefropatia associada. No rim estão presentes todos os componentes do

RAS. O facto da concentração renal de Ang II ser superior à circulante indica a existência de uma regulação independente. O mRNA e a proteína de angiotensinogénio renal encontram-se predominantemente nas células do túbulo proximal^{162,163,164}. O angiotensinogénio é secretado para o lúmen tubular onde, por acção da renina, é convertido em angiotensina I. Ao infundir angiotensinogénio humano em rato, Kobori et al (2003) verificou que este se encontrava no plasma, mas não na urina de rato, confirmando a limitada permeabilidade glomerular e/ou degradação tubular do angiotensinogénio filtrado. O angiotensinogénio humano é semelhante ao do rato, tem estrutura e tamanho semelhantes, mas a renina é específica para cada espécie, sendo o angiotensinogénio humano inactivo quando administrado a ratos. Num estudo recente, em doentes com doença renal crónica foi demonstrado que a excreção urinária de angiotensinogénio é superior em pacientes com baixa GFR e com elevada concentração de proteínas urinárias¹⁶⁵. Nestes pacientes também se verifica concentração intrarenal aumentada de Ang II, e o tratamento com losartan (um antagonista dos receptores AT₁ da Ang II) reduziu a excreção urinária de angiotensinogénio, apesar do aumento concomitante da actividade de renina e da concentração de Ang II plasmáticas. Estes resultados confirmam a hipótese de que o angiotensinogénio urinário tem origem renal e não plasmática.

O tratamento dos ratos com diabetes experimental com 2CADO, nas duas doses em estudo, não alterou o perfil da excreção urinária de angiotensinogénio apresentado pelo grupo STZ. A adenosina é um modulador do RAS por inibir a libertação de renina^{50,51,52}. O antagonismo dos receptores da adenosina com DPSPX causa hipertensão¹¹³ com aumento da actividade de renina plasmática¹¹⁴ e dos níveis de Ang II¹¹⁵. Neste sentido, seria de esperar que a infusão de 2CADO diminuísse a concentração de angiotensinogénio urinário. No entanto, não se verificou alteração significativa da excreção urinária de angiotensinogénio após tratamento com 2CADO. Este resultado pode dever-se ao facto de as doses infundidas não serem suficientes para inibirem significativamente o RAS renal, e, conseqüentemente diminuir a excreção urinária de angiotensinogénio. Não foram testadas doses superiores de 2CADO porque o efeito vasodilatador sistémico causa uma diminuição marcada da pressão arterial (dados não apresentados), ultrapassando o limite de autorregulação. Este facto faria com que os resultados fossem consequência de mecanismos compensatórios de manutenção da homeostase e não do efeito renal directo da 2CADO.

O trabalho experimental realizado no contexto desta dissertação permitiu-nos confirmar o efeito benéfico indiscutível da adenosina no contexto da nefropatia diabética. A 2CADO atenua o não aumento de peso corporal e o aumento da ingestão de comida e bebida, e da excreção de urina. Além disso, atenua a excreção urinária de glicose e de ureia e normaliza a excreção de proteínas. Estes efeitos da 2CADO podem estar directamente relacionados com a capacidade para baixar a glicemia e melhorar a resistência à insulina. Por outro lado, efeitos renais directos e indirectos contribuem também para atenuar a progressão da nefropatia diabética. São necessários, no entanto, estudos mais aprofundados para estudar se a interacção adenosina/Ang II participa nesta renoprotecção indirecta. O presente trabalho permitiu também concluir que é possível estimar a GFR usando a clearance da inulina. No entanto, o melhor procedimento obriga ao uso da inulina radioactiva ou fluorescente (bólus IV), e à quantificação do time-course do decaimento da radioactividade ou da fluorescência respectiva do sangue do animal.

5. REFERÊNCIAS

1. **World Health Organization:** <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/diabetes/en/>, Agosto 2008.
2. **Silink M:** Childhood diabetes: A global perspective. *Horm Res* 57:1–5, 2002.
3. **American Diabetes Association:** Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 31: S55-60, 2008.
4. **Rees D.A. and Alcolado J.C.:** Animal models of diabetes mellitus. *Diabetes Medicine* 22:359-370, 2005.
