



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM QUERCETINA SOBRE A NEFROPATIA
DIABÉTICA EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS**

ISABELE BESERRA SANTOS GOMES

VITÓRIA - ES

2010

ISABELE BESERRA SANTOS GOMES

**EFEITO DO TRATAMENTO COM QUERCETINA SOBRE A NEFROPATIA
DIABÉTICA EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

VITÓRIA

2010

ISABELE BESERRA SANTOS GOMES

**EFEITO DO TRATAMENTO COM QUERCETINA SOBRE A NEFROPATIA
DIABÉTICA EM CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fausto Edmundo Pereira
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro Externo

Profa. Dra. Maria Carmen Ferreira dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro Externo

Profa. Dra. Margareth Ribeiro Moyses
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro Interno

Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro Interno

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Vitória, 12 de novembro de 2010

A Deus, verdadeiro e onipotente, que, com sua luz me conduziu permitindo-me ultrapassar obstáculos e alcançar novas possibilidades de conhecimento.

A minha família, meus pais e minhas irmãs pelo intenso apoio e dedicação em todo meu percurso acadêmico.

Ao meu marido, pela compreensão, carinho e apoio em prol do meu aprimoramento profissional.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que me apoiaram na realização deste projeto, proporcionando-me condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho até sua conclusão. A todos meus agradecimentos, em especial:

A Deus, pela minha existência e por ter me dado forças para sempre avançar em busca dos meus objetivos.

Aos meus pais, Lauro e Iolanda, grandes incentivadores de minha carreira acadêmica, pelo amor incondicional e pelos grandes ensinamentos que carrego comigo em todos os momentos de minha vida.

As minhas irmãs Ianne e Ivanna, companheiras em todos os momentos, que apesar da atual distância, sei que torceram sempre para o meu êxito profissional.

Ao meu marido Flávio, pelo amor e companheirismo em todos os momentos, por sempre me incentivar a seguir em frente após as várias quedas no decorrer desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Elisardo Vasquez por aceitar-me como doutoranda e compartilhar comigo seu imenso conhecimento científico. Por ser um exemplo de pessoa comprometida com a ética e o avanço da pesquisa científica.

A Profa. Dra. Silvana Meyrelles por acolher-me no LTCC e pelos ensinamentos ao longo de minha trajetória acadêmica.

A Profa. Dra. Tânia Toledo por ceder-me a droga, quercetina, alvo desse estudo.

A Dra. Maria Carmen S. dos Santos pela ajuda na realização das análises histológicas do trabalho.

Aos amigos do LTCC, em especial a Ágata, Camille, Maíne, Lis, Thiago e Breno pelo apoio, pela amizade e também pelos momentos de descontração e discussão tão importantes ao longo desses últimos anos.

Ao Laboratório Bioclínico pela realização das dosagens bioquímicas.

A CAPES e ao PPSUS-FAPES pelo apoio financeiro a pesquisa.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta pesquisa, meu muito obrigada.

A verdadeira viagem de descoberta não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.

Proust

RESUMO

A dislipidemia tem um papel importante no aumento do risco de morbi-mortalidade em pacientes diabéticos por acelerar quadros de doenças macro e microvasculares. Estudos clínicos sugerem que a dislipidemia é um fator de destaque na progressão de doenças renais conseqüentes do diabetes. A quercetina tem sido descrita como um flavonóide com inúmeros efeitos benéficos a saúde, como proteção ao sistema cardiovascular e efeitos antiinflamatórios. Devido aos conhecidos efeitos deletérios do diabetes, o objetivo de nosso estudo foi avaliar o efeito da quercetina sobre a nefropatia diabética em camundongos C57BL/6 e apoE *knockout* (apoE^(-/-)) com diabetes experimental. Foram utilizados camundongos machos, com 8 semanas de idade, divididos nos grupos: controle, diabético veículo e diabético tratado com quercetina. A indução do diabetes foi feita com injeções de estreptozotocina 100mg/kg/day, i.p., diluída em tampão citrato, por 3 dias consecutivos, o grupo controle recebeu apenas o tampão citrato. Os animais tratados com estreptozotocina com glicemia inferior a 250mg/dL foram excluídos do estudo. Seis semanas após a indução do diabetes os animais foram divididos em dois grupos, o grupo veículo que recebeu óleo de soja e o grupo tratado que recebeu uma suspensão de quercetina (10 mg/kg), por via oral, diariamente, durante 4 semanas. Na décima semana os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado para as dosagens bioquímicas; a urina foi coletada para dosagem de creatinina e determinação de proteinúria e os rins foram fixados para a avaliação histológica. Todos os procedimentos foram submetidos a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da EMESCAM (013/2007). Os dados estão expressos em média \pm EPM e para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido de *post hoc* de Fisher, $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os animais diabéticos apresentaram um aumento significativo na glicemia, poliúria e proteinúria quando comparados aos grupos controles. O grupo diabético também mostrou indícios de disfunção renal, evidenciados pelo aumento na creatinina plasmática e urinária, uréia plasmática e proteinúria. Na avaliação histológica da nefropatia diabética foi observado um aumento da deposição de matriz extracelular no glomérulo e hipertrofia glomerular. O tratamento com quercetina levou a redução da glicemia em ambos os grupos diabéticos, bem como reduziu as taxas de triglicerídeos e creatinina plasmática. Houve uma melhora na função renal com um aumento no

clearance de creatinina e diminuição da proteinúria. Os resultados histológicos mostraram uma diminuição na deposição de matriz extracelular glomerular e uma redução na área do tufo glomerular nos grupos diabéticos. As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel fundamental na patofisiologia do processo de dano renal no diabetes, com isso a atividade antioxidante da quercetina auxilia na proteção dos rins aos danos oxidativos. O tratamento com quercetina demonstrou um efeito hipoglicemiante e um papel protetor renal contra os danos provocados pelo diabetes.

ABSTRACT

Dyslipidemia contributes to the increased risk of death and morbidity in patients with diabetes by accelerating macro and microvascular disease. Furthermore, clinical observations have suggested that hyperlipidemia is a contributory factor to the progression of diabetic renal disease. Quercetin has been reported to have many beneficial effects on human health, including cardiovascular protection and antiinflammatory effects. Considering the deleterious effects of diabetes the aim of this study was to evaluate the effect of quercetin on diabetic nephropathy in C57BL/6 and apoE deficient mice (apoE^(-/-)) with experimental diabetes. Male mice C57 and apoE^(-/-) 8-week-old were separated in groups: control, diabetic vehicle and diabetic treated with quercetin. Diabetes was induced by injection of streptozotocin (STZ, 100mg/kg/day, i.p.) diluted in citrate buffer, for 3 days, the vehicle group received only citrate buffer. The STZ-treated animals with glycemia lower than 250mg/dL were excluded from the study. Six weeks after diabetes induction, the animals were divided in vehicle and quercetin groups, which received vehicle (soy oil), or a suspension of quercetin (10 mg/kg, daily) orally during 4 weeks. In the 10th week mice were euthanized, blood was collected for biochemical dosage; urine was collected for dosage of creatinine and determination of proteinuria and the kidneys were fixed for histological analysis. All procedures were approved by the Animal Ethics Committee for Use of Animals of EMESCAM College of Health Sciences (013/2007). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using two way ANOVA followed by Fisher's *post hoc* test and $p < 0.05$ was considered significant. Diabetic mice showed significant increase in blood glucose, polyuria and proteinuria compared with control group. Diabetic groups also exhibited renal dysfunction, as evidenced by increased plasma creatinine, plasma urea and proteinuria. The histological evaluation of diabetic nephropathy was observed a increase in glomerular matrix deposition and glomerular hypertrophy. The treatment with quercetin decreased the plasma glucose level of both diabetic groups, as well as reduced high plasma concentrations of triglycerides and creatinine. The evaluation of renal function showed an improved creatinine clearance and a decreased proteinuria. In histological results was observed ameliorate in glomerular tuft size and a decrease of glomerular matrix deposition in diabetic groups. Reactive oxygen species play a key role in the pathophysiological processes of renal diseases. Thus, antioxidants, as

quercetin, are expected to decrease the vulnerability of the kidney to oxidative challenges. Quercetin demonstrated a beneficial antidiabetic effect and ameliorated diabetic renal damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Disfunção endotelial no diabetes e seu papel na aterogênese	30
Figura 2 -	Prevalência de doença renal terminal com principais diagnósticos primários nos Estados Unidos, segundo The United States Renal Data System	31
Figura 3 -	Fatores relevantes na indução de dano tissular pela hiperglicemia	34
Figura 4 -	Participação do estresse oxidativo e da dislipidemia na patogênese da glomeruloesclerose	37
Figura 5 -	Estrutura química básica dos flavonóides	40
Figura 6 -	Estrutura química da quercetina	42
Figura 7 -	Distribuição dos grupos experimentais	49
Figura 8 -	Representação esquemática do protocolo experimental do estudo	50
Figura 9 -	A: Animal alocado em gaiola metabólica durante a realização do experimento. B: Detalhe dos compartimentos da gaiola metabólica que permitem a separação de fezes e urina.	51
Figura 10 -	Ingesta de água dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo	58
Figura 11 -	Volume urinário de 24h dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo	59
Figura 12 -	Consumo de ração dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo	59
Figura 13 -	Glicemia de jejum dos grupos C57 e apoE diabéticos, antes e depois do tratamento com quercetina ou veículo	60
Figura 14 -	Medida de colesterol plasmático dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo	61
Figura 15 -	Medida de triglicérides plasmático dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo	62
Figura 16 -	Medida de creatinina plasmática dos grupos C57 e apoE,	63

- controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo
- Figura 17 - Medida de *clearance* de creatinina dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo 64
- Figura 18 - Medida de uréia plasmática dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo 64
- Figura 19 - Medida de ácido úrico plasmático dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo 65
- Figura 20 - Medida de proteína urinária dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo 66
- Figura 21 - Medida do peso dos rins dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo 67
- Figura 22 - Fotos típicas de glomérulos corados com Tricrômio de Masson (aumento 400x). Todas as figuras são representativas do grupo C57, onde na figura A temos um glomérulo do grupo controle, na B do grupo diabético veículo e C do grupo diabético tratado com quercetina. 68
- Figura 23 - Fotos típicas de glomérulos corados com Tricrômio de Masson (aumento 400X). Todas as figuras são representativas do grupo apoE, onde na figura A temos um glomérulo do grupo controle, na B do grupo diabético veículo e C do grupo diabético tratado com quercetina. 68
- Figura 24 - Medida da área do tufo glomerular dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. 69
- Figura 25 - Avaliação da glomeruloesclerose dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estágios da nefropatia diabética baseada na excreção urinária de albumina	32
Tabela 2 -	Estágios da doença renal crônica	33
Tabela 3 -	Medida de peso corporal (g) dos animais durante 10 semanas de protocolo experimental	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGEs – *Advanced Glycation End-products*

AGL – Ácido graxo livre

apoE^{-/-} – apolipoproteína E *knockout*

CAT – Catalase

CETP – Proteína Transferidora de Éster de Colesterol

C57 – camundongo C57BL/6

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GLUT-1 – Transportadores de glicose tipo 1

GLUT-2 – Transportador de glicose tipo 2

HDL – *High Density Lipoprotein*

ICAM-1 – *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

LDL – *Low Density Lipoprotein*

LDL-ox – LDL oxidado

LPL – Lipoproteína Lipase

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAM – Pressão arterial média

SOD – Superóxido Dismutase

SUS – Sistema Único de Saúde

STZ – Estreptozotocina

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TGF- β – *Transforming Growth Factor beta*

VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

VLDL – *Very Low Density Lipoprotein*

mg/dL – miligramas por decilitro

mg/kg – miligramas por quilogramas

mg/kg/dia - miligramas por quilogramas por dia

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	10
Lista de figuras.....	12
Lista de tabelas.....	14
Lista de abreviaturas e siglas.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Diabetes.....	19
1.2 Aterosclerose e diabetes.....	25
1.3 Nefropatia diabética.....	31
1.4 Flavonóides.....	40
1.4.1 Quercetina.....	42
1.5 Justificativa.....	44
2 OBJETIVOS.....	46
2.1 Objetivo geral.....	46
2.2 Objetivos específicos.....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Animais experimentais.....	48
3.2 Grupos experimentais.....	48
3.3 Tratamentos.....	49
3.4 Parâmetros metabólicos – Medida de peso corporal e avaliação da ingestão de água e ração, excreção de urina de 24 horas.....	50
3.5 Dosagem de glicemia.....	51
3.6 Parâmetros bioquímicos.....	51
3.7 Proteinúria.....	52
3.8 Medida de peso úmido dos rins.....	53
3.9 Análises histológicas.....	53
3.9.1 Preparação das amostras.....	53
3.9.2 Coloração pela hematoxilina e eosina.....	54
3.9.3 Coloração pelo Tricrômico de Masson.....	55
3.10 Análise estatística.....	55
4 RESULTADOS.....	56

4.1 Medida de peso corporal.....	57
4.2 Medida dos parâmetros metabólicos.....	58
4.3 Medida de glicemia.....	60
4.4 Parâmetros bioquímicos.....	61
4.5 Proteinúria.....	65
4.6 Medida de peso úmido dos rins.....	66
4.7 Análises histológicas.....	67
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	89
7 REFERÊNCIAS.....	91



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica não transmissível, caracterizada pelo comprometimento do metabolismo da glicose e de outras substâncias produtoras de energia, bem como pelo desenvolvimento tardio de complicações vasculares e neuropáticas. O diabetes compreende um grupo de mecanismos patogênicos distintos, cujo denominador comum é a hiperglicemia. Independentemente de sua etiologia, a doença está associada a um defeito hormonal comum, isto é, a resistência ou deficiência de insulina, que pode ser total ou parcial. A ausência dos efeitos da insulina desempenha um papel primário nos transtornos metabólicos associados ao diabetes, e por sua vez, a hiperglicemia desempenha um importante papel nas complicações relacionadas com a doença (SHERWIN, 2005).

O diabetes clínico é dividido em quatro subclasses gerais: (a) tipo 1; (b) tipo 2; (c) “outros” tipos específicos de diabetes associados a condições clínicas ou síndromes identificáveis e (d) diabetes gestacional. Destas, as mais freqüentes são o diabetes tipo 1 e tipo 2. No diabetes tipo 1, os pacientes têm pouca ou nenhuma capacidade de secreção de insulina, e, portanto, dependem de insulina exógena para impedir a ocorrência de descompensação metabólica e morte. Já no diabetes tipo 2, os pacientes conservam alguma capacidade de secreção endógena de insulina (SHERWIN, 2005).

O diabetes do tipo 2 é mais freqüente na população e seu diagnóstico geralmente é feito após os 40 anos de idade, em alguns casos até mais cedo. Um dos principais fatores desencadeantes da doença é a resistência à insulina que é a variabilidade na sensibilidade a insulina. A resistência à insulina tem causa multifatorial e está agrupada com uma variedade de fatores de risco para doenças cardiovasculares como, dislipidemia e hipertensão, os quais compõem distúrbios fisiológicos e metabólicos da síndrome metabólica (GRUNDY *et al.*, 2004; NIGRO *et al.*, 2006).

O diabetes *mellitus* é extremamente comum, afetando mais de 8% da população dos Estados Unidos entre 20 –74 anos de idade. Destes, o diabetes tipo 2 está

relacionado com mais de 90% dos casos. A incidência de diabetes tipo 2 é alarmante e continua aumentando ao redor do mundo. Espera-se um aumento nas taxas de prevalência de 165% até 2050, apenas nos Estados Unidos. Isso vem sendo impulsionado pelo sedentarismo e a obesidade (BOYLE *et al.*, 2001). Em 2007, apenas no Reino Unido, foi registrado mais de 2,2 milhões de pessoas diagnosticadas com diabetes e estima-se que existam ainda 750.000 pessoas sem diagnóstico. A incidência do diabetes do tipo 2 está atingindo a proporção de 100.000 novos casos a cada ano, o que daria aproximadamente uma pessoa a cada 5 minutos (D´SOUZA *et al.*, 2009).

A estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), sobre a prevalência de diabetes no Brasil, foi que em 2000 o país teria em torno de 4,6 milhões de diabéticos e que em 2030 esse número aumentaria para cerca de 11,3 milhões (WILD *et al.*, 2004). Este aumento é observado também na maioria dos países da América Latina e tem como determinantes diversos fatores, onde destacamos: aumento da expectativa de vida, de 67 para 72 anos, levando a um aumento na proporção de idosos, que representava 6% da população da América Latina em 2005; aumento na prevalência de diabetes tipo 2 na maioria dos países da região; alteração do padrão dietético-nutricional e de atividade física, impulsionado, em parte, pela migração da população das áreas rurais para os grandes centros urbanos, resultando em aumento do sedentarismo e obesidade (CUSUMANO; BEDAT, 2008).

A maioria dos países latino-americanos não possui um sistema de vigilância epidemiológica para as doenças crônicas na população adulta, em particular sobre o diabetes *mellitus*. As informações sobre a prevalência do diabetes derivam de inquéritos realizados esporadicamente e não em bases regulares. Poucos têm uma abrangência nacional, sendo a maioria envolvendo cidades ou regiões (SARTORELLI; FRANCO, 2003).

O diabetes e suas complicações causam uma perda substancial na qualidade de vida dos pacientes; sendo a quarta razão mais comum pela qual os pacientes procuram atendimento ambulatorial. Sendo responsável por cerca de 12% dos recursos destinados a saúde nos Estados Unidos, com custos anuais totais

ultrapassando 100 bilhões de dólares. No mundo inteiro, o diabetes afeta mais de 135 milhões de pessoas, e a previsão é de que este número alcance 300 milhões em 2025. Infelizmente, a taxa de crescimento do diabetes é maior nos países em desenvolvimento, onde existem barreiras que dificultam o estabelecimento do diagnóstico e o tratamento apropriado (MEIGS, 2002; SHERWIN, 2005).

As doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas o diabetes, respondem pelos maiores gastos com atenção médica no Sistema Único de Saúde (SUS), conforme Ministério da Saúde. As hospitalizações atribuídas ao diabetes *mellitus* representam 9% dos gastos com internações hospitalares do SUS (ROSA; SCHMIDT, 2008).

Pacientes com diabetes tipo 2, apesar dos avanços nas estratégias terapêuticas, são afetados, em média, duas a quatro vezes mais por complicações microvasculares, como nefropatia, e macrovasculares como as doenças cardiovasculares (doença arterial coronariana, doença vascular periférica e doença cerebrovascular) quando comparados a população não-diabética. Essas complicações são a maior causa de morbidade e mortalidade entre estes pacientes, sendo as doenças cardiovasculares implicadas em 80% dos casos de morte prematura associada ao diabetes (HAFFNER *et al.*, 1998; GORAYA *et al.*, 2002; D'SOUZA *et al.*, 2009).

A aterosclerose é o processo patofisiológico primário que leva a doença arterial coronariana e uma das maiores complicações do diabetes *mellitus*, sendo os vasos cardiovasculares e periféricos os mais afetados. Os diabéticos apresentam um maior grau de aterosclerose que os não-diabéticos e este fato vêm sendo confirmado por vários estudos angiográficos e de autópsia. Resultados de um estudo baseado em autópsias, realizado em 2002, demonstrou a ocorrência de aterosclerose coronariana em 49% das avaliações no grupo diabético frente a 33% do grupo não-diabético. O estudo também mostrou dilatação ventricular e alto grau de aterosclerose no grupo diabético com uma grande prevalência de aterosclerose subclínica sem histórico de doença arterial coronariana (GORAYA *et al.*, 2002).

Pacientes diabéticos frequentemente mostram sinais de aterosclerose avançada, com conseqüente síndrome coronariana aguda, isquemia miocárdica com doença

arterial periférica e derrame. Quando comparados à população no geral, os pacientes diabéticos apresentam 2 a 4 vezes mais risco de morrer por isquemia miocárdica ou derrame (PETER; EVANS, 2008).

Os distúrbios metabólicos que acompanham o diabetes levam a disfunção vascular e esta precede as mudanças histopatológicas e eventos clínicos detectáveis. Dentre as alterações relevantes temos hiperglicemia crônica, dislipidemia e resistência à insulina. Em conjunto, esses fatores levam ao aumento da susceptibilidade a aterosclerose (BECKMAN *et al.*, 2002; POORNIMA *et al.*, 2006).

Na fase inicial do diabetes a hiperglicemia intracelular promove modificações agudas no metabolismo intracelular como, ativação da via poli-ol, ativação da diacilglicerol-proteína quinase C e aumento do estresse oxidativo (DE VRIESE *et al.*, 2000). Este conjunto de fatores acarreta anomalias no fluxo sanguíneo e aumento a permeabilidade vascular, devido à diminuição da atividade dos vasodilatadores (como NO), aumento da atividade de vasoconstritores (como angiotensina II e endotelina 1) (BROWN, 2008).

A hiperglicemia prolongada induz a expressão de matrix extracelular e proteínas pró-coagulantes, aumenta a apoptose de células endoteliais e diminui a proliferação destas células, inibe a fibrinólise, promove mudanças estruturais e funcionais de macromoléculas pela formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs [do inglês, *Advanced Glycation End-products*]) e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a aumento de estresse oxidativo, resultando, por fim, em aumento da permeabilidade vascular e dano tecidual (MORENO; FUSTER, 2004; BROWN, 2008).