5. **Akbarzadeh A., Norouzzian D., Mehrabi M.R., Jamshidi Sh., Farhangi A., Allah Verdi A., Mofidian S.M.A. and Lame Rad B.:** Induction of diabetes by streptozotocin rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistr*, 22 (2) 60-64, 2007.
6. **Dunn J., Sheehan H. and McLethie N.:** Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet*, 1: 484-487, 1943.
7. **Junod A., Lambert A.E., Stauffacher W., Renold A.E.:** Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*, 48: 2129–2139, 1969.
8. **Lenzen S., Tiedge M., Jorns A. and Munday R.:** Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: *Lessons from Animal Diabetes*, E SHAFRIR (ed), Birkhauser, Boston, pp 113-122, 1996.
9. **Bono V.H.:** Review of mechanism of action studies of the nitrosureas. *Cancer Treat Rep*; 60:699–702, 1976.~
10. **Karunanayake E.H., Hearse D.J., Mellows G.:** The metabolic fate and elimination of streptozocin. *Biochemical Society Transactions*, 3: 410-14, 1975.
11. **Weiss R.B.:** Streptozocin: A review of its pharmacology, efficacy and toxicity. *Cancer Treatment Report* 66 (3):427-38, 1982.
12. **Hostetter T.H., Troy J.L., Brenner B.M.:** Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 19:410-415, 1981.
13. **Hirose K., Osterby R., Nozawa M., Gundersen H.J.G.:** Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int* 21:689-695,1982.
14. **Palm F., Ortsäter H., Liss P. and Carlsson P-O.:** Differentiation between effects of streptozotocin per se and subsequent hyperglycemia on renal function and metabolism in the streptozotocin-diabetic rat model. *Diabetes-Metab. Res. Rev.*, 20:452-59, 2004.
15. **Palm F., Liss P., Fasching A., Hansell P. and Carlsson P.-O.:** Transient Glomerular Hyperfiltration in the Streptozotocin- Diabetic Wistar Furth Rat. *Upsala J Med Sci* 106: 175–182, 2001.
16. **Fox S. I.:** Human Physiology. MacGraw-Hill (ed), New York, 2008.
17. **Gaspari F, Perico N., and Remuzzi G.:** Measurement of glomerular filtration rate. *Kidney Int Suppl* 63: S151–154, 1997.
18. **Komers R., Schutzer W., Xue H., Oyama T.T., Lindsley J.N. and Anderson S.:** Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on blood pressure, renal hemodynamics, and renal vascular reactivity in normal and diabetic rats. *Translational Research*,150:343-349, 2007.
19. **Roe J.H., Epstein J.H. and Goldstein N.P.:** A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem*, 178:839, 1948.
20. **Szczepañska-Konkel M., Jankowski M., Stiepanow-Trzeciak A., Rudzik T., Pawelczyk and Angielski S.:** Responsiveness of renal glomerulo to adenosine in streptozotocin-induced diabetic rats dependent on hyperglycaemia level. *Jor of Physiology and Pharmacology*, 54:109-120, 2003.
21. **Arendshorst W.J., Finn W.F. and Gottschalk C.W.:** Autoregulation of blood flow in the rat kidney. *Am J Physiol*, 228: 127-33, 1975.41
22. **Navar L.G., Inscho E.W., Majid S.A., Imig J.D., Harrison-Bernard L.M. and Mitchell K.D.,** Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev*, 76: 425-536, 1996.
23. **Ritz E and Orth SR:** Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:1127-1133, 1999.
24. **Marre M., Hallab M., Roy J., Lejeune J.J., Jallet P. and Fressinaud P.:** Glomerular hyperfiltration in type I, type II, and secondary diabetes. *J Diabetes Complications* 6(1): 19-24, 1992.

25. **Cohen R.**: Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation*, 87: v67-v76, 1993.
26. **Yip J.W.**, Jones S.L., Wiseman M.J., Hill C. and Viberti G.: Glomerular hyperfiltration in the prediction of nephropathy in IDDM: a 10-year follow-up study. *Diabetes* 45: 1729-33, 1996.
27. **Østerby R.**: Early phases in the development of diabetic glomerulopathy. A quantitative electron microscopic study. *Acta Med Scand*, 574: 1-82, 1975.
28. **Couser W.G.** and Johnson R.J.: Mechanisms of progressive renal disease in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*, 23: 193-198, 1994.
29. **D'Amico G.**, Ferrario F. and Rastaldi M.P.: Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis*, 26: 124-132, 1995.
30. **Floege J.**, Eng E., Lindner V., Alpers C.E., Young B.A., Reidy M.A. and Johnson R.J.: Rat glomerular mesangial cells synthesize basic fibroblast growth factor. Release, upregulated synthesis, and mitogenicity in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Clin Invest*. 90: 2362-2369, 1992.
31. **Jacobsen Peter Karl**: Preventing end-stage renal disease in diabetic patients – dual blockade of the Renin-Angiotensin System (Part II). *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 6-2, 2005.
32. **Safar M.**, Thijs L., Staessen J.A.: Syst-Eur study: analysis of the benefits of nitrendipine in hypertensive type 2 diabetics. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 96: 768-771, 2003.
33. **Kriz W.**, Gretz N. and Lemley K.V.: Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney International*, 54: 687-697, 1998.
34. **Vallon V.**, Bernd M. and Osswald H.: Adenosine and kidney function. *Physiol Rev* 86:901-940, 2006.
35. **Welch, William J.**: Adenosine A1 receptor antagonists in the kidney: effects in fluid-retaining disorders. *Current Opinion in Pharmacology*, 2:165-170, 2002.
36. **Holz F.G.** and Steinhausen M.: Renovascular effects of adenosine receptor agonists. *Renal Physiol* 10:272-282, 1987.
37. **Weihprecht H.**, Lorenz J.N., Briggs J.P., Schnermann J.: Vasomotor effects of purinergic agonists in isolated rabbit afferent arterioles. *Am J Physiol* 263:F1026-F1033, 1992.
38. **Oliveira A.**, Lams S., Rodriguez-Puyol D. and Lopez-Novoa J.M.: Adenosine induces mesangial cell contraction by a A₁-type receptor. *Kidney Int.*, 35: 152-161, 1989.
39. **Spielman W.S.** and Arend L.J.: Adenosine receptors and signalling in the kidney. *Hypertension* 17:117-130, 1991.
40. **Schrader J.** Formation and metabolism of adenosine and adenine nucleotides in cardiac tissue. In: Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function. Phillis JW. Boca Raton, FL: CRC (ed), p. 55-69, 1991.
41. **Schwiebert E.M.** and Kishore B.K.: Extracellular nucleotide signaling along the renal epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F945-F963, 2001.
42. **Lloyd H.G.**, Deussen A., Wuppermann H., and Schrader J.: The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. *Biochem J* 252: 489-494, 1988.
43. **Spielman W.S.** and Thompson C.I.: A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and rennin release. *Am J Physiol* 242:F423-F435, 1982.
44. **Nishiyama A.**, Rahman M and Inscho E.W.: Role of interstitial ATP and adenosine in the regulation of renal hemodynamics and microvascular function. *Hypertens Res*, 27: 791-804, 2004.
45. **Schermann J.** and Briggs J.: Concentration-dependent sodium chloride transport as the signal in feedback control of glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 12: 82-89, 1982.
46. **Osswald H.**, Hermes H.H. and Nabakowski G.: Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int Suppl*, 12:S136-S142, 1982.
47. **Thomson S.**, Bao D., Deng A. and Vallon V.: Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J Clin Invest*, 106:289-298, 2000.
48. **Brown R.**, Ollerstam A., Johansson B. Skøtt Ole, Samuel Gebre-Medhin, Bertil Fredholm, and A. Erik G. Persson: Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A(1) receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1362-R1367, 2001.
49. **Sun D.**, Samuelson L.C., Yang T., Huang Y., Paliege A., Saunders T., Briggs J. and Schnermann J.: Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 9983-9988, 2001.

50. **Tagawa H.** and Vander A.J.: Effects of adenosine compounds on renal function and renin secretion in dogs. *Circ. Res.*, 26: 327-338, 1970.
51. **Weihprecht H.**, Lorenz J.N., Schnermann J and Briggs J.P.: Effect of adenosine receptor blockade on renin-release from the rabbit isolate perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest*, 79: 710-714, 1987.
52. **Wise A.**, Sheehan M. Rees S., Lee M. and Killigan G.: Comparative analysis of the efficacy of A₁ adenosine receptor activation of G_{1/0} α G proteins following coexpression of receptor and G protein and expression of A1 adenosine receptor-G_{1/0} α fusion proteins. *Biochemistry* 38: 2272-2278, 1999.