A hiperglicemia leva ao aumento na formação de AGEs que por sua vez leva a uma aceleração na formação de placa aterosclerótica. A glicação de proteínas e lipoproteínas pode interferir na fisiologia normal das mesmas, devido à modificação na conformação, alteração da atividade enzimática e defeito no reconhecimento de receptores. Um exemplo característico da alteração na fisiologia da proteína é a glicação da apolipoproteína B e do componente fosfolipídico do LDL-colesterol. A modificação leva a uma alteração funcional no *clearance* de LDL bem como ao

aumento na susceptibilidade a oxidação, passo crítico na aterogênese (ARONSON; RAYFIELD, 2002).

Os AGEs podem causar disfunção mecânica na parede dos vasos devido a ligação cruzada com macromoléculas. O acúmulo de AGEs promove o aumento da aderência das células sanguíneas a parede do vaso, além de alterar a função de diferentes células pela ligação a vários tipos de receptores que foram identificados em células como: macrófagos, células endoteliais, musculares lisas, renais e neuronais (BANSILAL *et al.*, 2007).

A resistência à insulina resulta num estado crônico e sistêmico de inflamação, o qual liga a patologia metabólica a vascular. Evidências demonstram que o aumento no nível de marcadores inflamatórios circulantes nos casos de resistência a insulina predizem o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e aterosclerose. A progressão da resistência à insulina para um caso de diabetes ocorre em paralelo à progressão da disfunção endotelial para a aterosclerose (HAFFNER, 2003).

Nos casos de resistência a insulina podemos ter o aumento na insulina circulante, o que leva a ativação dos receptores de insulina e ao recrutamento de células musculares lisas, células inflamatórias e células do sistema imune. As células musculares lisas expressam em sua superfície os transportadores de glicose-1 (GLUT-1). O estímulo contínuo do transportador de glicose por ação da insulina inicia eventos celulares pró-aterogênicos como proliferação e migração celular (BANSILAL *et al.*, 2007).

Dentre as células inflamatórias, destacamos a presença dos receptores de insulina nos monócitos circulantes e macrófagos. Nestas células, em condições de resistência a insulina, observamos algumas alterações relevantes como: a formação de células espumosas devido a defeitos na sinalização da insulina e perda do efeito protetor contra apoptose nos macrófagos. A apoptose dos macrófagos, nas lesões ateroscleróticas, pode contribuir para o recrutamento de monócitos, pela liberação de citocinas, levando ao agravamento das lesões vasculares (IIDA *et al.*, 2002).

A dislipidemia é um distúrbio metabólico relevante e freqüente em pacientes diabéticos. As alterações no perfil lipídico incluem: hipertrigliceridemia, diminuição nos níveis de HDL-colesterol e aumento nos níveis de LDL-colesterol (BROWN, 2008).

O aumento no efluxo de ácidos graxos livres (AGLs) do tecido adiposo e o prejuízo na retirada destes, mediada pela insulina, pelos músculos esqueléticos, leva ao acúmulo de AGLs na circulação. Em resposta, o fígado aumenta a produção de triglicerídeos e contribui para as altas taxas de VLDL-colesterol plasmática. A produção exacerbada de triglicerídeos leva a hipertrigliceridemia comum no diabetes (BECKMAN *et al.*, 2002; BROWN, 2008).

A elevação dos triglicerídeos ricos em lipoproteínas diminui os níveis de HDL-colesterol devido à troca de ésteres de colesterol do HDL para o VLDL via proteína transferidora de ésteres de colesterol. Defeitos funcionais no HDL, como o prejuízo na prevenção da oxidação do LDL em pacientes diabéticos frente aos não diabéticos, contribui nas alterações acarretadas pela dislipidemia (SNIDERMAN *et al.*, 2001).

Os pacientes diabéticos comumente apresentam níveis elevados de LDL-colesterol de baixa densidade. Essa modificação nas partículas de LDL resulta do aumento na secreção de VLDL e da transferência exacerbada de ésteres de colesterol entre VLDL e LDL. Esta modificação é dependente do aumento do VLDL o que geralmente ocorre quando os triglicerídeos plasmáticos ultrapassam 130 mg/dL. As partículas de LDL de baixa densidade são extremamente aterogênicas, sendo mais susceptíveis a oxidação, o que leva ao recrutamento de monócitos e células musculares lisas para a parede dos vasos sanguíneos (BECKMAN *et al.*, 2002).

Para melhor entendimento do diabetes e do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, vários modelos animais tem sido criados. Um modelo largamente utilizado de diabetes tipo 1 é o induzido por estreptozotocina (STZ). Este é de grande importância uma vez que o diabetes tipo 1 e tipo 2 compartilham muitas características fisiopatológicas, sendo semelhantes no quadro geral. Justificando desta forma o uso de tal modelo experimental.

A estreptozotocina (STZ) é uma nitrosurea derivada do *Streptomyces achromogenes* (um análogo da n-acetilglicosamina), comumente utilizado na produção de modelos de diabetes tipo 1 em roedores. A STZ é rapidamente transportada para as células pancreáticas pelo transportador de glicose-2 (GLUT-2) e promove toxicidade celular pela inibição da atividade da n-acetil-D-glucosaminidase, resultando em deficiência de insulina. Em altas doses ($\geq 200\text{mg/kg}$) a STZ induz quase que imediatamente hiperglicemia. Entretanto, estas altas doses promovem uma citotoxicidade não específica levando a lesão tubular aguda nos rins (REES; ALCOLADO, 2005; TESCH; NIKOLIC-PATERSON, 2006).

Os efeitos citotóxicos da STZ podem ser reduzidos a níveis mínimos pela indução do diabetes com múltiplas doses menores. Estudos com modelos de nefropatia diabética em camundongos relatam o uso de múltiplas doses de STZ (5 doses de 40-55mg/kg) ou (2-3 doses de 100-125mg/kg), administradas por via intraperitoneal em dias consecutivos, tendo como resultado de uma hiperglicemia sustentável após 2 semanas após a primeira injeção de STZ (TESCH; NIKOLIC-PATERSON, 2006).

O uso de STZ na indução de diabetes foi primeiramente descrito em 1963, desde então mais de 7600 publicações já foram realizadas com esse modelo, tornando-o, o segundo modelo animal de doença humana mais utilizado, atrás apenas do modelo de ratos espontaneamente hipertensos (WEI *et al.*, 2003).

1.2 Aterosclerose e diabetes

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte nos países desenvolvidos e rapidamente está se tornando o líder entre as mortes nos países em desenvolvimento. Anualmente, um milhão de pessoas nos Estados Unidos e 19 milhões ao redor do mundo sofrem um evento cardíaco (síndrome coronariana aguda ou infarto fulminante). Uma grande parte dessa população não apresentava nenhum sintoma clínico importante (NAGHAVI *et al.*, 2003).

Durante os últimos trinta anos observaram-se elevações relativamente rápidas e substanciais no número de pacientes com doenças cardiovasculares em países em

desenvolvimento, dentre os quais o Brasil. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde, esta tendência de elevação na doença cardiovascular deve persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade elevadas nestes países (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS SOBRE DISLIPIDEMIAS, 2007).

A aterosclerose representa a doença com maior índice de mortalidade. O infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral, a insuficiência vascular crônica e inúmeras outras patologias são, comprovadamente, decorrentes da aterosclerose, fato que evidencia o grau de importância desta doença no contexto médico atual (LUZ, 1993).

A aterosclerose envolve múltiplos processos em seu desenvolvimento, que incluem: disfunção endotelial, proliferação de células vasculares e alteração de matriz extracelular. A proliferação vascular contribui na patobiologia da aterosclerose e está ligada a outros processos como inflamação e apoptose (DZAU *et al.*, 2002).

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como, por exemplo, elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, VLDL) ou diabetes. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neo-epítomos, tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS SOBRE DISLIPIDEMIAS, 2007).

Múltiplas hipóteses propostas para explicar o desenvolvimento da aterosclerose têm sido integradas, e o termo “aterotrombose” é, atualmente, usado para descrever as hipóteses unificadas. Este processo envolve a camada íntima das artérias de grande e médio calibre, incluindo as artérias: carótida, aorta, renais, coronárias e artérias periféricas (BANSILAL *et al.*, 2007). Os componentes principais das placas aterotrombóticas são: (1) matriz extracelular como colágeno, proteoglicanos e

fibronectina elástica; (2) colesterol, ésteres de colesterol e fosfolípidos; (3) células, como macrófagos derivados de monócitos, linfócitos T e células musculares lisas; (4) material trombótico com plaquetas e deposição de fibrina (STRATMANN; TSCHOEPE, 2009).

O desenvolvimento de placas aterotrombóticas tem sido caracterizado em cinco fases correlacionadas entre si pelo tempo de desenvolvimento da lesão e com a associação a eventos clínicos. A fase inicial (fase 1) consiste no aparecimento de lesões pequenas na parede dos vasos, seguido da fase 2 com lesões, não necessariamente estenóticas, mas propensas ao rompimento devido ao grande conteúdo lipídico, aumento da inflamação e fina capa fibrótica. A fase 3 é caracterizada por complicações agudas originadas da ruptura de lesões levando a trombose não-oclusiva. Este processo é clinicamente silencioso, mas pode, ocasionalmente, levar a um quadro de angina. Na fase 4 há uma complicação aguda que pode levar a trombose oclusiva, com possível aparecimento do quadro clínico de síndrome coronariana aguda. Na fase 5 temos lesões calcificadas ou fibróticas que podem causar angina, entretanto, se precedida de estenose ou oclusão com isquemia associada, o miocárdio pode ser protegido por uma circulação colateral e estas lesões podem passar inaparentes clinicamente (FUSTER *et al.*, 2005).

O dano endotelial por constituir etapa fundamental no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e nos danos micro e macrovasculares do diabetes é objeto de estudo constante. O endotélio é a camada celular que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos, formando uma interface metabólica entre o sangue e o tecido subjacente, esta localização estratégica favorece a homeostase vascular. O endotélio atua modulando o tônus vascular e fluxo sanguíneo em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos, além de desempenhar papel fundamental na passagem de nutrientes, coagulação e a diapedese leucocitária. Nele são sintetizadas importantes substâncias bioativas como, óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas, endotelina e angiotensina II, que, em conjunto, regulam a função vascular (CINES *et al.*, 1998; BEHRENDT; GANZ, 2002).

Dentre as substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio, o NO apresenta um papel fundamental na homeostasia vascular. O NO é um potente vasodilatador e

modula grande parte da vasodilatação mediada pelo endotélio. Atua ainda na inibição da ativação plaquetária, limitação da inflamação, pela redução da adesão dos leucócitos ao endotélio e migração para a parede vascular e diminuição da proliferação e migração das células musculares lisas. Em conjunto essas propriedades inibem a aterogênese e protegem os vasos sanguíneos (BECKMAN *et al.*, 2002).

A disfunção endotelial pode ser definida como a perda total ou parcial do balanço entre: vasoconstritores (endotelina, angiotensina II) e vasodilatadores (NO, prostaciclina); fatores de crescimento e inibidores destes fatores; fatores pró-aterogênicos e anti-aterogênicos e fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Este conjunto de fatores está envolvido com o recrutamento de células inflamatórias para a parede vascular e o início da aterosclerose. As células endoteliais produzem citocinas, expressam moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1 [do inglês *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*]), molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1 [do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*]) e selectinas, além de auxiliar leucócitos e outras células sanguíneas na infiltração da parede do vaso na formação do ateroma (STRATMANN; TSCHOEPE, 2009).

A inflamação tem um papel importante na patogênese da aterosclerose, uma vez que esta quando localizada na parede do vaso mantém o quadro de disfunção endotelial. Este estado de inflamação sistêmica pode originar-se de diversas formas, entre elas, destacamos a resistência à insulina e diabetes (BEHRENDT; GANZ, 2002).

O diabetes promove um prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio mediada pelo NO. Alguns mecanismos fundamentais contribuem na diminuição da biodisponibilidade de NO no diabetes. A hiperglicemia inibe a produção de óxido nítrico pelo bloqueio da síntese da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumento na produção de EROs, especialmente ânion superóxido (O_2^-), nas células endoteliais e musculares lisas. Os ânions superóxidos agem diretamente no óxido nítrico produzindo peroxinitrito, o que promove o desacoplamento da eNOS pela oxidação de seu cofator, a tetrahydrobiopterina. O peroxinitrito pode levar também a

diminuição da síntese de prostanóides com propriedades vasodilatadoras e anti-trombóticas (DE VRIESE *et al.*, 2000).

A liberação excessiva de AGL pelo tecido adiposo decorrente da resistência a insulina, leva a ativação da proteína quinase C, inibe a fosfatidilinositol-3 quinase (um agonista da via da eNOS) e aumenta a produção de radicais livres, mecanismo que leva ao prejuízo na produção de NO ou diminuição de sua biodisponibilidade (BECKMAN *et al.*, 2002).

Os pacientes diabéticos além de apresentarem concentrações diminuídas de NO, também mostram aumento na produção de vasoconstritores, como a endotelina-1 e angiotensina II. Dentre os papéis desempenhados pela endotelina-1 destacamos: estímulo à proliferação, migração, contração de células musculares lisas; aumento da síntese de matriz extracelular e estímulo à expressão de fatores de crescimento pró-aterogênicos, como fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento transformador β (TGF- β [do inglês, *Transforming Growth Factor beta*]). A endotelina-1 atua ainda aumentando a retenção renal de sal e água e estimulando o sistema renina-angiotensina (IVEY *et al.*, 2008).

A angiotensina II é outro importante vasoconstritor, que também desempenha função fundamental da aterogênese. A angiotensina II exerce efeito inflamatório, promove crescimento/ remodelamento vascular, apoptose e fibrose. Grande parte destes efeitos é mediada pela geração de EROs. Estas moléculas atuam na oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, promovem danos celulares e aumento na vasoconstrição, em parte pela conversão de NO em peroxinitrito. Atuam ainda na ativação da transcrição de fatores como o TNF- α , proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1 [do inglês, *Monocyte Chemotactic Protein-1*]), IL-6 e proteína C reativa (COOPER *et al.*, 2007).

Como já mostrado vários são os fatores que levam a disfunção endotelial nos pacientes com diabetes, o aumento do dano ao endotélio, por sua vez, predispõe estes pacientes ao desenvolvimento de aterosclerose de maneira mais pronunciada, o que podemos observar de forma sucinta na Figura 1.

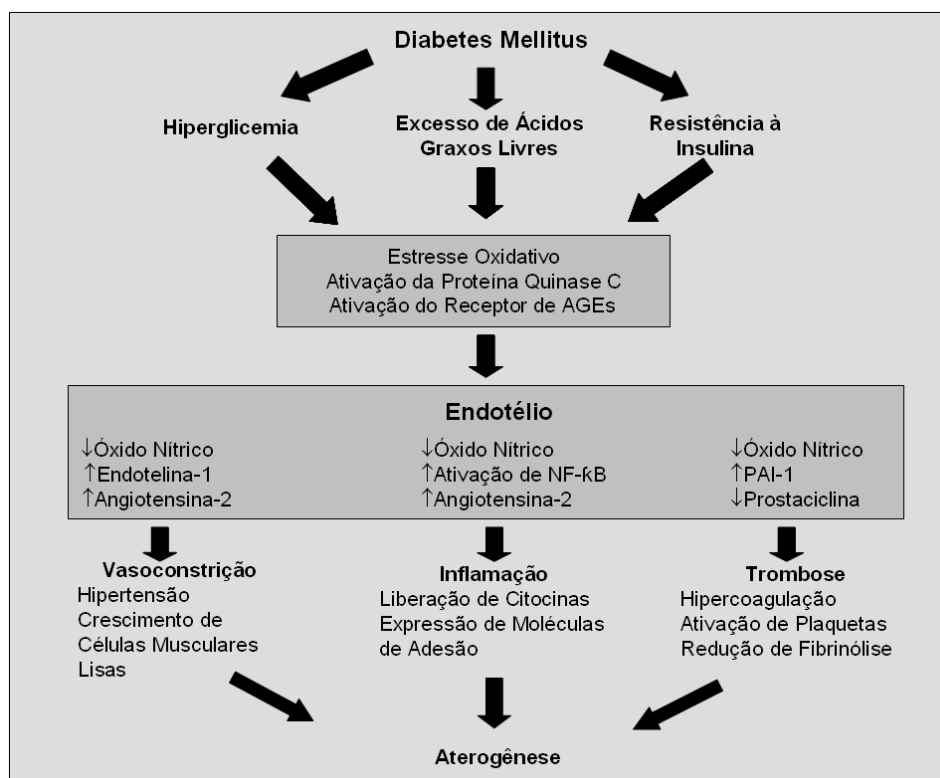


Figura 1: Disfunção endotelial no diabetes e seu papel na aterogênese, adaptado de Beckman *et al.*, JAMA, 287: 2570–2581, 2002.

Houve dificuldade na criação de um modelo animal de diabetes e aterosclerose que desenvolvesse placas ateroscleróticas com morfologia similar à humana. Nos últimos vinte anos, tem sido descritos estudos que vêm utilizando os camundongos apoE *knockout* (apoE^{-/-}), um dos modelos experimentais mais utilizados nos estudos da aterosclerose. A deficiência no gene apoE resulta no acúmulo de colesterol na circulação e na produção espontânea de placas ateroscleróticas, principalmente no arco aórtico, com morfologia semelhante a encontrada nas lesões humanas. O tratamento com a estreptozotocina, leva ao prejuízo na produção da insulina, por lesão das células β pancreáticas, e acelera a aterosclerose, levando a um modelo animal de diabetes e aterosclerose (CALKIN; ALLEN, 2006).

O modelo de aterosclerose associado ao diabetes foi, primeiramente, descrito por Park e cols. (1998), onde os autores observaram um aumento de 5,3 vezes na área de placa no arco aórtico dos animais diabéticos, quando comparados aos seus controles, após seis semanas do tratamento com estreptozotocina.

A indução de diabetes com STZ nos animais apoE^{-/-} mostrou três características principais: (1) a condição de diabetes é mantida pelo animal; (2) a presença do diabetes promove a aceleração da aterosclerose; (3) os efeitos não são refratários a intervenções terapêuticas. Desta forma, este se mostra um modelo de grande importância no estudo do diabetes associado à aterosclerose, fato bastante freqüente na clínica (WU; HUAN, 2007).

1.3 Nefropatia diabética

A doença vascular no diabetes é geralmente diferenciada em doença macrovascular, decorrente da lesão de vasos de médio e grande calibre, como isquemia coronária, por exemplo; e doença microvascular associada à retinopatia e nefropatia (NIGRO *et al.*, 2006).

A nefropatia diabética é a causa mais comum de doença renal terminal tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, como demonstra os dados americanos na Figura 2. Na América Latina, as doenças renais terminais tiveram uma taxa de crescimento de cerca de 6,8% anualmente, nos últimos anos. A taxa de incidência aumentou de 33,3 pacientes por milhão de pessoas (pmp) em 1993 para 167,8 pmp em 2005. Entre as causas deste aumento, destaca-se o diabetes tipo 2 (CUSUMANO; BEDAT, 2008).

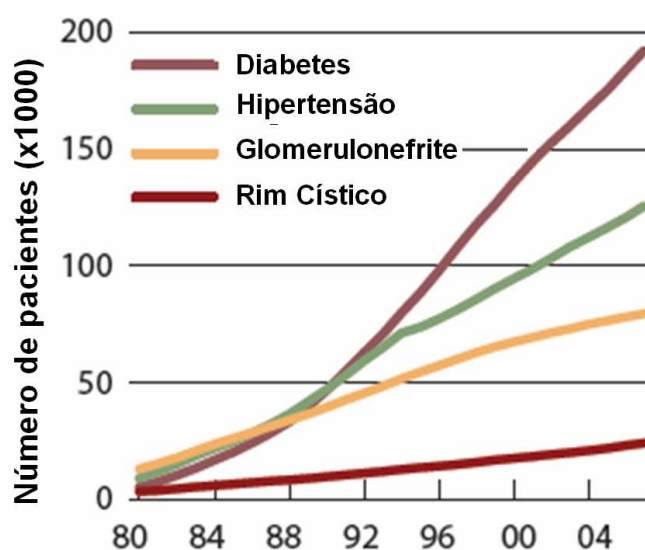


Figura 2: Prevalência de doença renal terminal com principais diagnósticos primários nos Estados Unidos segundo The United States Renal Data System (2006).

Entre 20 a 40% dos pacientes com diabetes desenvolvem nefropatia diabética, entretanto a razão pela qual nem todos os pacientes desenvolvem esta complicação não é esclarecida (DRONAVALLI *et al.*, 2008). Entre 1983 e 2005 houve um aumento de 7 vezes no número de novos pacientes em diálise no Japão devido ao diabetes, totalizando 40% na incidência de novos pacientes (YAMATA *et al.*, 2008). A soma prevista para custos médicos com diálise no mundo foi de US\$ 1,1 trilhões durante esta década, destes, uma soma de 30% será destinada ao tratamento de pacientes com nefropatia diabética (ATKINS; ZIMMET, 2010).