53. **Coulson R.**, Johnson R.A., Olsson R.A., Cooper D.R. and Scheinman S.J.: Adenosine stimulates phosphate release and glucose transport in opossum kidney epithelial cells. *Am J Physiol.*, 260: F921-F928, 1991.
54. **Gellai M.**, Schreiner G.F., Ruffolo R.R. Jr., Fetcher T., DeWolf R., Brooks D.P.: CVT-124, a novel adenosine A1 receptor antagonist with unique diuretic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1191-1196, 1998.
55. **Wilcox C.S.**, Welch W.J., Schreiner G.F., Belardinelli L.: Natriuretic and diuretic actions of a highly selective adenosine A1 receptor antagonist. *J Am Soc Nephrol*, 10:714-720, 1999.
56. **Olivera A.**, Tomas M., Lopez-Novoa J.M.: Effect of adenosine A1 and A2 agonists and antagonists on cAMP and Ca²⁺ in cultured rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 262: C840-4, 1992.
57. **Lopez-Novoa J.M.**, de Arriba G., Barrio V., Rodriguez-Puyol D.: Adenosine induces a calcium-dependent glomerular contraction. *Eur J Pharmacol.*, 134: 365-367, 1987.
58. **Dubey R. K.**, Gillespie D. G., Mi Z. and Jackson E. K.: Adenosine Inhibits PDGF-Induced Growth of Human Glomerular Mesangial Cells Via A2B Receptors. *Hypertension*, 46: 628-634, 2005.
59. **Angielski S.**, Jakubowski Z., Pawelczyk T., Piec G. and Redlak M.: Renal handling and metabolism of adenosine in diabetic rats. *Hedland A, Koch KM, Heidbreder E (eds): Diabetes and the kidney. Contrib Nephrol. Basel Karger.* 73: 52-58, 1989.
60. **Jensen P.K.**, Kristensen K.S., Rasch R and Persson A.E.G.: Decreased sensitivity of the tubuloglomerular feedback mechanism in experimental diabetic rats. In: Persson AEG, Boberg U (eds) *The juxtaglomerular apparatus*. Elsevier, Amsterdam New York, pp 333-338, 1988.
61. **Pflueger A.C.**, Schenk F., and Osswald H.: Increased sensitivity of the renal vasculature to adenosine in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 269:F529-F535, 1995.
62. **Osswald H.**, Nabakowski G. and Hermes H.: Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int J Biochem*, 12: 263-267, 1980.
63. **Vallon V.** and Osswald H.: Dipyridamole prevents diabetes-induced alterations of kidney function in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349:217-222, 1994.
64. **Cheng J.T.**, Chi T.C. and Liu M.: Activation of adenosine A1 receptors by drugs to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Auton Neurosci*, 83(3): 127-33, 2000.
65. **Dhalla A.K.**, Wong M. Y., Vosho P.J., Belardinelli L. and Reaven G. M.: A1 adenosine receptor partial agonist lowers plasma FFA and improves insulin resistance induced by high-fat diet in rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292: E1358-E1363, 2007.
66. **Dhalla A.K.**, Shryock J.C., Shreeniwas R., Belardinelli L.: Pharmacology and therapeutic applications of A1 adenosine receptor ligands. *Curr Top Med Chem* 3: 369-385, 2003.
67. **Jeng C.Y.**, Fuh M.M., Sheu W.H., Chen Y.D., Reaven G.M.: Hormone and substrate modulation of plasma triglyceride concentration in primary hypertriglyceridemia. *Endocrinol Metab* 1: 15-21, 1994.
68. **Olefsky J.M.**, Farquhar J.W., Reaven G.M.: Reappraisal of the role of insulin in hypertriglyceridemia. *Am J Med* 57: 551-560, 1974.
69. **Powlowska D.**, Granger J.P. and Knox F.G.: Effects of adenosine infusion into renal interstitium on renal hemodynamics. *Am. J. Physiol.* 252:F678-F682, 1987.
70. **Churchill P.C.:** Renal effects of 2-chloroadenosine and their antagonism by aminophylline in anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222: 319-323, 1982.
71. **Zhuo, J.L.** and Li X.C.: Novel roles of intracrine angiotensin II and signalling mechanisms in kidney cells. *JRAAS*, 8: 23-33, 2007.

72. **Kobori H.**, Nangaku M., Navar L.G. and Nishiyama A.: The intrarenal rennin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59(3): 251-287, 2007.
73. **Navar L.G.**, The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Med Clin North Am*, 80: 1165-1198, 1997.
74. **Navar L.G.**, Harrison-Bernard L.M., Imig J.D., Wang C.T., Cervenka L. and Mitchell K.D.: Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade. *J Am Soc Nephrol*, 12: S266-S272, 1999.
75. **Navar L.G.** and Nishiyama A : Intrarenal formation of angiotensin II. *Contrib Nephrol*: 1-15, 2001.
76. **Kobori H.**; Nishiyama A.; Harrison-Bernard L.M. and Navar L.G.: Urinary Angiotensinogen as an Indicator of Intrarenal Angiotensin Status in Hypertension. *Hypertension*, 41:42, 2003.
77. **Rohrwasser A.**, Morgan T., Dillon H.F., Zhao L., Callaway C.W., Hillas E., Zhang S., Cheng T., Inagami T., Ward K., Terros D.A. and Lalouel J-M: Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension*, 34: 1265-1274, 1999.
78. **Casarini D.E.**, Boim M.A, Stella R.C., Krieger-Azzolini M.H., Krieger J.E. and Schor N.: Angiotensin I-converting enzyme activity in tubular fluid along the rat nephron. *Am J Physiol*, 272: F405-409, 1997.
79. **Modrall J.C.**, Sadjadi J., Brosnihan K.B., Gallagher P.E., Yu C.H., Kramer G.L., Bernstein K.E. and Chappell M.C.: Depletion of tissue angiotensin-converting enzyme differentially influences the intrarenal and urinary expression of angiotensin peptides. *Hypertension*, 43: 849-853, 2004.
80. **Osswald V.**: Angiotensina e sistema renina-angiotensina. In: Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. Porto Editora Lda (ed), p. 408, 2006
81. **Blantz RC**, Konnen KS, and Tucker BJ :Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat. *J. Clin Invest* 57: 419-434, 1976.
82. **Rosivall L** and **Navar L.G.**: Effects on renal hemodynamics of intra-arterial infusions of angiotensins I and II *Am J Physiol* :245: F181-F187, 1983.
83. **Sharma M.**, Sharma R., Greene A.S., MacCarthy E.T., and Savin V.J.: Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* 274: F623-F627, 1998.
84. **Kagami S.**, Border W.A., Miller D.E. and Noble N.A.: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 2431-2437, 1994.
85. **Anderson P.W.**, Do Y.S. and Hsueh W.A.: Angiotensin II causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension*, 21, 29-35, 1993.
86. **Wolf G.**, Haberstroh U. and Neilson E.G.: Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *American Journal of Pathology*, 140: 95-107, 1992.
87. **Mitchell KD**, Braam B, and Navar L.G.: Hypertensionogenic mechanisms mediated by renal actions of renin-angiotensin system. *Hypertension*, 19: 118-127, 1992.
88. **Schermann J.** and Briggs J. : Role of the renin-angiotensin system in tubuloglomerular feedback. *Fed Proc.* 45: 1426-1430, 1986.
89. **Schermann J.B.**, Traynor T, Yang T, Huang Y.G., Oliverio M.I., Coffman T, and Briggs J.P.: Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol*, 273: F315-F320, 1997.
90. **Traynor T.**, Yang T., Huang Y.G., Kregge J. H., Biggs J.P., Smithies O., and Schermann J., Tubuloglomerular feedback in ACE-deficient mice. *Am J Physiol*, 276: F751-F757, 1999.
91. **Burns K.D.** and Harris R.C.: Signaling and growth responses of LLC-PK1/C14 cells transfected with the rabbit AT1 ANG II receptor. *Am J Physiol*, 268:C925-935, 1995.
92. **Correa-Rotter R.**, Hostetter T.H. and Rosenberg M.E.: Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int*, 4: 796-804, 1992.
93. **Siragy H.M.**, Awad A., Abadir P. and Webb R.: The angiotensin II type 1 receptor mediates renal interstitial content of tumor necrosis factor-alpha in diabetic rats. *Endocrinology*, 144: 2229-2233, 2003.
94. **Loon N.**, Shemesh O., Morelli E., and Myers B.D.: Effect of angiotensin II infusion on the human glomerular filtration barrier. *Am J. Physiol* 257: F608-F614, 1989.