Os exames para diagnóstico da nefropatia diabética devem ser realizados logo que o diabetes do tipo 2 é diagnosticado, pois muitas vezes o indivíduo pode apresentar a doença a algum tempo de forma silenciosa. Para os pacientes com diabetes tipo 1 é recomendado que os exames se iniciem após cinco anos do diagnóstico inicial do diabetes, ou antes, caso a doença não seja bem controlada, ou se o paciente é adolescente. Em todos os casos, se a albuminúria estiver normal, os exames só precisam ser repetidos anualmente (ZELMANOVITZ *et al.*, 2009). Os valores para avaliação da albuminúria estão representados da Tabela 1.

Tabela 1: Estágios da nefropatia diabética baseada na excreção urinária de albumina

Estágio	Urina de 24hs (mg)	Amostra de urina aleatória	
		Concentração de albumina (mg/L)	Razão albumina/ creatinina (mg/g)
Normoalbuminúria	< 20	< 17	< 30
Microalbuminúria	20 – 199	17 – 173	30 – 299
Macroalbuminúria	≥ 200	≥ 174	≥ 300

Zelmanovitz *et al.*, 2009, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 1:10.

Apesar da medida da albuminúria ser essencial ao diagnóstico da nefropatia diabética, há alguns pacientes que apresentam diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) enquanto os valores da excreção de albumina urinária estão normais. Baseado nisto, o *National Kidney Foundation* usa como critério uma

classificação de estágios para doença renal crônica levando em conta a taxa de filtração glomerular. É recomendado que TFG seja realizada dentro dos exames para diagnóstico da nefropatia, a qual pode ser mensurada usando técnicas específicas como o *clearance* de inulina, mas na prática clínica ela é estimada pelo *clearance* de creatinina (ZELMANOVITZ *et al.*, 2009). A Tabela 2 mostra os estágios da doença renal crônica baseado na TGF.

Tabela 2: Estágios da doença renal crônica

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73m ²)
1	Dano renal* com TFG normal ou ↑	≥ 90
2	Dano renal* com TGF ligeiramente ↓	60 – 89
3	TGF moderadamente ↓	30 – 59
4	TGF severamente ↓	15 – 29
5	Falência renal	< 15 ou diálise

* Dano renal é qualquer alteração nos exames de sangue ou urina, exames de imagem
 TGF = Taxa de filtração glomerular
 Zelmanovitz *et al.*, 2009, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 1:10.

A nefropatia diabética está intimamente associada às doenças cardiovasculares. Um aumento na taxa de excreção de albumina e/ou uma diminuição na TFG são as manifestações iniciais de disfunção renal e preditivo da nefropatia, bem como de morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares (MOUGENSEN; POULSEN, 2004).

Há evidências crescentes da inter-relação entre fatores de risco cardiovasculares e o diabetes tipo 2, incluindo resistência a insulina, hipertensão e dislipidemia. Estes aumentam o risco de desenvolvimento e progressão de nefropatia diabética. A hiperglicemia é a causa inicial do dano tissular no diabetes, entretanto este processo pode ser auxiliado por determinantes genéticos de cada indivíduo ou por fatores de risco independentes como a hipertensão. O dano tissular afeta alguns tipos particulares de células como, células endoteliais na retina, células mesangiais no glomérulo renal e neurônios e células de Schwann nos nervos periféricos. Estas não conseguem reduzir o transporte de glicose para dentro da célula, resultando num

aumento da concentração de glicose intracelular levando aos danos tissulares (BROWNLEE, 2005).

A hiperglicemia prolongada leva a ativação de várias vias metabólicas intracelulares nas células endoteliais e musculares lisas levando ao aumento na produção de EROs pelas células endoteliais e de produtos finais de glicação. Este mecanismo leva ao aumento do estresse oxidativo e promove aumento da permeabilidade vascular e danos teciduais (BROWN, 2008). O papel da hiperglicemia nos danos tissulares que acompanham o diabetes pode ser esquematizado como mostrado na Figura 3.

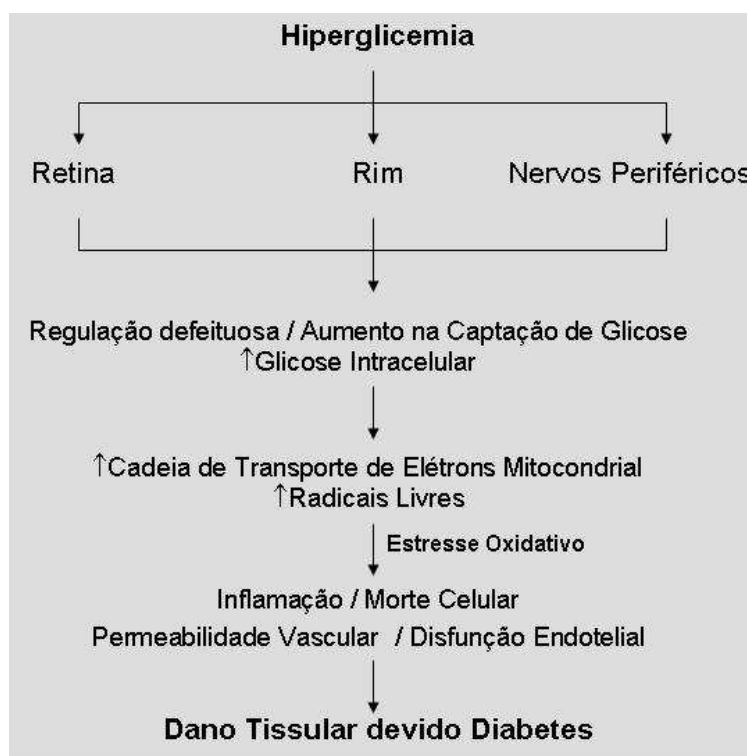


Figura 3: Fatores relevantes na indução de dano tissular pela hiperglicemia, adaptado de Brown, *Am J Cardiol*, 102(suppl): 10L–13L, 2008.

A hiperglicemia estimula as células renais a produzirem mediadores humorais, citocinas e fatores de crescimento, os quais são responsáveis por alterações estruturais como deposição de matriz extracelular e alterações funcionais como aumento da permeabilidade da membrana basal glomerular e estresse de

cisalhamento (*shear stress*). Estas alterações contribuem no desenvolvimento da nefropatia diabética (SCHENA; GESUALDO, 2005).

Dentre os fatores de crescimento de importância no desenvolvimento da nefropatia diabética destaca-se o fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). O TGF- $\beta 1$ é uma citocina, multifuncional, que regula a proliferação e metabolismo das proteínas que compõem a matriz extracelular em vários tipos celulares, incluindo as células mesangiais. Foi observado que em condições de alta concentração de glicose há um aumento na produção do TGF- $\beta 1$ pelas células mesangiais em cultura, levando ao aumento na expressão de matriz extracelular. Este fator de crescimento também modula a expressão do transportador GLUT-1 que medeia a entrada excessiva de glicose em condições de hiperglicemia, levando a danos nas células mesangiais (INOKI *et al.*, 1999). A liberação do TGF- $\beta 1$ pode ser estimulada ainda pelos produtos finais de glicação e por substâncias vasoativas como angiotensina II e endotelina (COOPER, 1998).

A nefropatia diabética apresenta várias fases de desenvolvimento e múltiplos mecanismos envolvidos na doença. As mudanças funcionais ocorrem no néfron, especialmente no glomérulo onde observamos hiperfiltração e hiperperfusão glomerular, antes do aparecimento de qualquer manifestação clínica. Em seqüência temos hipertrofia glomerular e desenvolvimento de microalbuminúria, seguido do espessamento da membrana basal glomerular, expansão mesangial e proteinúria, levando a glomerulosclerose e falência renal (DRONAVALLI *et al.*, 2008).

Múltiplos mecanismos contribuem no desenvolvimento da nefropatia diabética, como principal, temos a hiperglicemia induzindo mudanças metabólicas e hemodinâmicas. Os fatores hemodinâmicos implicados na patogênese da nefropatia diabética incluem o aumento da pressão sistêmica e intraglomerular e ativação de hormônios vasoativos como angiotensina II e endotelina. Vários mecanismos bioquímicos podem interagir com a via metabólica como ativação dos receptores dos produtos finais de glicação, ativação da proteína quinase C e aumento na expressão de TGF- $\beta 1$ (ICHINOSE *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo apresenta-se como parte central nos mecanismos que levam a nefropatia. O dano oxidativo pode alterar a função e estrutura do glomérulo, graças aos efeitos das espécies reativas de oxigênio das células endoteliais e mesangiais. O glomérulo é considerado mais sensível a danos oxidativos que outras partes do néfron (RODRIGO; RIVERA, 2002).

A produção de EROs está aumentada em pacientes com diabetes e nefropatia diabética. Isto é confirmado pelo encontro de níveis elevados de 8-hidroxi-2'-deossiguanosina, um produto gerado pelo dano ao DNA e de aumento na oxidação do LDL (LDL-ox), os quais são considerados marcadores do aumento nas espécies de oxigênio. A geração de EROs é uma consequência direta da hiperglicemia e tem mostrado um papel fundamental na manutenção das complicações crônicas no diabetes. O aumento na produção de EROs tem sido demonstrado tanto em modelos animais de diabetes quanto em humanos com nefropatia diabética (HAKIM; PLUEGER, 2010).

O estresse oxidativo está envolvido nas lesões glomerulares inflamatórias causadas por uma série de mediadores como citocinas e quimiocinas, que levam à ativação de leucócitos e produção de EROs, aumentando a injúria glomerular. Estas moléculas causam inflamação em resposta à infiltração leucocitária. Portanto estas moléculas são produzidas pelas células renais como células mesangiais e endoteliais no glomérulo, células epiteliais do túbulo proximal e fibroblastos (RODRIGO; RIVERA, 2002).

A dislipidemia também vem mostrando um papel fundamental na progressão do dano renal no diabetes. A dislipidemia é caracterizada pelo aumento nos triglicerídeos e no LDL-colesterol e diminuição nos níveis de HDL-colesterol. Nos pacientes com doença renal crônica as partículas de LDL e HDL sofrem modificação por oxidação, resultando na formação de lipoproteínas de baixo peso e aumento na produção de LDL-ox (CASES; COLL, 2005).

A glomerulopatia por acúmulo de lipoproteína tem mostrado uma rápida progressão a dano renal e desenvolvimento de glomeruloesclerose. Tanto a LDL quanto a LDL-ox estão envolvidas no dano glomerular mediado pelo estresse oxidativo. A oxidação do LDL pelas células mesangiais pode ocorrer levando à ativação da apoptose de

celúlas endoteliais e mesangiais, o que pôde ser prevenido *in vitro* pelo uso de antioxidantes. O LDL ainda estimula a secreção de fibronectina pelas células mesangiais, e o LDL-ox estimula a expressão de fibronectina via secreção autócrina do TGF- β 1 em cultura de células epiteliais glomerulares (RODRIGO; RIVERA, 2002). O papel do estresse oxidativo e da dislipidemia na patogênese da glomeruloesclerose associada a doenças renal está demonstrado na Figura 4.

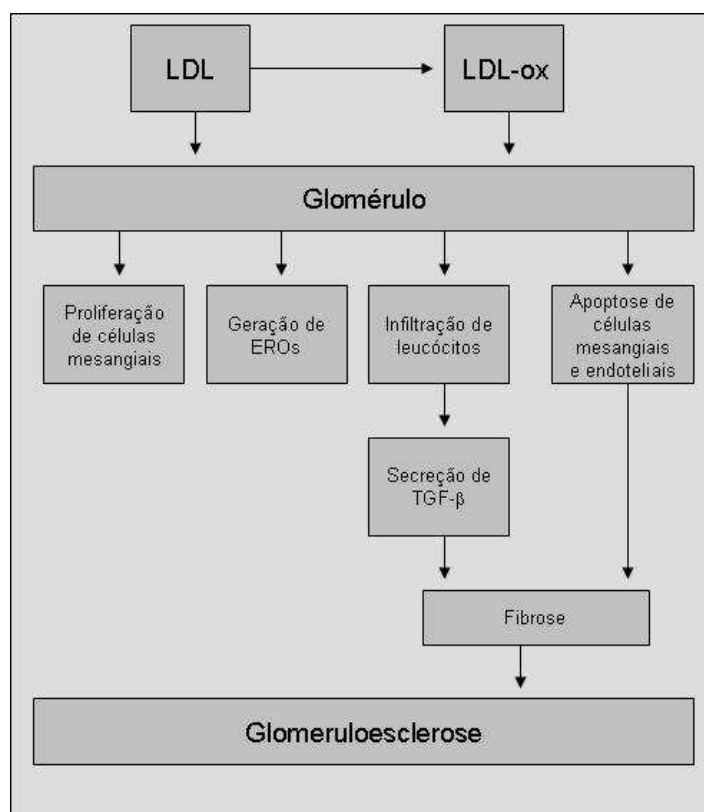


Figura 4: Participação do estresse oxidativo e da dislipidemia na patogênese da glomeruloesclerose, adaptado de Rodrigo e Rivera, *Free Radic Biol Med*, 33(3): 409–422, 2002.

Apesar dos avanços nos tratamentos da hiperglicemia e hipertensão, muitos pacientes diabéticos continuam a desenvolver doença renal. Conseqüentemente torna-se primordial o entendimento dos mecanismos patogênicos e possíveis estratégias terapêuticas para lidar com a nefropatia diabética. E para isso é necessário modelos experimentais que mimetizem o processo da doença em humanos (BREYER, *et al.*, 2005a).

A nefropatia em humanos geralmente é uma complicação tardia do diabetes, ocorrendo em pacientes susceptíveis depois de 10-20 anos de diabetes. Com isso, os modelos animais precisam desenvolver o quadro de hiperglicemia sustentada por períodos prolongados 2-8 meses, a fim de detectar danos renais importantes, como lesões glomerulares e tubulointersticiais (TESCH; NIKOLIC-PATERSON, 2006).

O camundongo apoE^(-/-), devido aos seus alto níveis de colesterol circulantes e susceptibilidade a aterosclerose, aumenta a gravidade da nefropatia diabética, quando comparado ao C57, sendo preferencialmente usado para o estudo de intervenções terapêuticas em camundongo com diabetes induzida por STZ (LASSILA *et al.*, 2005).

Como o diabetes aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como aterosclerose, agravando a injúria tanto micro quanto macrovascular e sendo a nefropatia diabética uma grave complicação microvascular do diabetes agravada pela aterosclerose, faz-se necessário a ênfase em estudos focando a associação entre as duas patologias e possíveis alternativas para o tratamento de suas complicações.

Atualmente, o tratamento das patologias é feito de maneira independente. Existem várias classes de drogas disponíveis para o tratamento do diabetes, que seguem um algoritmo de acordo com a gravidade e a história clínica dos pacientes. As drogas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em: (1) hipoglicemiantes orais propriamente ditos ou secretagogos que incluem as sulfoniluréias, nateglinida e repaglinida; (2) sensibilizadores de insulina, como metformina e tiazolidinedionas (TZD); (3) anti-hiperglicêmicos (inibem a absorção de carboidratos) como acarbose e (4) a insulina, indicada para pacientes com diabetes 1 e 2 sem controle adequado com dieta e/ou antidiabético oral (RAMALHO; LIMA, 2006).

A escolha terapêutica é priorizada de acordo com a eficácia, segurança, simplicidade, aderência do paciente ao tratamento e custo. Contudo, minimizando o risco e a severidade de quadros de hipoglicemia, bem como de ganho de peso exacerbado. O algoritmo de tratamento recomendado pela *American Association of Clinical Endocrinologists* (AAACE) e o *American College of Endocrinology* (ACE) inicia

pelo tratamento oral com combinações de medicamentos com mecanismos de ação complementares, pois a monoterapia nem sempre alcança os limites aceitáveis de glicemia (BLONDE, 2010).

Já para tratar a aterosclerose, as principais alternativas terapêuticas com objetivo de normalização do perfil lipídico são as estatinas e o fibrato. As estatinas são uma classe medicamentosa de inibidores da enzima HMG-CoA redutase, a qual limita a produção hepática de colesterol. As estatinas mais utilizadas incluem a atorvastatina, sinvastatina, fluvastatina e rosuvastatina. Além de seus efeitos sobre o perfil lipídico, este grupo de drogas apresenta efeitos pleiotrópicos de grande importância no tratamento da aterosclerose, como a melhora na função endotelial devido ao aumento na expressão da eNOS e a redução na quimiotaxia de monócitos e a interação entre neutrófilos endotélio (CALKIN; ALLEN, 2006).

Os fibratos, onde destacamos o gemfibrozil e o fenofibrato, constituem uma outra opção terapêutica no controle da dislipidemia que acompanha a aterosclerose. Os fibratos atuam como agonistas do PPAR α , um receptor nuclear presente em tecidos metabólicos como coração, fígado e músculo esquelético; atuam aumentando a transcrição da apoA1 e apoA2, resultando em aumento do HDL colesterol; e ainda regulam os níveis de triglicerídeos devido ao aumento na lipoproteína lípase, enzima responsável pela hidrólise dos triglicerídeos, e pela redução da apoC, a qual inibe a quebra dos triglicerídeo pela lipoproteína lípase (CALKIN; ALLEN, 2006).

Desta forma, temos disponíveis para o tratamento do diabetes associado a aterosclerose uma gama de medicamentos que precisam ser combinados, para se obter um resultado satisfatório. A politerapia resulta em aumento de custos, de estresse para o paciente e falha na aderência ao tratamento. Fazendo-se necessário a pesquisa de novas substâncias que possam atuar satisfatoriamente em ambas as patologias.

1.4 Flavonóides

Os flavonóides compreendem um grupo de substâncias que existem naturalmente na forma de compostos polifenólicos e encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal. Esses compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre diversos sistemas biológicos (AJAY *et al.*, 2003).

Estes compostos foram descobertos pelo ganhador do prêmio Nobel Szent-György, que em 1930 isolou da casca do limão uma substância, a citrina, que regulava a permeabilidade dos capilares. Os flavonóides denominaram-se no princípio de vitamina P (devido à permeabilidade) e também de vitamina C2 (porque se comprovou que alguns flavonóides tinham propriedades semelhantes à vitamina C). Como se mostrou que os flavonóides não eram vitaminas, essas denominações foram abandonadas em 1950 (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Do ponto de vista químico, os flavonóides constituem substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono (C_{15}) no seu esqueleto básico. Este grupo de compostos polifenólicos apresenta estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C), formando um sistema $C_6-C_3-C_6$. Atualmente, já foram identificadas mais de 8000 substâncias pertencentes a este grupo (ARAÚJO *et al.*, 2005).

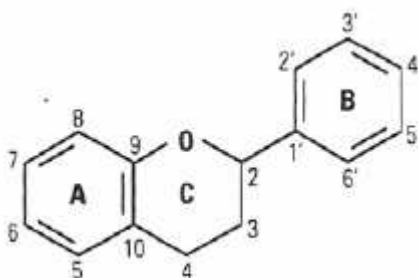


Figura 5: Estrutura química básica dos flavonóides. Fonte: Araújo *et al.*, 2005, Rev Bras Hipertens, 12(3): 188-189.

Os flavonóides possuem em sua estrutura química um número variável de grupos hidroxila fenólicos, e associação com o ferro e outros metais de transição com poderes quelantes, confere aos mesmos uma grande capacidade anti-oxidante. Por

isso, desempenham um papel essencial na proteção frente aos danos oxidativos, tendo efeito terapêutico em um elevado número de patologias incluindo a cardiopatia isquêmica, a aterosclerose e o câncer (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Os flavonóides diferem um dos outros pela orientação dos substituintes (hidroxil, metil, etc.), pelo grau de insaturação, pelo tipo de açúcar acoplado a molécula e pela posição da substituição no anel benzóico. Eles são conhecidos pelos seus vários efeitos biológicos, onde destacamos a inibição da agregação plaquetária, ação anti-oxidante, prevenção da proliferação celular, redução dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade no plasma e modulação do tônus vascular (AJAY *et al.*, 2003).

Os flavonóides, parte integral da dieta humana, possuem efeitos cardioprotetores, com capacidade de diminuir as taxas de obstrução isquêmica. Esses efeitos são mediados, em parte, pela sua ação anti-oxidante e vasodilatadora. A função do endotélio vascular é considerada como um marcador de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão. Estudos demonstram que dietas ricas em flavonóides têm um efeito protetor sobre a função endotelial em humanos (MACHHA; MUSTAFA, 2005).

Os polifenóis ainda podem retardar a progressão de lesões ateroscleróticas iniciais, impedindo que estas cheguem ao estágio avançado. Para confirmar esta hipótese, têm sido descrito que compostos polifenólicos do vinho tinto e do chá verde são capazes de prevenir a progressão da aterosclerose em modelos animais, contudo, o vinho tinto não é capaz de reduzir as placas ateroscleróticas depois de instaladas no camundongo apoE *knockout* (LUZ *et al.*, 1999; MIURA *et al.*, 2001; VINSON *et al.*, 2001).

Os polifenóis podem atuar ainda na prevenção de trombose, resultado da inibição da ativação plaquetária ou da diminuição da expressão de moléculas pró-trombóticas e pro-ateroscleróticas, como fatores teciduais (STOCLET *et al.*, 2004).

1.4.1 Quercetina

A quercetina é um dos flavonóides mais abundantes na natureza e forma a estrutura principal de vários outros flavonóides como a rutina, hesperidina e narigenina. A quercetina é encontrada em uma variedade de alimentos como cebola, uvas, maçãs, brócolis, frutas cítricas entre outros e possui uma gama de efeitos biológicos. Nos últimos anos, com o aumento de estudos sobre a farmacocinética e mecanismos moleculares de ação da quercetina, esta vem demonstrando grande potencial na prevenção e terapia de diversas doenças crônicas (BISCHOFF, 2008).

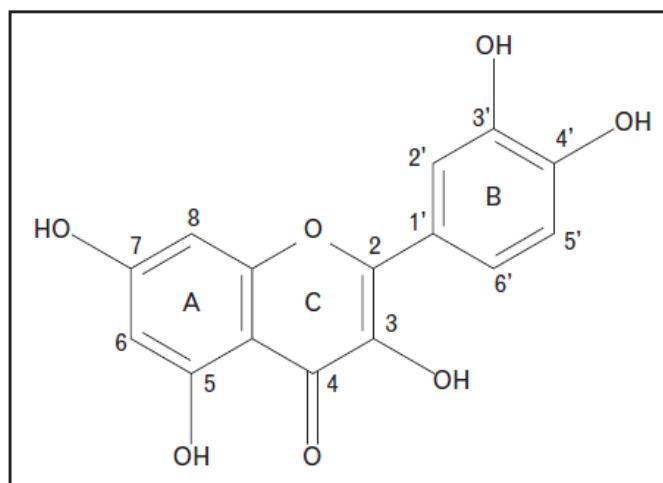


Figura 6: Estrutura química da quercetina. Fonte: Bischoff, 2008, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:733–740.

O consumo diário de flavonóides na dieta ocidental fica em torno de 23mg, destes 60 a 75% são de quercetina. Estudos epidemiológicos com mais de 100.000 pacientes têm mostrado uma associação inversa entre o consumo diário de flavonóides e a mortalidade por doenças cardíacas coronarianas e/ou risco de derrame (LOPÉZ-LOPÉZ *et al*, 2004).

A quercetina é absorvida no intestino delgado e metabolizada em diversos órgãos como intestino delgado, cólon, fígado e rins. Os metabólitos formados no intestino delgado e fígado são resultados do metabolismo de fase II pela biotransformação enzimática e formação de derivados metilados e sulfatados. Normalmente, a concentração plasmática de quercetina em humanos é da ordem de nanomolar, mas

após o suplemento com quercetina a concentração passa para o nível de micromolar. Segundo estudo de De Boer e cols. (2005), sobre a distribuição tissular, após a suplementação de quercetina, em ratos e porcos, há o acúmulo de quercetina e seus metabólitos, principalmente, nos pulmões (para os ratos) e no fígado e rins (nos porcos), os pulmões dos porcos não foram analisados no estudo (BOOTS *et al.*, 2008).

Na literatura temos relatos de vários efeitos biológicos da quercetina como: atividade carcinostática e antiviral, supressão da proliferação celular, modificação na síntese de eicosanóides, prevenção da agregação plaquetária, promoção do relaxamento de células musculares lisas, efeito antioxidante, na diminuição da pressão arterial e na melhora de doenças relacionadas à hiperglicemia. Devido a essas propriedades farmacológicas, vem sendo postulado que o flavonóide possa se tornar um agente terapêutico no tratamento de doenças como câncer, infecção viral, inflamação e aterosclerose (ISHIKAWA; KITAMURA, 2000).

Dentre suas atividades biológicas destacamos a propriedade antioxidante que representa um efeito benéfico de proteção cardiovascular. A quercetina atua diretamente capturando radicais livres, inibindo a xantina oxidase e a peroxidação lipídica, além de alterar as vias antioxidantes endógenas *in vivo* e *in vitro*. Essas ações justificam o resultado encontrado de efeitos protetores sobre os danos oxidativos em diferentes tecidos de ratos diabéticos (ANJANEYULU; CHOPRA, 2004). A atividade antioxidante da quercetina promove ainda vasodilatação em preparações de vaso isolado, diminuição da glicose em animais diabéticos e efeito protetor endotelial em animais hipertensos (AJAY *et al.*, 2006).

A quercetina desempenha um papel relevante na proteção dos vasos sanguíneos uma vez que promove a redução nos níveis de LDL oxidado, reduzindo o risco de doença cardíaca e aterosclerose. O flavonóide atua reagindo com o ânion superóxido, radicais hidroxil e radicais provenientes de peroxidação lipídica, impedindo assim a formação do LDL-ox (BISCHOFF, 2008).

O nível de antioxidantes circulantes determina a susceptibilidade ao dano oxidativo, e este, geralmente, encontra-se alterado em resposta ao estresse oxidativo.

Atualmente, há o interesse no papel e uso de antioxidantes naturais na prevenção de danos tissulares provocados pelo diabetes, devido ao aumento do estresse oxidativo. Antioxidantes como vitamina C e E, a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase têm mostrado atividade protetora frente a peroxidação lipídica de células, passo inicial no processo patológico. A redução nas enzimas antioxidantes como resultado do aumento da produção de radicais livres tem sido demonstrado no diabetes experimental por vários autores (COSKUN *et al.*, 2005).

A abundância de ácidos graxos polinsaturados nos rins os tornam órgãos particularmente vulneráveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio. O envolvimento dos radicais livres nos danos renais produzidos pelo diabetes, por exemplo, é confirmado por duas linhas de evidência experimentais: (I) detecção de produtos de dano oxidativo no tecido renal ou urina e (II) demonstração experimental do efeito protetor de inibidores metabólicos das espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo favorece uma gama de danos renais de falência renal aguda, rabdomiólise, nefropatia obstrutiva, dano glomerular a falência renal crônica e hemodiálise. Contudo, intervenções que favoreçam a captura ou depuração das EROs (antioxidantes da dieta ou farmacológicos), podem atenuar ou prevenir o aumento do estresse oxidativo e, subsequentemente, diminuir o dano renal (RODRIGO; RIVERA, 2002).

1.5 Justificativa

Segundo o Ministério da Saúde em 2003, 69% dos óbitos bem definidos no Brasil foram causados pelos seguintes grupos de doenças: doenças cardiovasculares (32%), neoplasias (15%), doenças respiratórias (11%), doenças endócrinas/metabólicas (6%) e doenças digestivas (5%). Ressalta-se, também, que o Brasil tem a maior taxa de mortalidade por doença cerebrovascular entre os países americanos e que o impacto da mortalidade por doenças cardiovasculares atinge estratos populacionais mais jovens (em idade laboral) de modo mais intenso do que em países como os Estados Unidos, Canadá, Japão e os da Europa ocidental (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

As doenças crônicas não-transmissíveis respondem pelos maiores gastos com atenção médica no Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2005, dos seis bilhões gastos com o pagamento de Autorizações de Internação Hospitalar (exceto partos), as doenças crônicas representaram 58% do gasto total, liderado pelos gastos das doenças cardiovasculares (22%). Além disso, essas doenças crônicas pioram a qualidade de vida e comprimem o orçamento das populações mais pobres e mais acometidas por estas doenças e suas complicações mais freqüentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Devido a grande importância das doenças cardiovasculares como causa de morbimortalidade em todo o mundo, a procura de novos agentes terapêuticos torna-se uma necessidade. Um dos grandes alvos da indústria farmacêutica é a busca de uma única substância (possível medicamento) que possa reduzir os níveis de glicose, os lipídeos plasmáticos (colesterol e triglicérides), a área da placa aterosclerótica e ainda restaurar as disfunções fisiológicas (aumento do nível de radicais livres, processo inflamatório e da disfunção vascular entre outras) que acompanham o processo aterosclerótico e o diabetes, uma vez que as doenças estão intimamente associadas.

O tratamento com essa substância poderia reduzir o estresse que o paciente sofre ao ter que ingerir vários medicamentos ao dia e controlaria as várias disfunções que acompanham as patologias, além disso, o custo do tratamento poderia ser minimizado.

Estudos relatam que os flavonóides possuem efeitos antiinflamatórios, hipolipidêmicos, antioxidante, hipoglicêmicos entre outros. Por isso a proposta desse estudo foi verificar o efeito da quercetina, um flavonóide de ocorrência natural em vegetais e frutas, na aterosclerose e no diabetes. Não há registros na literatura de estudos com o flavonóide em nosso modelo experimental de aterosclerose associado ao diabetes. Os resultados desse trabalho visam contribuir na busca de novos fármacos para a aterosclerose e diabetes, duas patologias de grande importância nos casos de síndrome metabólica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do tratamento com quercetina no diabetes induzido por estreptozotocina em camundongos C57 e apoE^(-/-).

2.2 Objetivos específicos

Nos grupos experimentais de camundongos diabéticos (C57+STZ) e diabéticos ateroscleróticos (apoE^(-/-) + STZ):

- Avaliar o efeito do tratamento com quercetina sobre os parâmetros ponderais e metabólicos;
- Avaliar o efeito da quercetina sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, creatinina e uréia;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre a função renal dos camundongos diabéticos;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre a evolução da glomerulosclerose renal.



**MATERIAIS E
MÉTODOS**



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos, com oito semanas de idade, da linhagem C57BL/6 e camundongos transgênicos apoE *knockout*, os quais nascem hipercolesterolêmicos e desenvolvem aterosclerose espontaneamente. Os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, pertencente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da UFES, com garantia de serem animais isogênicos, ou seja, serão filhos de casais irmãos e, portanto, com o mínimo de variabilidade genética.

Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente controlado com ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade (70%). A utilização e o manuseio experimental dos animais estão de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBIO).

Os protocolos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia (EMESCAM) (Protocolo número 013/2007).

3.2 Grupos experimentais

Utilizou-se camundongos machos C57BL/6 e apoE^(-/-), 8 semanas de idade, divididos nos grupos controle, diabético veículo (óleo de soja), diabético tratado com quercetina, VO. A disposição dos grupos experimentais encontra-se demonstrada na Figura 7.

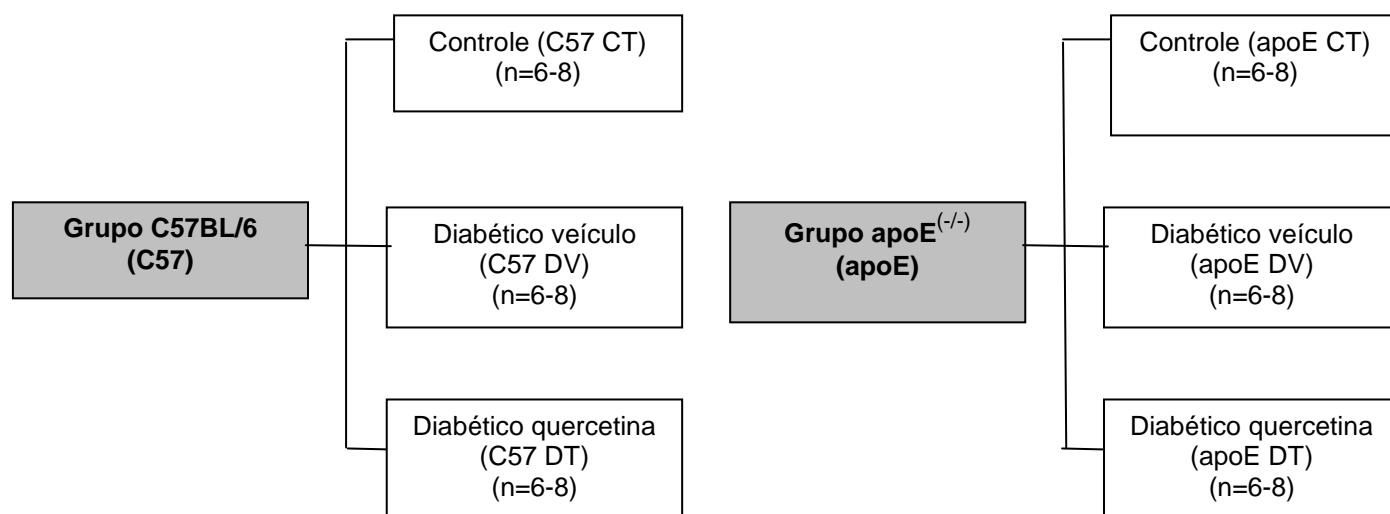


Figura 7: Distribuição dos grupos experimentais

A indução do diabetes foi realizada por meio de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma) 100mg/kg/dia, durante 3 dias consecutivos, utilizando-se como veículo tampão de citrato 0,01M, pH 4,5 (MORIKAWA *et al.*, 2005). Os animais do grupo controle não tiveram nenhum tipo de tratamento. Uma semana após a indução do diabetes, os animais foram submetidos a um jejum de 6 horas para dosagem de glicemia, os animais com glicemia inferior a 200 mg/dL foram excluídos do grupo diabético (XU *et al.*, 2006).

3.3 Tratamentos

Após 6 semanas da indução do diabetes iniciou-se o tratamento dos animais com quercetina (Sigma) ou veículo (óleo de soja). Os grupos tratados receberam, por gavagem, a quercetina na dose de 10mg/kg/dia dissolvida em óleo de soja, perfazendo um volume total de 100µL ou apenas o óleo de soja. A dose utilizada de quercetina teve como base dados da literatura como o estudo de Vesal e cols. (2003), Anjaneyulu e Chopra (2004), Galisteo e cols. (2004), e o de Rivera e cols. (2008). Após quatro semanas do início do tratamento diário, a urina de 24h foi coletada por meio de gaiola metabólica, o sangue foi retirado pelo plexo retro-orbital

para avaliação de parâmetros bioquímicos e os animais foram sacrificados e perfundidos com solução fixadora para a retirada os rins para análise histológica.

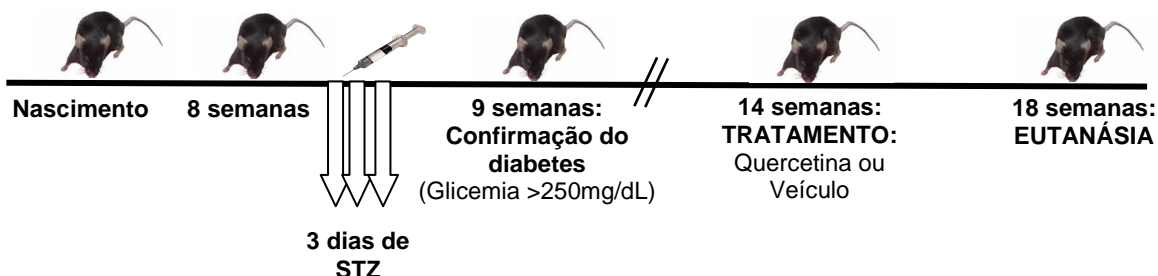


Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental do estudo

3.4 Parâmetros ponderais e metabólicos – Medida de peso corporal e avaliação da ingestão de água e ração, excreção de urina de 24 horas

A medida do peso corporal foi realizada uma vez por semana para todos os grupos experimentais a partir do início do protocolo experimental na 8ª semana de idade dos animais, considerada semana 1, até a 18ª semana quando os mesmos foram sacrificados, considerado semana 11.

Foram avaliados os seguintes parâmetros metabólicos para cada grupo: ingestão de água e ração e volume urinário de 24 horas. Para tanto, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais para camundongo (modelo 3600M021, Tecniplast®, Itália) (Figura 9) por um período de 48 horas, a etapa inicial de adaptação de 24 horas e a etapa experimental nas 24 horas seguintes. Nas primeiras horas do período de adaptação os animais foram privados de comida para o recolhimento de uma amostra de urina para dosagem de proteína, em seguida os animais tiveram acesso irrestrito a água e comida. Após o período experimental de 24 horas, a urina produzida foi recolhida, mensurada e armazenada em refrigerador para análises posteriores. As quantidades de água e ração consumidas durante o período experimental foram medidas, assim como o peso corporal do animal ao ser retirado da gaiola metabólica.

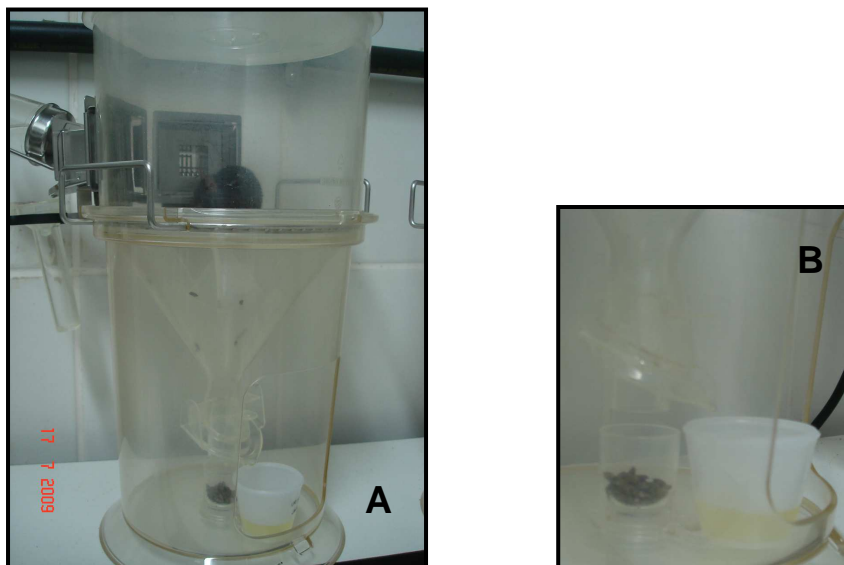


Figura 9: A: Animal alocado em gaiola metabólica durante a realização do experimento. B: Detalhe dos compartimentos da gaiola metabólica que permitem a separação de fezes e urina.

3.5 Dosagem de glicemia

A dosagem de glicemia foi realizada, com o auxílio de um glicosímetro Prestige® IQ, em 3 momentos distintos do protocolo experimental. Em todas as avaliações os animais foram submetidos a um jejum de 6 horas iniciando-se às 9:00h da manhã, respeitando o período de menor atividade dos animais (BREYER *et al.*, 2005). A primeira dosagem foi realizada uma semana após as injeções de STZ para a confirmação do sucesso na indução do diabetes; a segunda dosagem foi realizada 6 semanas após a indução para avaliação da glicemia antes do início do tratamento; e a última dosagem foi feita ao final das quatro semanas de tratamento com quercetina ou veículo.

3.6 Parâmetros bioquímicos

Na 18ª semana, após serem retirados das gaiolas metabólicas, os animais foram anestesiados com ketamina-xilasina (9:1), e submetidos à coleta de sangue pelo plexo retro-orbital com auxílio de capilar heparinizado. O sangue foi então centrifugado e o plasma retirado para a realização das dosagens bioquímicas. Os parâmetros analisados foram: colesterol total, triglicerídeos, uréia, creatinina e ácido úrico. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas Bioclínico, onde, por métodos automatizados de espectrofotometria, realizaram-se todas as dosagens.

As amostras de urina de 24 horas também foram enviadas ao referido laboratório para a dosagem de creatinina urinária, para determinação do *clearance* de creatinina.

Utilizando-se dos valores de creatinina urinária e plasmática, foi possível calcular a depuração ou *clearance* de tal substância, a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Depuração} = \frac{[U] \times V_T}{[P] \times 1440}$$

Onde:

Depuração = Depuração de creatinina (mL/min)

[U] = Concentração urinária de creatinina (mg/dL)

V_T = Volume total de urina em 24 horas (mL)

[P] = Concentração plasmática de creatinina (mg/dL)

1440 = Tempo de coleta relativa às 24 horas (min)

3.7 Proteinúria

A partir das amostras obtidas nas primeiras horas do período de adaptação na gaiola metabólica, foi feita a dosagem de proteínas urinárias de todos os grupos experimentais.

A determinação da concentração de proteínas em cada amostra foi realizada pelo método de Bradford (1976). A construção de uma curva padrão com albumina sérica

bovina permitiu o cálculo das concentrações a partir da absorbância medida a 595nm, utilizando-se da lei de Lambert-Beer.

3.8 Medida de peso úmido dos rins

Os animais foram anestesiados com ketamina-xilasina (9:1, i.p.), e posteriormente foi realizada uma incisão torácica de forma a deixar o coração com livre acesso para realização da perfusão no animal. Para execução da perfusão foi feita uma incisão no átrio direito e em seqüência infundido, aproximadamente, 50 mL de PBS (0,1 M; pH 7,4) no ventrículo esquerdo, seguido de aproximadamente 50 mL da solução fixadora Duboscq-Brasil, ambos com pressão controlada igual a perfusão arterial média (PAM) de cada grupo. A perfusão sob pressão controlada e igual a PAM permite manutenção mais adequada do formato das artérias, evitando também possíveis rupturas e degradação das placas ateromatosas. Ao término da perfusão retirou-se dos animais os rins, pesou-se e estes foram estocados isoladamente em recipientes de vidro contendo solução fixadora de PBS (0,1 M, pH 7,4) com 10% de formaldeído (4%), até o momento da preparação histológica.

3.9 Análises histológicas

Os rins fixados foram utilizados para a realização de morfometria da área do tufo capilar glomerular e da cápsula de Bowman em lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Além disso, foi realizada coloração com Tricrômio de Masson para avaliação da porcentagem de deposição de colágeno glomerular. A porcentagem da área renal cortical ocupada por tecido intersticial é usada como medida do grau de expansão intersticial, visualizada pela última coloração.