95. **Hoffmann S.**, Podlich D., Hähnel B., Kriz W. and Gretz N.: Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1475-1487, 2004.

96. **Miller P.L., Rennke H.G., and Meyer T.W.:** Glomerular hypertrophy accelerates hypertensive glomerular injury in rats. *Am J Physiol* 261: F459-F465, 1991.
97. **Singh R, Alavi N, Singh AK, Leehey DJ:** Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes* 48: 2066–2073, 1999.
98. **Zhang S.L., Filep J.G., Hohman T.C., Tang S.S., Ingelfinger J.R. and Chan J.S.D.:** High levels of glucose stimulate angiotensinogen gene expression via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 55: 454–464, 1999.
99. **Barnett A.H.:** Preventing renal complications in diabetic patients: the diabetics exposed to telmisartan and enalapril (DETAIL) study. *Acta Diabetol*, 42: S42-S49, 2005.
100. **Chobanian A.V. et al.:** The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *NIH Publication*, 3 – 5233, 2003.
101. **Griffin K.A. and Bidani A.K.:** Progression of renal disease: renoprotective specificity of renin-angiotensin system blockade. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1: 1054-1065, 2006.
102. **McFarlane S.I., Kumar A. and Sowers J.R.:** Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 91(suppl):30H-37H, 2003.
103. **Moiz M.S., Dillep V.M. and Ronald G.V.:** Oral direct renin inhibition: promise promise, and potential limitations of a new antihypertensive drug. *Am J Med*, 121: 265-271, 2008
104. **Anderson S., Meyer T.W., Rennke H.G. and Brenner B.M.:** Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest*, 76: 612-619, 1985.
105. **Zatz R., Dunn B.R., Meyer T.W., Anderson S., Rennke H.G. e Brenner B.M.:** Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77: 1925–1930, 1986.
106. **Weihprecht H., Lorenz J.N., Briggs J.P., and Schnermann J.:** Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 266:F227–F239, 1994.
107. **Macias-Nunez J.F., Garcia Iglesias C., Santos J.C., Sanz E., and Lopez-Novoa J.M.:** Influence of plasma renin content, intrarenal angiotensin II, captopril, and calcium channel blockers on the vasoconstriction and renin release promoted by adenosine in the kidney. *J Lab Clin Med* 106:562–567, 1985.
108. **Spielman W.S. and Osswald H.:** Blockade of postocclusive renal vasoconstriction by an angiotensin II antagonists: evidence for an angiotensin-adenosine interaction. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 237:F463–F467, 1979.
109. **Traynor T., Yang T., Huang Y.G., Arend L., Oliverio M.I., Coffman T., Briggs J.P., and Schnermann J.:** Inhibition of adenosine-1 receptor- mediated preglomerular vasoconstriction in AT1A receptordeficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F922–F927, 1998.
110. **Hansen P.B., Hashimoto S., Briggs J., and Schnermann J.:** Attenuated renovascular constrictor responses to angiotensin II in adenosine 1 receptor knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R44–R49, 2003.
111. **Jackson, E.K.:** Adenosine: a physiological brake on renin release. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:1-35, 1991.
112. **Kuan C.J., Wells J.N. and Jackson E.K.:** Endogenous adenosine restrains renin release in conscious rats. *Circ Res*, 66: 637-646, 1990.
113. **Albino-Teixeira A., Matias A., Polonia J., Azevedo I.:** Blockade of adenosine receptors causes hypertension and cardiovascular structural changes in the rat. *J. Hypertens.* 9:S196-S197, 1991.
114. **Sousa T., Morato M., Albino-Teixeira A.:** Angiotensin converting enzyme inhibition prevents trophic and hypertensive effects of an antagonist of adenosine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 441: 99-104, 2002
115. **Morato M., Sousa T., Guimaraes S., Moura D., Albino-Teixeira A.:** The role of angiotensin II in hypertension due to adenosine receptors blockade. *Eur. J. Pharmacol.* 455:135-41, 2002.
116. **McCubbin J.W., DeMoura R.S., Page I.H. and Olmsted F.:** Arterial hypertension elicited by subpressure amounts of angiotensin. *Science*, 149, 1394– 1395, 1965.
117. **Heyrovsky A.:** A new method for the determination of inulin in plasma and urine. *Clinica Chimica Acta* 1: 470-474, 1956
118. **Anderson S., Jung F.F. and Ingelfinger J.R.:** Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol*, 265: F477-486, 1993.