3.9.1 Preparação das amostras

Após a eutanásia, os animais foram perfundidos com solução de tampão fosfato em pH fisiológico (PBS; pH 7,4) utilizando-se de pressão similar à fisiológica (100 mmHg) e em seguida fixado *in situ* por perfusão com solução de Duboscq-Brasil

(ácido pícrico, etanol, formaldeído, ácido acético). Os rins foram pesados e seccionados. Dois cortes coronais foram então pós-fixados em solução de formol tamponado a 10%.

As peças foram desidratadas utilizando-se concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95%, 100%) na seguinte ordem: uma hora no álcool 70%, uma hora no álcool 80%, seguido de 3 banhos de 30 minutos no álcool 95% e por fim dois banhos de uma hora no álcool absoluto. Em seguida, embebidas em xilol (2 banhos de 30 minutos e um terceiro de uma hora) e finalmente em parafina líquida a 60°C (2 horas). Por fim, os blocos foram solidificados em formas apropriadas, para posterior microtomia. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 3 µ de espessura com o uso de micrótomo rotativo. Os cortes histológicos foram estendidos sobre lâminas silanizadas (S3003, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) e colocados em estufa a 58°C por 24 horas. Aderidos às lâminas, estes cortes foram desparafinizados na estufa a 60°C e hidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, xilol e água corrente e posteriormente corados.

3.9.2 Coloração pela hematoxilina e eosina

Foi realizada coloração com HE para realização de morfometria dos glomérulos. Após a desidratação, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavados em água corrente por 5 minutos, mergulhados no diferenciador, lavados em água corrente por mais 5 minutos, mergulhados 10 vezes em álcool 80% para enfim serem corados com eosina por um minuto.

Após a coloração completa os cortes foram desidratados seguindo o protocolo de 20 mergulhos no álcool 95%, 20 mergulhos no álcool absoluto e 30 mergulhos no xilol. Após a desidratação as lâminas foram montadas em meio permanente com o uso de verniz. Para análise morfométrica, foram fotografados 30 glomérulos de cada animal, em um aumento de 400X (Microscópio AX70, Olympus, Center Valley, PA, EUA; Câmera Digital VKC150, Hitachi, Tokyo, Japão). A análise foi realizada com o auxílio do programa Image J (*National Institute of Health, USA*) para a medida do tufo glomerular.

3.9.3 Coloração pelo Tricrômico de Masson

Foi realizada a coloração com Tricrômico de Masson para identificação da área de deposição de colágeno nos glomérulos renais. Após a desparafinização e hidratação dos cortes, os mesmos foram colocados no fixador Bouim por uma hora na estufa a 60°C. Após o resfriamento das lâminas as mesmas foram lavadas em água corrente para retirada de excesso do fixador Bouim e coradas com hematoxilina férrica por 10 minutos, em seguida lavados em água corrente por 10 minutos, e coradas nas soluções 1 (fucsina ácida, Xilidina Ponceau, ácido acético glacial, e água destilada), 2 (ácido fosfomolibdico em água destilada) e 3 (azul de metila) por 10 minutos. Posteriormente, foram diferenciadas em ácido acético glacial 1% por 3 minutos e desidratadas seguindo o protocolo de 20 mergulhos no álcool 95%, 20 mergulhos no álcool absoluto e 30 mergulhos no xilol. Após a desidratação as lâminas foram montadas em meio permanente com o uso de verniz.

Um total de 30 glomérulos por animal foram aleatoriamente selecionados e fotografados. Com o auxílio do programa Image J (domínio público), foi determinada a porcentagem de área corada em cada glomérulo. A média dos valores encontrados foi considerada a porcentagem média de deposição de colágeno para cada animal.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos com valores de média \pm erro padrão da média (EPM) para o número de camundongos indicado. Para comparações múltiplas, os dados foram analisados pelo teste ANOVA de 2 vias seguido de teste *post hoc* de Fisher utilizando-se o programa GB-Stat versão 6.5 (Dynamic Microsystems, Inc.). O valor de $p < 0,05$ foi indicativo de diferença estatística significativa.

A decorative graphic consisting of two parallel vertical black lines that extend from the top of the page down to the bottom, passing through the word 'RESULTADOS'.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Medida de peso corporal

Durante o protocolo os animais, de todos os grupos experimentais, foram submetidos à pesagem uma vez por semana. Como esperado, devido ao distúrbio metabólico característico do diabetes, os animais diabéticos tiveram uma perda de peso quando comparados aos seus respectivos controles. Os dados com as médias dos pesos \pm EPM por semana estão representados na Tabela 3. Para todos os resultados os animais C57 do grupo controle serão representados como C57 CT, do grupo diabético veículo como C57 DV e do grupo diabético tratado com quercetina como C57 DT, a mesma seqüência é válida para os animais apoE^(-/-), onde teremos as abreviaturas apoE CT, apoE DV e apoE DT.

Tabela 3: Medida de peso corporal (g) dos animais durante 10 semanas de protocolo experimental

Semanas	Grupos experimentais					
	C57			apoE		
	CT (n=8)	DV (n=8)	DT (n=8)	CT (n=8)	DV (n=8)	DT (n=8)
0	25,5 \pm 0,7	24,2 \pm 0,6	23,6 \pm 0,8	21,9 \pm 0,7	24,2 \pm 0,6	20,4 \pm 0,3
1	27,2 \pm 0,9	23,6 \pm 0,8*	23,1 \pm 0,8*	23,2 \pm 0,3	22,2 \pm 0,6	20,6 \pm 0,6
2	28,1 \pm 0,5	24,1 \pm 0,8*	23,5 \pm 0,7*	24,6 \pm 0,8	22,3 \pm 0,7	20,3 \pm 1,1
3	29,2 \pm 0,4	22,7 \pm 1,0**	23,0 \pm 0,7*	26,3 \pm 0,6	21,3 \pm 0,7 [#]	21,5 \pm 0,6
4	29,3 \pm 0,5	23,5 \pm 0,9**	22,8 \pm 0,9**	26,9 \pm 0,9	20,9 \pm 0,7 ^{##}	21,1 \pm 0,7
5	29,9 \pm 0,4	23,4 \pm 1,0**	23,1 \pm 1,1**	27,3 \pm 0,7	20,5 \pm 0,8 ^{##}	20,8 \pm 1,2 [#]
6	30,6 \pm 0,5	22,8 \pm 1,1**	24,1 \pm 1,0**	27,6 \pm 0,9	20,9 \pm 0,8 ^{##}	20,6 \pm 1,7 [#]
7	31,2 \pm 0,6	24,4 \pm 1,3**	24,6 \pm 1,1**	27,9 \pm 0,8	20,1 \pm 0,8 ^{##}	20,5 \pm 1,5 [#]
8	31,9 \pm 0,6	24,7 \pm 1,3**	25,0 \pm 1,0**	28,1 \pm 0,9	19,6 \pm 1,0 ^{##}	21,4 \pm 0,6 [#]
9	32,1 \pm 0,6	24,6 \pm 1,6**	24,9 \pm 1,4**	28,7 \pm 1,1	20,6 \pm 1,3 ^{##}	21,7 \pm 0,2 [#]
10	32,5 \pm 0,7	24,8 \pm 1,6**	24,8 \pm 1,4**	29,2 \pm 1,0	20,1 \pm 1,4 ^{##}	21,7 \pm 0,2 [#]

Valores em media \pm EPM. *p<0,05, ** p<0,01 *versus* C57 CT; [#] p<0,05, ^{##} p<0,01 *versus* apoE CT.

4.2 Medida dos parâmetros metabólicos

Dentro dos parâmetros metabólicos foram analisados a ingestão de água, o consumo de ração e o volume urinário dos grupos experimentais. Pelo fato do diabetes tratar-se de um distúrbio metabólico, o modelo experimental de diabetes tipo 1 simula a doença humana apresentando alguns sinais clássicos da doença, como polidipsia, poliúria e polifagia. Na figura 10, observamos que a ingestão de água nos grupos diabéticos C57 foi aproximadamente 5 vezes maior que o grupo controle ($5 \pm 0,3$ vs. 25 ± 2 mL; $p < 0,01$). O tratamento com quercetina não demonstrou qualquer efeito nesse parâmetro (25 ± 2 vs. 21 ± 4 mL). Nos grupos apoE diabéticos também houve um aumento significativo na ingestão de água quando comparado aos seus respectivos controles (8 ± 1 vs. 25 ± 2 mL; $p < 0,01$) e o tratamento também não propiciou nenhuma alteração (25 ± 2 vs. 23 ± 4 mL).

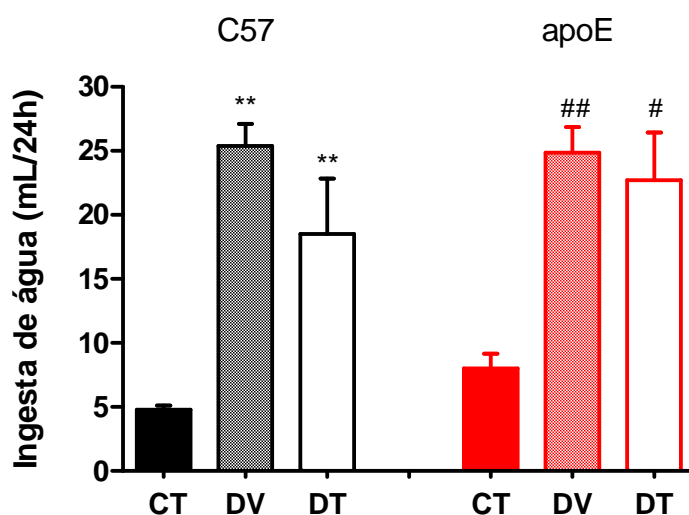


Figura 10: Ingestão de água dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. C57 CT; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ vs. apoE CT.

Devido ao aumento na ingestão de água, consequentemente, houve um aumento do volume urinário excretado em 24 horas. Esses dados estão demonstrados na figura 11, onde temos um grande aumento do volume urinário dos grupos diabéticos veículo quando comparados aos seus controles (C57: $2 \pm 0,2$ vs. 24 ± 2 mL/24hs; $p < 0,01$ e apoE: $2 \pm 0,7$ vs. 25 ± 2 mL/24hs; $p < 0,01$). O tratamento com quercetina levou a uma redução no volume urinário em ambos os grupos quando comparados

aos seus respectivos veículos (C57: 24 ± 2 vs. 13 ± 4 ; $p < 0,01$ e apoE: 25 ± 2 vs. 17 ± 3), com significância apenas para o grupo C57.

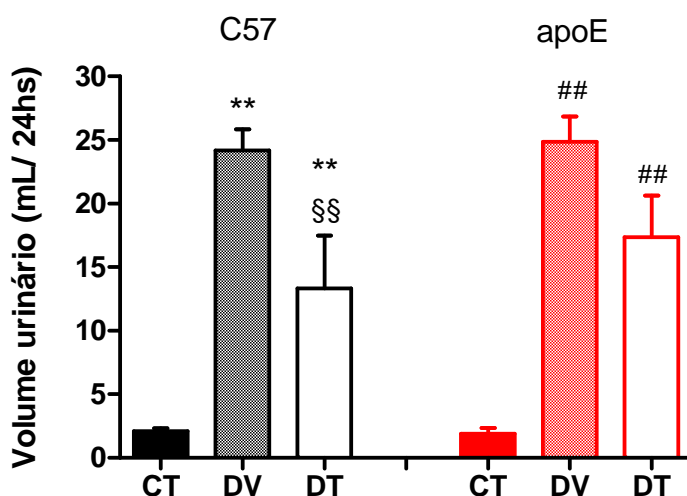


Figura 11: Volume urinário em 24h dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. C57 CT; §§ $p < 0,05$ vs. C57 DV; ## $p < 0,01$ vs. apoE CT.

A figura 12 mostra o consumo de ração dos grupos experimentais, observamos um aumento significativo no consumo dos grupos diabéticos veículo frente a seus respectivos controles (C57: $3 \pm 0,3$ vs. $5 \pm 0,5$ g/24h; $p < 0,01$ e apoE: $3 \pm 0,3$ vs. $6 \pm 0,4$ g/24h; $p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos tratados com quercetina e seus respectivos grupos veículo (C57: $5 \pm 0,5$ vs. $5 \pm 0,4$ g/24h e apoE: $6 \pm 0,4$ vs. $6 \pm 0,6$ g/24h).

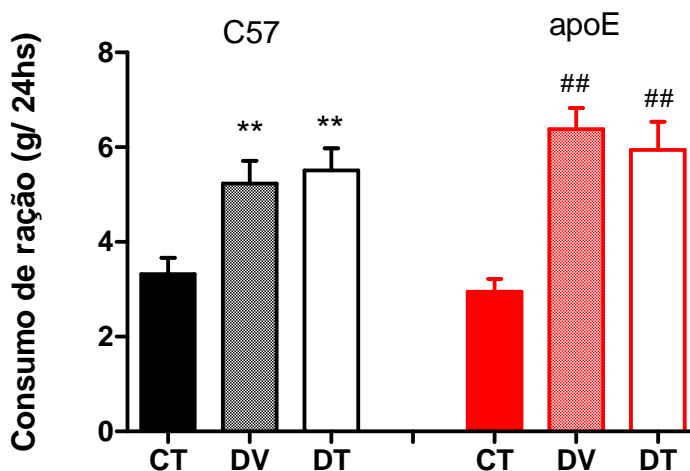


Figura 12: Consumo de ração dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. C57 CT; ## $p < 0,01$ vs. apoE CT.

4.3 Medida de glicemia

Devido à facilidade da medida de glicemia utilizando o glicosímetro, necessitando de pequena quantidade de sangue, este parâmetro foi o único mensurado antes do início do tratamento e após o tratamento com quercetina ou veículo. Desta forma os dados foram analisados como medidas repetidas para o mesmo animal. Na figura 13 encontram-se os resultados dos grupos diabéticos C57 e apoE. No grupo C57 tratado com quercetina observamos uma redução significativa da glicemia após o tratamento, de aproximadamente 33% (388 ± 41 vs. 262 ± 30 mg/dL; $p < 0,01$). O mesmo resultado foi observado nos grupos apoE, onde o grupo tratado com quercetina mostrou uma redução significativa de aproximadamente 25% da glicemia (476 ± 45 vs. 358 ± 39 mg/dL; $p < 0,01$).

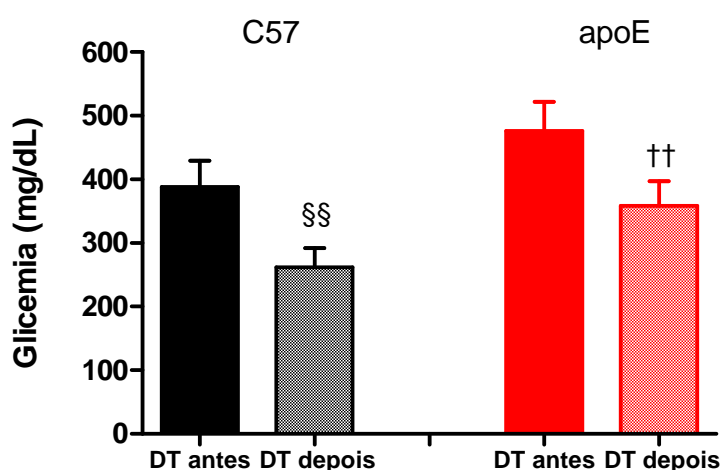


Figura 13: Glicemia de jejum dos grupos C57 e apoE diabéticos, antes e depois do tratamento com quercetina. Os dados estão expressos como média \pm EPM. §§ $p < 0,01$ vs. C57 DT antes; †† $p < 0,01$ vs. apoE DT antes.

4.4 Parâmetros bioquímicos

A medida dos parâmetros bioquímicos foi feita por método automatizado com a mesma amostra de sangue coletada antes do sacrifício do animal, após jejum de 6h. Os parâmetros analisados foram colesterol total, triglicerídeos, uréia, creatinina e ácido úrico. Na figura 14 podemos observar os dados relativos ao colesterol total dos grupos experimentais. Como já esperado devido a falta da apolipoproteína E os

animais *knockout* controles apresentaram colesterol bem elevado frente aos C57 controles (78 ± 2 vs. 483 ± 16 mg/dL; $p < 0,01$). Não encontramos diferença estatística nos níveis de colesterol nos grupos C57 diabéticos (130 ± 3 vs. 120 ± 5 mg/dL). Contudo, nos grupos apoE observamos uma diferença significativa entre os grupos apoE CT e apoE DV (483 ± 16 vs. 1114 ± 37 mg/dL; $p < 0,01$), mas o tratamento com quercetina não reverteu esse aumento (1114 ± 37 vs. 1012 ± 83 mg/dL).

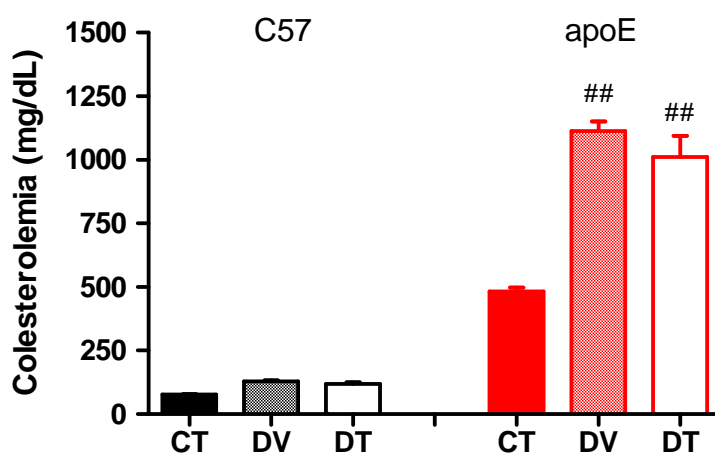


Figura 14: Medida de colesterol plasmático dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ## $p < 0,01$ vs. apoE CT.

Os resultados das medidas de triglicerídeos podem ser observados na figura 15, onde temos o aumento significativo dos triglicerídeos plasmáticos em ambos os grupos diabéticos veículo quando comparados aos seus respectivos controles. No grupo C57 temos 64 ± 6 vs. 110 ± 11 mg/dL; $p < 0,05$ e no grupo apoE temos 83 ± 9 vs. 158 ± 25 mg/dL; $p < 0,01$. O tratamento com quercetina reverteu totalmente o aumento nos triglicerídeos em ambos os grupos onde temos para o C57 uma diminuição de 31% (110 ± 11 vs. 34 ± 6 mg/dL; $p < 0,01$) e no grupo apoE houve uma redução de 44% (158 ± 25 vs. 70 ± 14 mg/dL; $p < 0,01$).

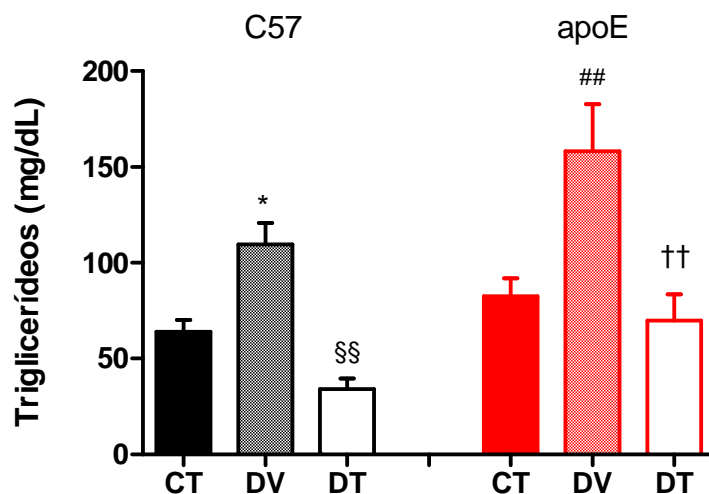


Figura 15: Medida de triglicerídeos plasmático dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C57 CT; §§ $p < 0,01$ vs. C57 DV; ## $p < 0,01$ vs. apoE CT; †† $p < 0,01$ vs. apoE DV.

Na análise dos parâmetros bioquímicos ligados a função renal, o primeiro a ser analisado foi a creatinina plasmática, que se encontra expresso na figura 16. Destacamos o aumento deste parâmetro nos grupos diabéticos frente aos seus respectivos controles (C57: $0,23 \pm 0,01$ vs. $0,4 \pm 0,03$ mg/dL; $p < 0,01$ e apoE: $0,21 \pm 0,02$ vs. $0,36 \pm 0,01$ mg/dL; $p < 0,01$). Os grupos tratados com quercetina apresentaram uma redução significativa de creatinina plasmática, no grupo C57 ($0,4 \pm 0,03$ vs. $0,23 \pm 0,03$ mg/dL; $p < 0,01$) e no grupo apoE ($0,36 \pm 0,01$ vs. $0,25 \pm 0,03$ mg/dL; $p < 0,01$).

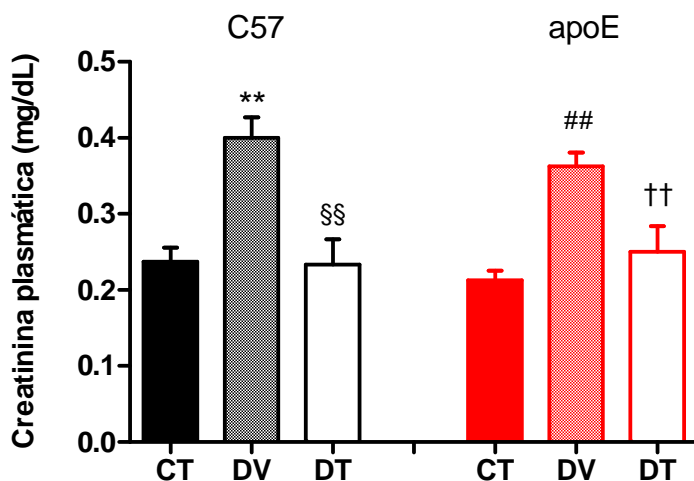


Figura 16: Medida de creatinina plasmática dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. C57 CT; §§ $p < 0,01$ vs. C57 DV; ## $p < 0,01$ vs. apoE CT; †† $p < 0,01$ vs. apoE DV.

A partir dos valores de creatinina plasmática e urinária e do volume urinário em 24h, foi calculado o *clearance* de creatinina, como apresentado na figura 17. Os dados apontam uma diminuição no *clearance* de creatinina no grupo C57 diabético frente ao seu controle (151 ± 26 vs. 225 ± 28 $\mu\text{L}/\text{min}$), o que não se observa no grupo apoE, onde o grupo diabético apresenta valores semelhantes ao controle (159 ± 12 vs. 147 ± 19 $\mu\text{L}/\text{min}$). O tratamento com quercetina sugere uma melhora de função renal pelo aumento do *clearance* de creatinina em ambos os grupos, para o C57 temos 151 ± 26 vs. 203 ± 23 $\mu\text{L}/\text{min}$; e para o grupo apoE temos 159 ± 12 vs. 224 ± 36 $\mu\text{L}/\text{min}$.

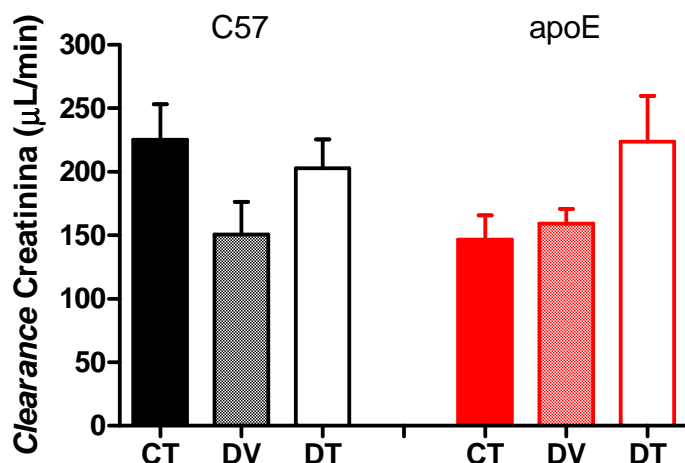


Figura 17: Medida de *clearance* de creatinina dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM.

A análise da dosagem de uréia plasmática mostrou que a indução do diabetes promoveu um aumento significativo em ambos os grupos de animais, C57 e apoE quando comparados aos seus respectivos controles (C57: 70 ± 3 vs. 115 ± 7 mg/dL; $p < 0,01$ e apoE: 84 ± 5 vs. 110 ± 9 mg/dL; $p < 0,05$), como demonstrado na figura 18. O tratamento com quercetina não alterou esse aumento quando comparados aos respectivos veículos (115 ± 7 vs. 101 ± 13 mg/dL para o grupo C57 e 110 ± 9 vs. 99 ± 10 mg/dL para o grupo apoE).

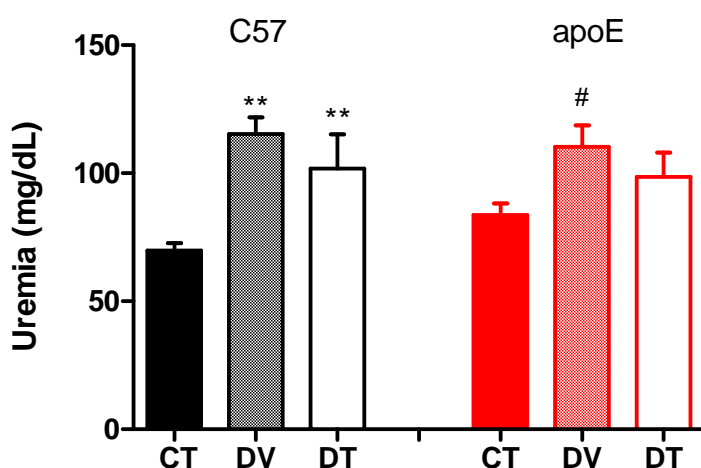


Figura 18: Medida de uréia plasmática dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. C57 CT; # $p < 0,05$ vs. apoE CT.

Os dados de ácido úrico plasmático estão demonstrados na figura 19, onde podemos observar um aumento significativo deste parâmetro no grupo diabético frente ao seu controle ($0,6 \pm 0,2$ vs. $2,4 \pm 0,5$ mg/dL; $p < 0,05$), o tratamento com quercetina não alterou esse aumento ($2,4 \pm 0,5$ vs. $2,3 \pm 0,2$ mg/dL). No grupo diabético aterosclerótico observamos um ligeiro aumento, não significativo estatisticamente ($1,3 \pm 0,1$ vs. $1,9 \pm 0,4$ mg/dL), e o tratamento não modificou os valores de ácido úrico plasmático encontrado no grupo veículo ($1,9 \pm 0,4$ vs. $2,1 \pm 0,1$ mg/dL).

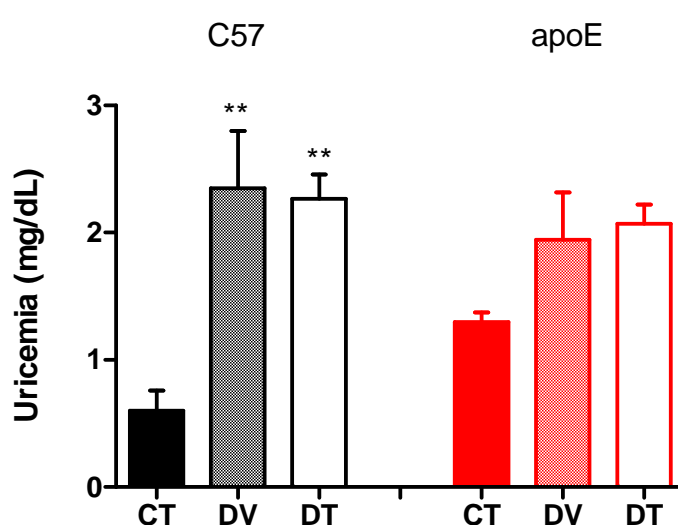


Figura 19: Medida de ácido úrico plasmático dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. C57 CT.

4.5 Proteinúria

A partir da amostra de urina obtida nas primeiras horas do período de adaptação na gaiola metabólica, foi feita a dosagem de proteína urinária para todos os grupos experimentais. Como demonstrado na figura 20, os valores de proteína urinária aumentaram significativamente nos grupos diabéticos frente seus respectivos grupos controles (C57: $4 \pm 0,6$ vs. 11 ± 3 mg/24h; $p < 0,05$ e apoE: $4 \pm 0,6$ vs. 15 ± 2 mg/24h; $p < 0,01$). O tratamento com quercetina mostrou-se eficaz na redução da proteinúria no grupo diabético (11 ± 3 vs. $4 \pm 0,5$ mg/24h; $p < 0,05$), entretanto não mostrou diferença no grupo diabético aterosclerótico (15 ± 2 vs. 14 ± 1 mg/24h).

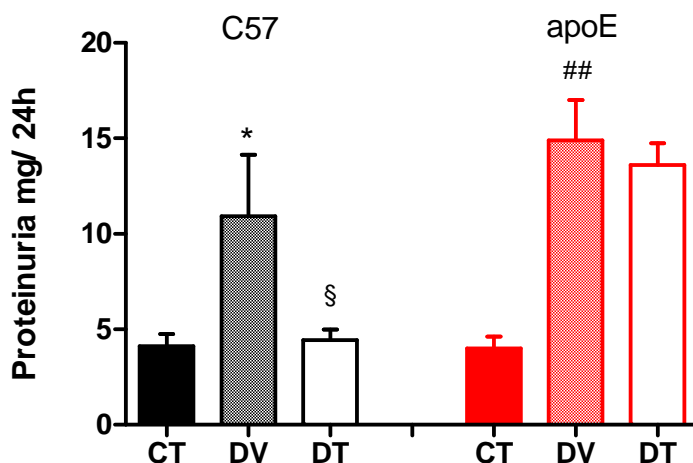


Figura 20: Medida de proteína urinária dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. C57 CT; § $p < 0,05$ vs. C57 DV; ## $p < 0,01$ vs. apoE CT.

4.6 Medida de peso úmido dos rins

Após a anestesia e perfusão dos animais, os rins direito e esquerdo foram retirados e pesados. O peso dos rins foi normalizado pelo peso corporal dos animais, devido a diferença significativa de peso entre os grupos controle e diabéticos. Contudo dentro dos grupos diabéticos os animais não perderam e também não ganharam peso no decorrer das 10 semanas do protocolo experimental. Os dados encontram-se na figura 21, onde destacamos uma diferença significativa no peso dos rins nos grupos diabéticos frente aos seus controles (C57: $12 \pm 0,9$ vs. $18 \pm 0,3$ mg/g; $p < 0,01$ e apoE: $13 \pm 0,3$ vs. $18 \pm 0,4$ mg/g; $p < 0,01$), confirmando o desenvolvimento de hipertrofia renal. Os grupos tratados com quercetina apresentaram uma redução significativa no peso dos rins, no grupo C57 ($18 \pm 0,3$ vs. 15 ± 1 mg/g; $p < 0,05$) e no grupo apoE ($18 \pm 0,4$ vs. 13 ± 1 mg/g; $p < 0,01$).

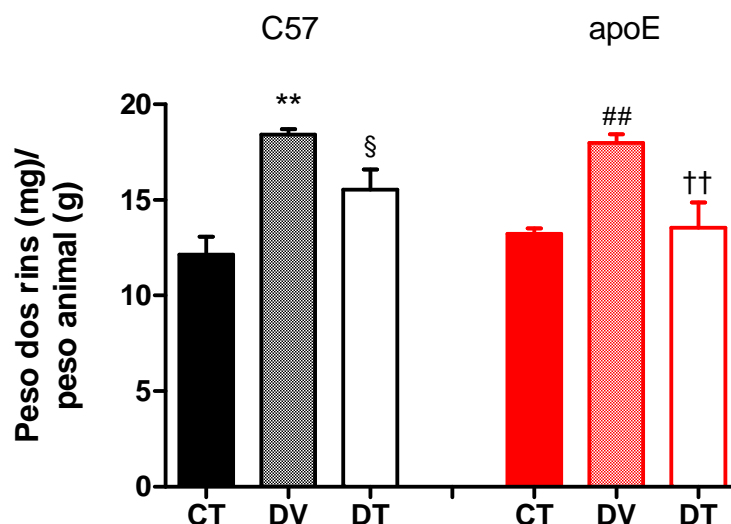


Figura 21: Medida do peso dos rins dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. C57 CT; § $p < 0,05$ vs. C57 DV; ## $p < 0,01$ vs. apoE CT; †† $p < 0,01$ vs. apoE DV.

4.7 Análises histológicas

Após a retirada dos rins, o rim esquerdo foi utilizado para a realização das análises histológicas. Os rins foram emblocados em parafina, e em seguida cortados e corados. Nas análises histológicas foram feitas as medidas da área do tufo glomerular e a porcentagem de deposição de colágeno (glomeruloesclerose) para cada grupo. Em cada uma das análises foram utilizadas fotos de 30 glomérulos de cada animal. A figura 22 mostra fotos típicas de glomérulos dos grupos C57 corados com Tricrômio de Masson e na figura 23 temos fotos típicas de glomérulos dos grupos apoE com a mesma coloração.

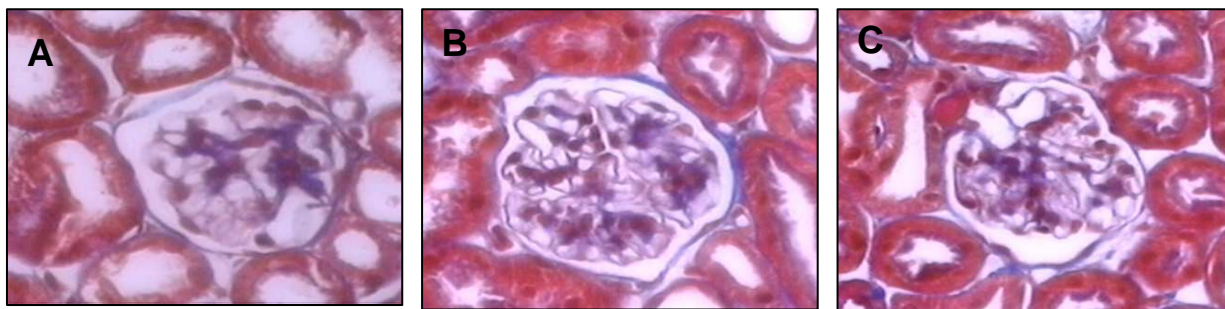


Figura 22: Fotos típicas de glomérulos corados com Tricrômio de Masson (aumento 400x). Todas as figuras são representativas do grupo C57, onde na figura A temos um glomérulo do grupo controle, na B do grupo diabético veículo e C do grupo diabético tratado com quercetina, a coloração azul indica a deposição de colágeno glomerular.



Figura 23: Fotos típicas de glomérulos corados com Tricrômio de Masson (aumento 400X). Todas as figuras são representativas do grupo apoE, onde na figura A temos um glomérulo do grupo controle, na B do grupo diabético veículo e C do grupo diabético tratado com quercetina, a coloração azul indica a deposição de colágeno glomerular.

Na figura 24 temos a análise da área do tufo glomerular, onde observamos que no grupo C57 não houve diferença estatística entre os grupos após a indução do diabetes (1941 ± 131 vs. $2617 \pm 72 \mu^2$). Já no grupo apoE tivemos um aumento significativo na área do tufo glomerular no grupo diabético (2518 ± 124 vs. $3532 \pm 453 \mu^2$; $p < 0,01$). Contudo, o tratamento com quercetina não foi capaz de alterar de forma efetiva a expansão do tufo glomerular em ambos os grupos estudados (C57: 2617 ± 72 vs. $2260 \pm 48 \mu^2$ e apoE: 3532 ± 453 vs. $2963 \pm 197 \mu^2$).

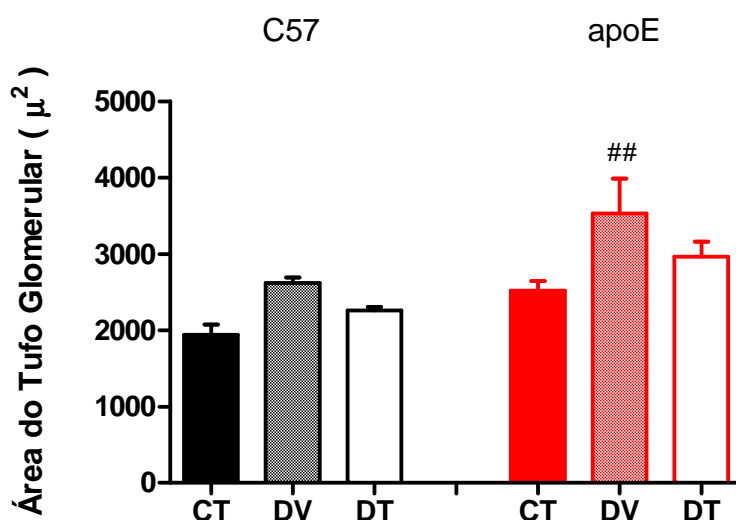


Figura 24: Medida da área do tufo glomerular dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ^{##} $p < 0,01$ vs. apoE CT.

Na avaliação da glomeruloesclerose foi feita a análise da porcentagem de colágeno depositado nos glomérulos. Observamos um aumento na quantidade de colágeno depositado nos glomérulos em ambos os grupos diabéticos (C57: 14 ± 2 vs. $33 \pm 1\%$; $p < 0,01$ e apoE: 23 ± 1 vs. $35 \pm 4\%$; $p < 0,01$). O tratamento com quercetina conseguiu prevenir de maneira significativa a glomeruloesclerose em ambos os grupos tratados (C57: 33 ± 1 vs. $26 \pm 0,7\%$; $p < 0,01$ e apoE: 35 ± 4 vs. $25 \pm 2\%$; $p < 0,01$). Os dados estão demonstrados na figura 25.

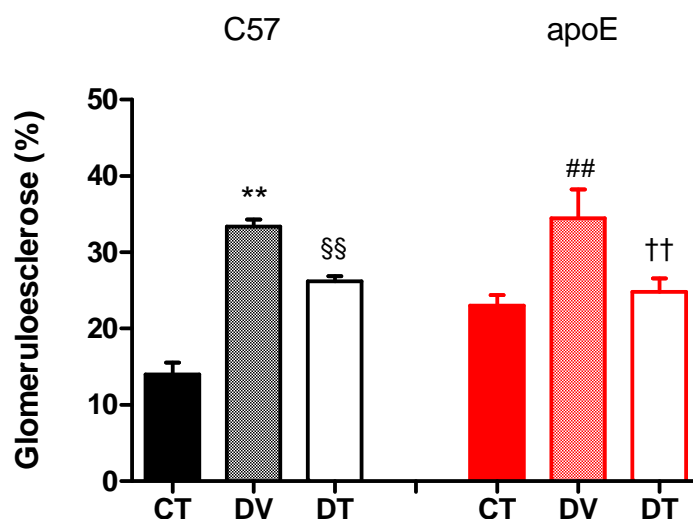


Figura 25: Avaliação da glomeruloesclerose dos grupos C57 e apoE, controles e diabéticos, submetidos ao tratamento com quercetina ou veículo. Os dados estão expressos como média \pm EPM. ^{**} $p < 0,01$ vs. C57 CT; ^{§§} $p < 0,01$ vs. C57 DV; ^{##} $p < 0,01$ vs. apoE CT; ^{††} $p < 0,01$ vs. apoE DV.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os modelos experimentais de diabetes são bem estabelecidos e extremamente utilizados em protocolos experimentais. A indução do diabetes por estreptozotocina (STZ), um derivado nitrosurea isolado do *Streptomyces achomogenes*, mostrou interferir no transporte de glicose e induzir quebras no DNA celular. Uma dose única de STZ é capaz de produzir diabetes em roedores, devido aos efeitos tóxicos diretos nas células endócrinas pancreáticas, entretanto, em camundongos o uso de doses elevadas (≥ 200 mg/kg) promove uma citotoxicidade não específica podendo resultar em danos tubulares renais (REES; ALCOLADO, 2005; TESCH; NIKOLIC-PATERSON, 2006). Como o presente estudo avalia a função renal de animais diabéticos, utilizamos o protocolo de indução com doses menores de STZ em dias consecutivos, no qual os efeitos citotóxicos não específicos são reduzidos a níveis mínimos. O protocolo de indução do diabetes com uma dose de 100 mg/kg/dia durante três dias consecutivos obteve sucesso na indução de hiperglicemia e foi similar a outros autores como Morikawa e cols. (2005).

O camundongo C57BL/6 é a linhagem isogênica mais utilizada em estudos experimentais. Esta linhagem é utilizada como modelo experimental em diversas áreas de pesquisa como doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade. Além de prover uma fonte de DNA para o sequenciamento do genoma murino, servindo desta forma de *background* para os animais transgênicos (BREYER *et al.*, 2005). Os animais C57 foram utilizados em nosso estudo na avaliação dos efeitos do tratamento com quercetina na função renal de animais com diabetes experimental.

Os camundongos apoE^(-/-) têm o gene da apolipoproteína E (apoE) inativado, e a apoE é um componente estrutural de todas as partículas de lipoproteínas exceto a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Uma de suas funções mais importantes é como ligante de alta afinidade para os receptores de apoB e apoE e para os receptores de quilomícrons remanescentes, permitindo a captação das partículas ligadas a apoE pelo fígado. Na ausência da apoE o colesterol se acumula na circulação sanguínea promovendo hipercolesterolemia e o desenvolvimento espontâneo de aterosclerose (JAWIEN *et al.*, 2004).

Nos animais apoE^(-/-) a glicemia de jejum e os níveis de insulina não se apresentam elevados quando comparados aos camundongos C57BL/6. O diabetes nos animais apoE^(-/-) promove um aumento adicional nos níveis de colesterol em torno de duas vezes quando comparados aos animais não diabéticos da mesma linhagem, além do aumento substancial na área de placa aterosclerótica no arco aórtico, da ordem de aproximadamente cinco vezes (WU; HUAN, 2007). Um número crescente de estudos demonstra que a hiperlipidemia por si só é um fator de risco na progressão de doenças renais e quando associado ao diabetes acelera de maneira importante os danos renais, se constituindo, desta forma, um modelo importante no estudo da nefropatia diabética.