119. Navar L.G.: The role of the kidneys in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 9: 542-549, 2005.
120. Navar L.G., Kobori H. and Prieto-Carrasquero M.: Intrarenal angiotensin II and hypertension. *Curr Hypertension Rep*, 5: 135-143, 2003.
121. Bak M., Shalmi M., Petersen J.S., Poulsen L.B. and Christensen S.: Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on renal adaptations to acute furosemide administration in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 33-40, 1993.
122. Davidson W.D. and Sachner M.A.: Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 62: 351-356, 1963
123. Mónica Torres A., Laughlina M. M., Mullera A., Brandoni A., Anzaic N. and Endouc H.: Altered renal elimination of organic anions in rats with chronic renal failure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740: 29- 37, 2005.
124. Phelps C.F.: The Physical properties of inulin solutions. *Biochem. J.*, 95:41-47, 1965.
125. White H.L. and Rolf D.: Whole Body and Tissue Inulin and Sucrose Spaces in the Rat. *Am. J. Physiol.*, 188(1): 151-155. 1957.
126. Sampaio-Maia B., Moreira-Rodrigues M., Serrão P. and Pestana M.: Blunted renal dopaminergic system activity in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 21: 314-323, 2006.
127. Berghofer E., Cramer A., Schmidt U. and Veigl M.: Pilot-scale production of inulin from chicory roots and its use in foodstuffs. In: Inulin and inulin containing crops. FUCHS, A. (Ed.), Amsterdam, p. 77-84, 1993.
128. Haully M.C.O., Moscatto J.A.: .Inulin and Oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológica, Londrina* 23: 105-118, 2002.
129. Waugh W.H.: Photometry of inulin and polyfructosan by use of a cysteine/tryptophan reaction. *Clin Chem*, 23: 639-645, 1977.
130. Windfeld S., Jonassen T.E.N. and Christensen S.: [3H]Inulin as a Marker for Glomerular Filtration Rate. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285: F575-F576, 2003.
131. Nordquist, L, Moe E. and Sjoquist M.: The C-peptide fragment EVARQ reduces glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 400-405, 2007.
132. Leehey D.J., Singh A.K., Bast J.P., Sethupathi P. and Singh R.: Glomerular renin angiotensin system in streptozotocin diabetic and Zucker diabetic fatty rats. *Transl Res*, 151: 208-216, 2008.
133. Tikellis C., Johnston C.I., Forbes J.M., Burns W.C., Burrell L.M., Risvanis J. and Cooper M.E.: Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy., *Hypertension*, 41: 392-397, 2003.
134. Volpini R.A., da Silva C.G., Costa R.S. and Coimbra T.M.: Effect of enalapril and losartan on the events that precede diabetic nephropathy in rats. *Diabetes Metab Res Rev*, 19: 43-51, 2003.
135. Boothe DA: Characteristics of feeding during streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Comp Physiol Psych* 2:1238-1240, 1972.
136. Morton G.J., Cummings D.E., Baskin D.G., Barsh G.S. and Schwartz M.W.: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443: 289-295, 2006.
137. Have P.J.L., Uriu-Hare J.Y., Liu T., Stanhope K. L., Stern J.S., Keen C.L., and Ahre'n B.: Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *American journal of physiology*, 43: R1482-R1491, 1998.
138. Brozinick J.T.Jr., Berkemeier B.A. and Elmendorf J.S.: "Acting" on GLUT4: Membrane & Cytoskeletal Components of Insulin Action. *Curr Diabetes Rev*, 3(2): 111-122, 2007.
139. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), *Medscape Diabetes & Endocrinology*, 2000.
140. Nishimura H., Kuzuya H., Okamoto M., Yamada K., Kosaki A., Inoue G., Kono S. and Imura H.: Postreceptor defect in insulin action in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 256 (Endocrinol. Metab. 19): E624-E630, 1989.
141. Rice A.M., Fain J.M. and Rivkees S.A.: A1 adenosine receptor activation increases adipocyte leptin secretion. *Endocrinology*, 141: 1442-1445, 2000.
142. Stanaway S.E.R.S. and Gill G.V.: Protein glycosylation in diabetes mellitus: biochemical and clinical considerations. *Practical Diabetes International*, 17: 21-25, 1999.