Em nosso estudo iniciamos a avaliação do tratamento pelos dados ponderais, onde o peso dos animais foi medido uma vez por semana durante as dez semanas do protocolo experimental, dados demonstrados na Tabela 3. Observamos uma queda progressiva no peso dos animais com o passar das semanas, possivelmente decorrente dos efeitos catabólicos associados à deficiência de insulina, somado a diurese osmótica. A perda de peso tem um forte impacto na sobrevivência do animal, confirmado pela perda de animais antes do término do protocolo do estudo, este fato foi observado, principalmente, entre os animais da linhagem apoE^(-/-). Nossos dados corroboram Xu e cols. (2006) que relataram uma perda de peso significativa em animais apoE^(-/-) após 6 semanas de diabetes. Enquanto Shen e cols. (2003) mostraram perda de peso em camundongos C57 em um protocolo de 16 semanas de indução de diabetes. Já Lassila e cols. (2004) demonstraram uma perda de peso significativa após 20 semanas de diabetes em animais C57 e apoE^(-/-), quando comparados aos seus respectivos controles não-diabéticos.

O tratamento com quercetina não promoveu nenhuma modificação no peso dos animais diabéticos quando comparados aos respectivos veículos, tanto no grupo apoE^(-/-) quanto no C57, dados apresentados na Tabela 3. Resultados similares foram encontrados por Anjaneyulu e Chopra (2004), em ratos diabéticos tratados com quercetina (10mg/kg/dia, V.O.) por quatro semanas.

Devido ao distúrbio metabólico desencadeado pelo diabetes, fez-se necessário à avaliação de parâmetros dessa natureza. A tríade clássica de sintomas que

acompanham o diabetes é polidipsia, poliúria e polifagia. A poliúria e polidipsia podem ser explicadas pelo fato que quando a concentração de glicose no sangue está elevada (acima do limiar renal de 160-180mg/dL), a reabsorção de glicose no túbulo proximal do rim é incompleta, e parte da glicose é excretada na urina (glicosúria). Isto aumenta a pressão osmótica da urina e conseqüentemente inibe a reabsorção de água pelo rim, resultando na produção aumentada de urina (poliúria) e na perda acentuada de líquido. O volume de sangue perdido será repostado osmoticamente da água armazenada nas células do corpo, causando desidratação e sede aumentada (polidipsia).

A polifagia é o aumento do apetite, e ocorre devido à deficiência de glicose nas células que estimula o cérebro a ativar o centro da fome. Entretanto, apesar do aumento na ingestão de alimentos os animais apresentam perda de peso. Isto decorre do comprometimento na obtenção de glicose, culminando no desvio do metabolismo dos carboidratos para os lipídeos, como tentativa de manter os níveis energéticos. Esta alteração produz perda de peso, aumento do colesterol plasmático e acidose metabólica.

Em nosso estudo como esperado os animais diabéticos de ambas as linhagens apresentaram um grande aumento na ingestão de água (polidipsia) e no consumo de ração (polifagia) quando comparados aos seus respectivos controles. O aumento na ingestão de água e ração foi demonstrado por Jandeleit-Dahm e cols. (2005) em animais apoE^(-/-) com 20 semanas de diabetes. O aumento no consumo de ração foi apresentado também por Calkin e cols. (2008), em animais apoE^(-/-) com 20 semanas de diabetes. Contudo, o tratamento com quercetina não alterou esses parâmetros. Esses dados corroboram o estudo de Anjaneyulu e Chopra (2004), em ratos diabéticos tratados com quercetina. E também com trabalhos utilizando outros tipos de tratamento nos grupos apoE^(-/-) diabéticos onde os parâmetros ponderais não se alteraram, como no estudo de Jandeleit-Dahm e cols. (2005).

O volume urinário também se apresentou elevado nos grupos diabéticos (poliúria) de ambas as linhagens. Esse aumento já era esperado devido ao grande volume de água ingerido pelos animais. O tratamento com quercetina levou a diminuição do

volume urinário excretado por dia tanto no grupo diabético quanto no diabético aterosclerótico, todavia, apenas o grupo diabético mostrou significância estatística.

A poliúria, juntamente com a glicosúria, são os primeiros sintomas clínicos de doença renal em pacientes diabéticos não-tratados ou descompensados. O nível da poliúria e, portanto, a aceleração do fluxo de fluidos tubulares, é definida pela concentração de glicose e pelas forças osmóticas (WANG *et al.*, 2008). A diminuição do volume urinário excretado por dia no grupo diabético tratado com quercetina demonstra uma resposta positiva ao tratamento. Levando a uma preservação função renal, que pode ser explicada em parte pelo efeito hipoglicemiante do tratamento. No grupo diabético aterosclerótico a resposta não foi tão evidente, provavelmente pelo fato da hiperglicemia associada à hipercolesterolemia agravar o prejuízo na função renal, sendo, assim mais difícil uma resposta a monoterapia.

Na avaliação bioquímica o primeiro parâmetro analisado foi a glicemia de jejum. Devido ao fato dos camundongos serem animais com hábitos noturnos, um jejum durante a noite antes da coleta de sangue para dosagem se traduziria em um jejum prolongado de aproximadamente 24h. E este jejum poderia ativar mecanismos fisiológicos regulatórios e compensatórios da glicose, como resultado do estresse provocado (BREYER, *et al.* 2005). Com base no exposto os animais foram submetidos a um jejum de seis horas iniciado pela manhã e finalizado à tarde antes da coleta de sangue. Esse tipo de jejum foi realizado antes de todas as coletas de sangue para dosagens bioquímicas.

Devido à variação nos níveis glicêmicos após a indução do diabetes com STZ, a comparação entre os grupos foi feita por medidas repetidas, antes e após o tratamento com quercetina. Visto que a dosagem foi realizada com auxílio de glicosímetro, o qual necessita de pequena quantidade de sangue, isto tornou viável a dosagem antes do tratamento sem a necessidade de sacrifício do animal. O uso do método por espectrofotometria requer a utilização de anticoagulante específico, sendo necessário maior quantidade de sangue e a separação da amostra. O glicosímetro utiliza pequena quantidade de sangue total viabilizando a dosagem de glicemia e a integridade do animal após a dosagem. O uso de diferentes

glicosímetros foi relatado por vários autores em estudos com animais diabéticos como Ding e cols. (2005), Xu e cols. (2006), Kim e Kim (2006) entre outros.

O tratamento com quercetina mostrou um efeito hipoglicemiante importante, levando a redução da glicemia tanto no grupo diabético quanto no diabético aterosclerótico. Estudos apontam o papel da quercetina na redução da resistência à insulina, primeiro passo do desenvolvimento do diabetes, como relatado por Rivera e cols. (2008) em ratos obesos com tratamento com quercetina 2 e 10 mg/kg/dia. O trabalho de Kanter e cols. (2007), com ratos Wistar diabéticos, indica que o tratamento com quercetina na dose de 15 mg/kg/dia, I.V., durante quatro semanas mostra efeito hipoglicemiante significativo, além do aumento na insulina plasmática, que neste modelo de diabetes encontra-se diminuída. Já no estudo de Vessal e cols. (2003), foram utilizados ratos Sprague-Dawley diabéticos tratados com quercetina 10 e 15 mg/kg/dia, com resultados importantes na redução da glicemia e no aumento no número de ilhotas pancreáticas após 10 dias de tratamento.

O grupo apoE diabético tratado com quercetina (apoE DT) apresentou a glicemia mais elevada que o respectivo grupo veículo (apoE DV), fato decorrente da morte dos animais com glicemia mais elevada do grupo veículo antes de completar as 10 semanas do protocolo experimental.

Os resultados de ensaios clínicos como o *Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications* (EDIC) e o *Multiple Risk Factor Intervention and Complications* (MR-FIT), demonstraram que as maiores complicações cardiovasculares do diabetes são atribuídos ao excesso de glicose no plasma. Resultados do EDIC mostraram que o controle da glicemia nos pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 está associado com a redução no grau de aterosclerose (EDIC Research Group, 1999; ARONSON; RAYFIELD, 2002).

A hiperglicemia tem um papel fundamental na evolução para doença renal em pacientes diabéticos. Uma das principais conseqüências da hiperglicemia sustentada é o aumento na formação dos produtos finais de glicação (AGEs), altamente implicados no desenvolvimento de lesões renais. Os AGEs alteram a estrutura e função intra e extracelular de moléculas, aumentam o estresse oxidativo,

modula ativação celular, transdução de sinal e expressão de citocinas e fatores de crescimento via receptor ou por via independente. A diminuição da glicemia leva a uma diminuição na formação de AGEs levando a proteção da função renal (SCHRIJVERS *et al.*, 2004).

O colesterol foi um outro parâmetro bioquímico avaliado, visto que uma das linhagens do estudo se trata de animais hipercolesterolêmicos. Os animais apoE^(-/-), após a indução do diabetes tiveram um incremento nos níveis de colesterol, dados demonstrados em outros trabalhos com animais apoE diabéticos (FORBES *et al.*, 2004; LASSILA *et al.*, 2004; JANDELEIT-DAHM *et al.*, 2005; CALKIN *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2006; CALKIN *et al.*, 2008).

São esperadas alterações no perfil lipídico em pacientes diabéticos, que incluem hipertrigliceridemia e diminuição de HDL colesterol. No modelo experimental apoE^(-/-) com injeções de STZ, o diabetes é seguido por um aumento no colesterol plasmático tempo dependente. Após seis semanas de diabetes o animal tem um aumento de aproximadamente duas vezes nos níveis de colesterol quando comparados aos animais não diabéticos. No estudo de Park e cols. (1998) a avaliação das frações de colesterol apontaram um aumento dos quilomícrons/VLDL (cerca de duas vezes) e IDL/LDL (cerca de 2,5 vezes) nos animais apoE^(-/-) diabéticos quando comparados aos animais normoglicêmicos. Já o HDL praticamente não sofre variação com a indução do diabetes. Em nosso estudo não foi realizado a dosagem das frações de colesterol, uma vez que os trabalhos apontam essa dosagem por HPLC, metodologia mais sofisticada e de difícil acesso em nosso estudo.

O tratamento com quercetina não mostrou alteração nos níveis de colesterol em ambos os grupos estudados. Estes dados corroboram Fuhrman e cols. (2005) que utilizaram o tratamento com extrato liofilizado de uva, mostrando grande quantidade de quercetina, durante 10 semanas em animais apoE^(-/-) sem alteração nas dosagens de colesterol; e Romero e cols. (2010) em estudo com ratos SHR tratados por 4 semanas com quercetina na dose de 10 mg/kg/dia. Contudo, Rivera e cols. (2008) em estudos com ratos obesos tratados com quercetina nas doses de 2 e 10 mg/kg/dia por 10 semanas, encontraram uma diminuição significativa nos níveis de

colesterol; bem como Vessal e cols. (2003) em ratos diabéticos com 10 dias de tratamento com quercetina 10 e 15 mg/kg/dia.

A hipertrigliceridemia é uma alteração metabólica freqüente em pacientes diabéticos, que se deve ao aumento do efluxo de ácidos graxos livres do tecido adiposo e ao prejuízo na retirada, mediada pela insulina, destes pelo músculo esquelético, o que leva ao aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres. Em resposta, o fígado aumenta a síntese *de novo* do VLDL e a síntese de ésteres de colesterol, na presença de hiperglicemia e resistência a insulina, resultando numa superprodução de triglicerídeos, principal razão da dislipidemia encontrada no diabetes (BECKMAN *et al.*, 2002). Além do aumento na produção também há um impedimento na remoção de VLDL e quilomícrons, decorrente da atividade diminuída da lipoproteína lípase (LPL) no tecido adiposo em condições de diabetes. Modificações na composição do VLDL, como triglicerídeos em excesso, pode levar a redução na atividade da LPL. O volume das partículas de VLDL é de suma importância na aterogenicidade no diabetes, por determinar o tamanho e o conteúdo de colesterol das partículas de LDL subseqüentes. Partículas grandes de VLDL, com grande conteúdo de triglicerídeos, são precursores de partículas de LDL de baixa densidade, a qual determina a severidade da aterosclerose. A atividade da proteína transferidora de éster de colesterol (CETP), na troca de triglicerídeo por colesterol no VLDL hipertrigliceridêmico, está aumentada no diabetes. O CETP pode contribuir na formação de lipoproteínas aterogênicas no diabetes por produzir partículas de VLDL ricas em colesterol e partículas de HDL ricas em triglicerídeos, que não funcionam adequadamente na retirada do colesterol do LDL e das paredes dos vasos (SHAFRIR; RAZ, 2003).

Vários estudos vêm demonstrando o papel da dislipidemia como fator de risco de desenvolvimento de doenças renais. No estudo *Atherosclerosis Risk in Communities*, o aumento de triglicerídeos e a diminuição do HDL colesterol estão associados ao aumento no risco de desenvolvimento de disfunção renal. Dados do *Physicians' Health Study* indicam que aumentos nos níveis de colesterol e na razão LDL/HDL colesterol, bem como diminuição de HDL colesterol estavam associados ao aumento no risco de elevação da creatinina sérica (> 1,5 mg/dL) em voluntários aparentemente saudáveis, com função renal normal (CASES; COLL, 2005).

A hipertrigliceridemia foi confirmada em nosso estudo, onde observamos o aumento similar nos níveis de triglicerídeos em ambos os grupos estudados. O tratamento com quercetina mostrou um efeito importante na redução dos triglicerídeos, resultado que corrobora com os encontrados por Vessal e cols. (2003), Rivera e cols. (2008). O resultado demonstra um papel importante no tratamento da dislipidemia, com conseqüente proteção contra danos cardiovasculares e renais presentes no diabetes.

Dos parâmetros bioquímicos relacionados à função renal o primeiro a ser analisado foi a creatinina plasmática. A creatinina é o produto final da creatina e é liberado no sangue continuamente pelo músculo esquelético. A creatinina é livremente filtrada e não é absorvida. Na prática clínica é comum medir apenas a creatinina plasmática e usá-la como indicador da taxa de filtração glomerular (TFG). Essa abordagem é justificada pelo fato de que quase toda a creatinina excretada entra no túbulo renal por filtração. Como é pequena a quantidade secretada no túbulo renal, podemos observar uma boa correlação inversa entre a concentração plasmática de creatinina e a taxa de filtração glomerular. Com isso, o aumento na creatinina plasmática resulta diretamente da queda na TFG (EATON; POOLER, 2006).

A creatinina plasmática, como esperado, encontrou-se elevada nos animais diabéticos de ambas as linhagens apontando um comprometimento renal, indicativo de nefropatia diabética. No primeiro momento do diabetes, a hiperglicemia intracelular promove anomalias no fluxo sanguíneo e aumento na permeabilidade vascular. A hiperglicemia prolongada ativa várias vias metabólicas intracelulares, nas células endoteliais e musculares lisas vasculares, que incluem aumento na produção mitocondrial de EROs nas células endoteliais e produtos finais de glicação. Estes mecanismos levam ao aumento do estresse oxidativo e promove aumento na permeabilidade vascular e dano tissular renal.

As conseqüências renais da hiperglicemia são o desenvolvimento de hiperfiltração glomerular e aumento da albuminúria. Seguido de proteinúria e declínio progressivo da filtração glomerular (BREYER *et al.*, 2005b).

O tratamento com quercetina resultou na diminuição das taxas de creatinina plasmática em ambos os grupos diabéticos estudados. Estes dados corroboram o trabalho de Anjaneyulu e Chopra (2004) que observaram diminuição da creatinina plasmática em ratos diabéticos tratados com quercetina.

A quercetina, dentre suas propriedades biológicas, apresenta um importante efeito antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica, devido ao bloqueio da enzima xantina oxidase (CHENG; BREEN, 2000) e por atuar como captador de radicais hidroxil, peroxil e superóxidos (ANJANEYULU; CHOPRA, 2004). A diminuição dos radicais livres acarreta um melhora no dano tissular provocado por esses espécimes químicos, levando a uma melhora na função renal.

O *clearance* de creatinina avalia a taxa de filtração glomerular nos indivíduos. O grupo apoE controle quando comparado ao C57 controle apresentou uma diminuição no *clearance* de creatinina. Esse fato demonstra a importância da dislipidemia no contexto renal. Segundo Lassila e cols. (2004) há um maior acúmulo de produtos finais de glicação (AGEs) nos animais hipercolesterolêmicos, mesmo na ausência do diabetes, o que sugere que a formação de AGEs nesse modelo não é apenas por via glicose dependente, os lipídeos podem contribuir no acúmulo de AGEs.

Os animais diabéticos apresentaram uma redução do *clearance* de creatinina. O que já era esperado uma vez que com a hiperglicemia há uma elevação no AGEs, bem como um aumento na formação de EROs, fenômenos que culminam com danos renais. A geração de EROs tem sido apontada como crucial no desenvolvimento de complicações e várias vias são importantes nesse aspecto como: (1) o sorbitol, um produto do metabolismo da glicose pela aldose redutase, que se acumula intracelularmente e induz danos celulares, além de diminuir as concentrações do antioxidante glutatona; (2) a proteína quinase C é estimulada pela via de ativação do diacilglicerol, e implicada na regulação da permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo e neovascularização, pela ativação do TGF- β ; (3) os AGEs, os quais modificam proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos e conseqüentemente geram radicais livres intracelulares e ativam várias citocinas e fatores de crescimento como IL-1 e TGF- β (VASAVADA; AGARWAL, 2005).

O tratamento com quercetina sugere uma melhora na taxa de filtração glomerular, uma vez que uma de suas propriedades mais importantes é a antioxidante. Os polifenóis atuam na redução da susceptibilidade do LDL a oxidação tanto *in vivo* quanto *in vitro*, bem como na captação ativa de radicais livres. A quercetina atua na quelatação do ferro intracelular inibindo sua participação na formação de EROs. A quercetina ainda é capaz de inibir a atividade de fatores de transcrição envolvidos na produção de lesões inflamatórias nos rins (RODRIGO; BOSCO, 2006).

A dosagem plasmática de uréia também foi realizada como avaliação da função renal. A uréia é o produto final do metabolismo das proteínas, sendo sintetizada no fígado e excretada pelos rins. A uremia é um indicador menos preciso de função renal que a creatinina plasmática, pois a concentração de uréia é mais variável, dependendo da ingestão de proteínas e de mudanças no catabolismo dos tecidos (EATON; POOLER, 2006). Em nosso estudo observamos que os níveis de uréia plasmática nos animais apoE encontraram-se ligeiramente aumentados quando comparados aos animais C57. Esse fato pode indicar um possível dano renal inicial provocado pela hipercolesterolemia. Segundo Wen e cols. (2002) a hiperlipidemia tem sido apontada como fator de risco na progressão de doença renal, contudo o mecanismo pelo qual a hiperlipidemia exerce esse efeito deletério ainda é pouco esclarecido. Nos grupos diabéticos, tivemos um aumento significativo na uréia plasmática em ambos os grupos. Fato já esperado uma vez que no diabetes, bem como em outras condições que levam a doença renal crônica, como acidose e uremia, observamos um aumento no catabolismo protéico com perda de massa corporal. Os pacientes com estas condições têm uma importante perda muscular levando a um balanço negativo de nitrogenados. Em modelos experimentais de diabetes temos uma perda marcante de proteínas da maioria dos órgãos sistêmicos (FRANCH, 2007). O aumento da uréia plasmática no grupo diabético também foi demonstrado por Anjaneyulu e Chopra (2004) em ratos diabéticos.

O tratamento com quercetina não influenciou na dosagem de uréia plasmática. Uma das hipóteses é que o catabolismo de proteínas foi mais intenso do que a capacidade de filtração dos rins, uma vez que nos animais diabéticos observamos que os mesmos não ganharam peso fato que persistiu durante todo o período do

protocolo experimental. Esse aumento no metabolismo, e conseqüentemente, o aumento dos nitrogenados circulantes, seria superior a melhora de função renal que foi indicada pela diminuição da creatinina plasmática, parâmetro com níveis mais constantes.

Outro produto nitrogenado alvo de nosso estudo foi o ácido úrico. O ácido úrico é um ácido diprótico produzido pela xantina oxidase a partir da xantina e hipoxantina as quais por sua vez são produzidas a partir das purinas. O aumento na concentração de ácido úrico plasmático pode ser resultado do aumento na produção, causada pela ingestão de uma dieta rica em purina, desordem genética e pelo aumento na renovação celular (como em doenças mieloproliferativas); ou pela diminuição na eliminação. A diminuição na excreção renal de ácido úrico pode ser conseqüência da diminuição na TFG, aumento na reabsorção tubular induzido pelo aumento no volume urinário, quando em uso de diuréticos, ou pela inibição da secreção tubular renal (TSENG, 2005).

A hiperuricemia ou elevação nos níveis de ácido úrico é um parâmetro bioquímico que vem ganhando crescente importância. Alguns pesquisadores o apontam não apenas como um fator de risco para doenças cardiovasculares, mas por desempenhar um papel no desenvolvimento de doenças renais e metabólicas (FUKUI *et al.*, 2008; OGBERA; AZENABOR, 2010). A hiperuricemia tem sido associada a processos pró-aterogênicos, incluindo aumento do estresse oxidativo, proliferação de células musculares lisas e disfunção endotelial, além de induzir hipertensão glomerular e hipertrofia renal. Também vem sendo correlacionada com o aumento na prevalência de diabetes tipo 2, doenças renais, hipertensão e síndrome metabólica (WASSERMAN *et al.*, 2010). Estudos têm apontado que a hiperuricemia pode estar associada à macroalbuminúria independentemente dos valores de *clearance* de creatinina e pressão arterial. O que sugere que o ácido úrico pode ser um marcador de aumento de permeabilidade glomerular no diabetes tipo 2 com nefropatia detectável (BO *et al.*, 2001). O mecanismo patofisiológico predominante pelo qual o ácido úrico promove disfunção renal envolve a inibição da biodisponibilidade do óxido nítrico endotelial, ativação do sistema renina-angiotensina e ações diretas nas células endoteliais e células musculares lisas (FUKUI *et al.*, 2008).