143. **Shalnik** E.Y., Yong Z., Mahita Z., Rodoff S., Kirstein M. and Vlassara H.: Human and rat mesangial cell receptors for glucose modified protein: potential role in kidney tissue remodelling and diabetic nephropathy. *J Exp Med*; 174: 931-1239, 1991.
144. **Vlassara** H., Brownlee M., Cerami A.: High affinity receptor mediated uptake and degradation of glucose modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82: 5588-92, 1985.
145. **Doi** T., Vlassara H., Kirstein M., Yamada Y., Striker G.E. and Striker L.J.: Receptor specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation endproducts is mediated via platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2873-77, 1992.
146. **Mason** Roger M. and Wahab N.A.: Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14:1358-1373, 2003.
147. **Roos** H. and Pflieger K.: Kinetics of adenosine uptake by erythrocytes and the influence of dipyridamole. *Mol Pharmacol* 8: 417-425, 1972.
148. **Schrader** J., Berne R.M. and Rubio R.: Uptake and metabolism of adenosine by human erythrocyte ghosts. *Am J Physiol* 223: 159-166, 1972.
149. **Dubey** R. K., Gillespie D. G., Mi Z. and Jackson E. K.: Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat glomerular mesangial cells via A_{2B} receptors. (Abstract) *Hypertension*, 30: 509, 1997.
150. **Bullough** DA, Magill MJ, Firestein GS, and Mullane KM. Adenosine activates A2 receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated cardiac myocytes. *J Immunol* 155: 2579–2596, 1995.
151. **Okusa** M.D., Linden J., Huang L., Rosin D.L., Smith D.F. and Sullivan G.: Enhanced protection from renal ischemia-reperfusion injury with A_{2A} adenosine receptor activation and PDE 4 inhibition. *Kidney Int* 59: 2114–2125, 2001.
152. **Awad** A.S., Huang L., Ye H., Duong E.T.A., Bolton W.K., Linden J. and Okusa M.D. Adenosine A_{2A} receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F828–F837, 2006.
153. **Hebden** R.A., Gardiner S.M., Bennett T, AND Macdonald I.A.: The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin. Sci.* 70: 111-117, 1986.
154. **Jensen** P.K., Christiansen J.S., Steven K. and Parving H.H.: Strict metabolic control and renal function in the streptozotocin diabetic rat. *Kidney Int*, 31: 47-51, 1987.
155. **Osswald** H., Schmitz H.J., and Kemper R.: Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303:95–99, 1978.
156. **Albinus** M., Halene S., Riehle R., Englert R. and Osswald H.: Characterization of adenosine-A₁-receptors in glomerular membranes from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus (Abstract). *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 349: 114, 1994.
157. **Berlyne** G.M.: Endogenous creatinine clearance and the glomerular filtration rate. *Am Heart J*, 70:143–145, 1965.
158. **Carrie** B.J., Golbetz H.V., Michels A.B., Myers B.D.: Creatinine: An inadequate filtration marker in glomerular diseases. *Am J Med*, 69: 177–182, 1980.
159. **Doolan** P.D., Alpen, E.L. and Theil, G.B.: A clinical appraisal of the plasma concentration and endogenous clearance of creatinine. *Am. J. Med.*, 32: 65-79, 1962.
160. **Young** D.S., Thomas D.W., Friedman R.B. and Pestamer L.C.: Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin. Chem.*, 18: 1041-1303, 1972.
161. **McLean** P. and Novello F.: Influence of pancreatic hormones on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. *Biochem J*, 94: 410-422, 1965.
162. **Ingelfinger** J.R., Zuo W.M., Fon E.A., Ellison K.E., Dzau V.J.: In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J Clin Invest*, 85: 417–423, 1990.
163. **Kobori** H, Harrison-Bernard LM and Navar LG.: Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 12:431–439, 2001.
164. **Richoux** J.P., Cordonnier J.L., Bouhnik J., Clauser E., Corvol P., Menard J. and Grignon G.: Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res*, 233:439–451, 1983.

165. **Yamamoto T.**, Nakagawa T., Suzuki H., Ohashi N., Fukasawa H., Fujigaki Y., Kato A., Nakamura Y., Suzuki F., and Hishida A.: Urinary Angiotensinogen as a Marker of Intrarenal Angiotensin II Activity Associated with Deterioration of Renal Function in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 18: 1558–1565, 2007.