Em nosso estudo observamos uma elevação na concentração de ácido úrico plasmático em ambos os grupos diabéticos. Estudos apontam que a hiperuricemia pode ser causa de lesão renal, bem como consequência da mesma. A elevação no ácido úrico pode induzir a expressão de renina nas células justaglomerulares, o que leva ao aumento na angiotensina II, potente vasoconstritor, levando a uma disfunção na hemodinâmica renal. O ácido úrico também pode prejudicar a função endotelial devido a inibição da expressão da óxido nítrico sintase na mácula densa e pelo estímulo a produção de citocinas pelos leucócitos e de quimiocinas pelas células musculares lisas. Segundo Sánchez-Lozada e cols. (2002), ratos com hiperuricemia moderada desenvolvem danos renais com o aparecimento de hipertensão glomerular, a qual aparece devido a uma insuficiência na vasoconstrição da arteríola aferente. O tratamento com quercetina não levou a nenhuma alteração nesse parâmetro. Alguns autores demonstraram resultados na diminuição nos níveis de ácido úrico plasmático, como Hu e cols. (2009) que mostraram uma redução nos valores de ácido úrico em ratos com dieta acrescida de frutose (simulando síndrome metabólica), quando tratados com quercetina; e Mo e cols. (2007), que também encontraram uma redução no ácido úrico plasmático em camundongos com hiperuricemia em tratamento com quercetina na dose de 50 e 100 mg/kg. Os referidos estudos utilizaram doses maiores de quercetina, bem como um maior período de tratamento, que possivelmente, deva ser essencial para a observação deste tipo de efeito. Além da utilização de modelos animais diferentes dos utilizados em nosso estudo.

Ainda na análise da função renal avaliamos a excreção de proteínas na urina em 24 horas, um parâmetro importante na avaliação do dano glomerular renal. Observamos em nossos resultados um aumento na excreção de proteínas nos grupos diabéticos, dado já esperado devido ao prejuízo na microcirculação provocado pela hiperglicemia.

A hiperglicemia é um dos fatores cruciais no desenvolvimento da nefropatia diabética, devido aos seus efeitos nas células glomerulares e mesangiais. Estando também associado ao aumento da proliferação e hipertrofia de células mesangiais, aumento na produção de matriz extracelular e espessamento da membrana basal.

Um dos mecanismos pelo qual a hiperglicemia promove os danos tissulares é pela produção de AGEs, estes alteram a estrutura e função de moléculas intra e extracelular, aumentam o estresse oxidativo e modulam a ativação celular, transdução de sinais e a expressão de citocinas e fatores de crescimento. (SCHRIJVERS *et al.*, 2004; DRONAVALLI *et al.*, 2008). O estresse oxidativo pode alterar a estrutura e função dos glomérulos, devido aos efeitos das EROs sobre as células mesangiais e endoteliais. Os glomérulos são mais susceptíveis aos danos oxidativos do que outros segmentos dos néfrons como os túbulos proximais, sendo inicialmente prejudicados (RODRIGO; RIVERA, 2002). Marcadores de estresse oxidativo, bem como quantidades diminuídas de antioxidantes têm sido encontrados, tanto no sangue quanto nos tecidos, em pacientes diabéticos e animais com diabetes experimental, incluindo nos rins (DeRUBERTIS *et al.*, 2004).

Estudos com cultura de células mesangiais apóiam a hipótese de que o aumento na produção de ânions superóxido sinaliza para o aumento na síntese de matriz protéica favorecido pela hiperglicemia e pelo aumento de angiotensina II, fatores extremamente ligados ao dano renal *in vivo* no diabetes (DeRUBERTIS *et al.*, 2004).

O tratamento com quercetina, um antioxidante de origem vegetal, no grupo diabético levou a uma diminuição na excreção de proteínas urinárias, demonstrando um efeito benéfico sob a função renal. Outros trabalhos utilizando substâncias antioxidantes apresentaram resultados positivos sob a função renal, onde destacamos o estudo de Melhem e cols. (2002) com ratos diabéticos tratados com ácido α -lipóico o qual demonstrou prevenção na expansão mesangial nos glomérulos. Já Odetti e cols. (2003) mostraram que o tratamento com N-acetil-cisteína, oxerutina e taurina atenuam os danos renais decorrentes do diabetes em ratos.

Os macrófagos desempenham um papel importante no desenvolvimento de injúria renal, confirmado pelo encontro de células espumosas derivadas de macrófagos nos glomérulos em processo de esclerose e no segmento intersticial renal. Tanto os macrófagos quanto as células mesangiais têm capacidade de oxidar lipoproteínas, sendo uma das vias mais importantes, pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células mesangiais, particularmente, radicais superóxidos. As LDL-oxidadas estimulam a produção de citocinas inflamatórias e levam ao aumento

na apoptose celular, como também podem levar ao aumento na produção de EROs. Estas alterações culminam com o aumento no influxo de macrófagos para a região glomerular, aumento na produção de matriz extracelular, onde podemos destacar a deposição de colágeno e secreção de fibronectina, e perda celular. O LDL-ox também pode levar ao aumento na produção de substâncias vasoativas como endotelina e tromboxano e a liberação exacerbada de renina pelas células justaglomerulares renais (KEANE, 2000).

Esse conjunto de alterações leva ao dano glomerular e, conseqüentemente, ao aumento da proteinúria. O tratamento com quercetina não mostrou alteração nesse parâmetro no grupo aterosclerótico diabético, apesar da redução da glicemia e dos triglicerídeos observada com o tratamento, o colesterol não se alterou, permanecendo bastante elevado o que poderia contribuir ao estímulo da injúria glomerular neste modelo. A correlação entre dislipidemia e dano renal vem sendo alvo de vários estudos, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no prejuízo da função renal.

A pesagem dos rins foi realizada logo após a perfusão dos animais para avaliação de possíveis alterações no tamanho do órgão decorrentes do diabetes. O encontro de aumento no tamanho dos rins já havia sido relatado em estudos utilizando o modelo experimental de diabetes, bem como em humanos com diabetes do tipo 1. A importância clínica deste aumento no volume renal é devido a contribuição na instalação de um quadro de nefropatia sobrecarregando a fase de filtração renal, seja pelo estresse gerado no local ou pela deficiência imposta pelo excesso de tamanho, ou por ambos (HOSTETTER, 2001; CALKIN *et al.*, 2006a).

A hipertrofia renal resulta da hiperplasia e hipertrofia dos néfrons, algumas hipóteses apontam a hipertrofia como fenômeno secundário a uma alteração no controle vascular renal, como o aumento no fluxo plasmático e na pressão nos capilares glomerulares. Sendo desta forma compensatória, com alterações na função tubular com objetivo de prevenir a perda urinária e água e eletrólitos. Outra hipótese sugere que a hipertrofia é consequência da hiperglicemia, que por si induz o aumento na produção de fatores de crescimento e citocinas. (ZERBINI *et al.*, 2006).

A hiperglicemia é uma das responsáveis pela hiperfiltração renal que por sua vez induz o aumento da pressão capilar glomerular. Esta promove a proliferação celular regulada pela libertação do fator de crescimento TGF- α que vai mediar a hipertrofia e divisão celular e mais tarde o processo de fibrose renal, através da estimulação da produção de colágeno e fibronectina. Os produtos glicosilados, resultantes da ligação da glicose a proteínas no rim, também contribuem para a lesão renal, através da estimulação de fatores promotores de fibrose (ANTÃO *et al.*, 2007).

Em nosso estudo observamos o aumento no peso úmido dos rins em ambos os grupos diabéticos. O tratamento com quercetina preveniu o aumento no peso renal, apontando o papel protetor do flavonóide na injúria renal. Como a hiperglicemia está associada ao aumento da proliferação celular e hipertrofia de células mesangiais e espessamento da membrana basal, o efeito hipoglicemiante apresentado pela quercetina pode ter favorecido a redução desses estímulos e a diminuição da expansão dos rins. Os dados corroboram o estudo de Galisteo e cols. (2004) usando ratos hipertensos (DOCA-Sal), os quais apresentaram hipertrofia renal, atenuada pelo tratamento com quercetina em dose semelhante à utilizada em nosso estudo por cinco semanas.

Com relação à avaliação histológica foram feitas as medidas da área do tufo glomerular e a análise da deposição do colágeno nos glomérulos. Houve uma expansão do tufo glomerular nos grupos diabéticos, o que poderia explicar em parte o aumento da massa renal total, observada com a pesagem dos rins. Dentre as alterações provocadas nos rins decorrentes da hiperglicemia podemos destacar inicialmente a hiperfiltração glomerular, seguida de hipertrofia glomerular. A hiperglicemia ativa fatores metabólicos e hemodinâmicos que promovem o dano renal, dentre os fatores hemodinâmicos implicados na patogênese da nefropatia diabética temos o aumento da pressão intraglomerular e ativação de hormônios vasoativos como o sistema renina-angiotensina e endotelinas. Múltiplas vias bioquímicas podem interagir no via metabólica, como a formação dos produtos finais de glicação, e o aumento na expressão do TGF- β . Estes fatores em conjunto contribuem diretamente na expansão da área do tufo glomerular numa segunda fase da evolução do dano renal no diabetes (ICHINOSE, 2007).

Não houve diferença estatística entre os valores encontrados na área do tufo glomerular nos grupos controles apoE e C57. Dado também demonstrado no estudo de Xu e cols. (2006), utilizando grupos C57, apoE e apoE diabéticos tratados com um bloqueador dos receptores de tromboxano A₂. Já no estudo de Wen e cols. (2002) seus resultados demonstraram um aumento na área do tufo glomerular entre os animais C57 e apoE, entretanto, nos grupos analisados os animais utilizados apresentavam 24 e 36 semanas de idade, mais velhos do que os de nosso estudo, provavelmente, nestes animais com o avanço da idade a hipercolesterolemia atuou de maneira importante levando a alteração renal.

Com a indução do diabetes houve um ligeiro aumento na área do tufo glomerular nos animais C57, e um aumento significativo nos animais apoE. O fato da glicemia dos animais apoE se apresentar mais elevada do que nos animais C57 pode ter contribuído para o aumento na hipertrofia glomerular deste grupo, bem como o fato da hipercolesterolemia atuar como fator de risco renal nestes animais. Esse aumento significativo no grupo aterosclerótico e diabético corrobora com os dados do trabalho de Xu e cols. (2006), bem como com o de Lassila e cols. (2004) que comparou vários parâmetros de função renal em grupos de animais C57 e apoE diabéticos. É crescente o número de estudos enfatizando a importância dos lipídeos como fonte importante de modificações químicas das proteínas tissulares, mesmo na ausência de hiperglicemia, levando a produção de produtos avançados de lipoxidação e conseqüentemente à injúria renal.

O tratamento com quercetina não reduziu de maneira significativa o aumento do tufo glomerular. Possivelmente, o tempo do tratamento não foi suficiente para a reversão desse dano ou a dose utilizada não foi adequada para esse fim. O estudo de Kumarappan e Mandal (2008) utilizando um extrato polifenólico de *Ichnocarpus frutescens*, composto de ácidos fenólicos, flavonóides e flavonas, no tratamento de ratos diabéticos, demonstrou um resultado positivo na redução da hipertrofia glomerular nestes animais.

Com relação à avaliação da deposição de colágeno nos glomérulos observamos um aumento na quantidade de matriz extracelular no grupo controle apoE quando comparado ao C57, um indutor de dano renal. Segundo Wen e cols. (2002) a

hiperlipidemia leva ao desenvolvimento progressivo de lesões glomerulares. As alterações morfológicas principais são a infiltração de macrófagos com conseqüente formação de células espumosas, deposição de lipídeos nos capilares glomerulares e deposição lipídica na área justaglomerular. O estudo de Lassila e cols. (2004) demonstrou que os animais apoE apresentavam uma maior quantidade de produtos finais de glicação quando comparados aos animais controle, o que sugere uma via de formação independente da glicemia, e que o aumento dos lipídeos podem favorecer o acúmulo desses produtos.

Com a indução do diabetes observamos um aumento significativo da deposição de colágeno glomerular em ambos os grupos estudados (C57 e apoE). A hiperglicemia leva a expansão mesangial e a progressiva redução da superfície de filtração glomerular. A primeira pode ser difusa ou pode apresentar-se em área marcadas de expansão, como a glomeruloesclerose nodular. O dano nos podócitos também pode estar envolvido no processo de glomeruloesclerose (ZELMANOVITZ, 2009).

Nos animais apoE além da hiperglicemia temos a hipercolesterolemia contribuindo para o aumento na deposição de colágeno nos glomérulos. Segundo Lassila e cols. (2004) os produtos finais de glicação juntamente com os produtos avançados de lipoxidação podem induzir um dano renal pela formação de colágeno na matriz extracelular e na membrana glomerular.

É sabido que na nefropatia diabética, a ativação de neutrófilos e monócitos promovem a geração de espécies reativas de oxigênio, o que leva ao desbalanço entre fatores oxidantes e antioxidantes no organismo. O estresse oxidativo é um componente fundamental na evolução das complicações do diabetes, aumentando a formação e acúmulo de produtos finais de glicação. Estes podem levar a depleção de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase entre outras enzimas antioxidantes, levando ao acúmulo de EROs. Esse excesso de agentes oxidantes culmina com dano renal e alterações decorrentes do acúmulo de EROs (KUMARAPPAN; MANDAL, 2008).

O tratamento com quercetina conseguiu reverter o aumento na deposição de colágeno em ambos os grupos. Parte do efeito pode ser atribuída às propriedades

hipoglicemiantes apresentadas pela droga em estudo e parte pelo seu papel como antioxidante, combatendo desta forma o acúmulo de EROs. Os antioxidantes desempenham papel importante nos processos inflamatórios, pela diminuição da atividade de enzimas inflamatórias e secreção de citocinas. Desta forma efeitos renoprotetores podem ser esperados em patologias renais, como a glomeruloesclerose.

Estudos vêm apontando um papel importante dos flavonóides nas doenças renais, os dados de Ishikawa e Kitamura (2000) demonstraram um papel relevante da quercetina na inibição da apoptose de células glomerulares *in vitro* e *in vivo* em modelo de glomerulonefrite. Os dados de Kahraman e cols. (2003) mostraram o efeito protetor da quercetina em modelo animal de isquemia/reperfusão renal, onde os ratos foram pré-tratados com suspensão de quercetina e submetidos ao procedimento de isquemia e reperfusão renal, os resultados obtiveram uma redução no dano renal oxidativo nos animais previamente tratados.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados podemos concluir que o diabetes acelera o dano renal, evidenciado principalmente pelo aumento da creatinina e uréia plasmáticas, proteinúria e aumento na deposição de colágeno glomerular, e a associação com a hipercolesterolemia potencializa esses danos. O tratamento com a quercetina, antioxidante de origem natural, nestes modelos experimentais pode atenuar os prejuízos na função renal, possivelmente, por seus efeitos hipoglicemiante e antioxidante. Os resultados por nós obtidos indicam que a quercetina poderá ser uma opção terapêutica no tratamento de complicações renais decorrentes do diabetes.



REFERÊNCIAS



7 REFERÊNCIAS

AJAY M., GILANI A.H., MUSTAFA M.R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Science**, 74: 603-612. 2003.

AJAY M., ACHIKE F.I., MUSTAFA A.M., MUSTAFA M.R.. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 73: 1–7. 2006.

ANJANEYULU M., CHOPRA K. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 31: 244–248. 2004.

ANTÃO C.F., GALLEGO R., CALDEIRA J. Complicações renais da diabetes *mellitus*. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, 23: 577-94. 2007.

ARAÚJO P.W.B., QUINTANS J.R.L.J., VASCONCELOS H.D., ALMEIDA J.R.G.S. Flavonóides e hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 12(3): 188-189. 2005.

ARONSON D., RAYFIELD E.J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. **Cardiovascular Diabetology**, 1: 1-10. 2002.

ATKINS R.C., ZIMMET P. Diabetic kidney disease: act now or pay later. **Journal of Nephrology**, 23(1): 1- 4. 2010.

BANSILAL S., FARKOUH M.E., FUSTER V. Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. **American Journal of Cardiology**, 99 (suppl): 6B–14B. 2007.

BECKMAN J.A., CREAGER M.A., LIBBY P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **Journal of the American Medical Association**, 287 (19): 2570-2581. May. 2002.

BEHRENDT D., GANZ P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. **American Journal of Cardiology**, 90(suppl): 40L–48L. 2002.

BISCHOFF S.C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 11: 733–740. 2008.

BLONDE L. Current Antihyperglycemic Treatment Guidelines and Algorithms for Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **The American Journal of Medicine**, 123: S12–S18. 2010.

BO S., CAVALLO-PERIN P., GENTILE L., REPETTI E., PAGANO G. Hypouricemia and hyperuricemia in type 2 diabetes: two different phenotypes. **European Journal of Clinical Investigation**, 31: 318–321. 2001.

BOOTS A.W., HAENEN G.R.M.M., BAST A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, 585: 325-337. 2008.

BOYLE J.P., HONEYCUTT A.A., NARAYAN K.M., HOERGER T.J., GEISS L.S., CHEN H., THOMPSON T.J. Projection of diabetes burden through 2050: Impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. **Diabetes Care**, 24: 1936-1940. 2001.

BREYER M.D., BOTTINGER E., BROSIUS III F.C., COFFMAN T.M., HARRIS R.C., HEILIG C.W., SHARMA K. Mouse models of diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, 16: 27–45. 2005a.

BREYER M.D., BOTTINGER E., BROSIUS III F.C., COFFMAN T.M., FOGO A., HARRIS R.C., HEILIG C.W., SHARMA K. Diabetic Nephropathy: Of Mice and Men. **Advances in Chronic Kidney Disease**, 12(2): 128-145. 2005b.

BROWN W.V. Microvascular complications of diabetes mellitus: renal protection accompanies cardiovascular protection. **American Journal of Cardiology**, 102 (suppl):10L–13L. 2008.

BROWNLEE, M. Banting Lecture 2004. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, 54:1615–1625. 2005.

CALKIN C.A., ALLEN T.J. Diabetes mellitus-associated atherosclerosis: mechanisms involved and potential for pharmacological intervention. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, 6(1): 15-40. 2006.

CALKIN A.C., COOPER M.E., JANDELEIT-DAHM K.A., ALLEN T.J. Gemfibrozil decreases atherosclerosis in experimental diabetes in association with a reduction in oxidative stress and inflammation. **Diabetologia**, 49: 766–774. 2006.

CALKIN A.C., GIUNTI S., JANDELEIT-DAHM K.A., ALLEN T.J., COOPER M.E., THOMAS M.C. PPAR- α and - γ agonists attenuate diabetic kidney disease in the apolipoprotein E knockout mouse. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 21: 2399–2405. 2006a.

CALKIN A.C., GIUNTI S., SHEEHY K.J., CHEW C., BOOLELL V., RAJARAM Y.S., COOPER M.E., JANDELEIT-DAHM K.A. The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein E-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced glycation, oxidative stress and inflammation. **Diabetologia**, 51: 1731–1740. 2008.

CASES A., COLL E. Dyslipidemia and the progression of renal disease in chronic renal failure patients. **Kidney International**, 68(suppl 99): S87–S93. 2005.

CINES D.B., POLLAK E.S., BUCK C.A., LOSCALZO J., ZIMMERMAN G.A., McEVER R.P., POBER J.S., WICK T.M., KONKLE B.A., SCHWARTZ B.S., BARNATHAN E.S., McCRAE K.R., HUG B.A., SCHMIDT A., STERN D.M. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. **Blood**, 91 (10): 3527-3561. 1998.

COOPER M.E. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. **Lancet**, 352: 213–19. 1998.

COOPER S.A., WHALEY-CONNELL A., HABIBI J., WEI Y., LASTRA G., MANRIQUE C., STAS S., SOWERS J.R. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. **American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology**, 293: H2009–H2023. 2007.

COSKUN O., KANTER M., KORKMAZ A., OBTER S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. **Pharmacological Research**, 51: 117–123. 2005.

CUSUMANO A.M., BEDAT M.C.G., Chronic kidney disease in Latin America: time to improve screening and detection. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, 3: 594-600. 2008.

DE BOER, V.C., DIHAL, A.A., VAN DER WOUDE, H., ARTS, I.C., WOLFFRAM, S., ALINK, G.M., RIETJENS, I.M., KEIJER, J., HOLLMAN, P.C. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **Journal of Nutrition**, 135: 1718–1725. 2005.

DeRUBERTIS F.R., CRAVEN P.A., MELHEM M.F., SALAH E.M. Attenuation of renal injury in *db/db* mice overexpressing superoxide dismutase: Evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. **Diabetes**, 53: 762–768. 2004.

DE VRIESE A.S., VERBEUREN T.J., VAN DE VOORDE J., LAMEIRE N.H., VANHOUTTE P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. **British Journal of Pharmacology**, 130: 963-974. 2000.

DING H., HASHEM M., WIEHLER W.B., LAU W., MARTIN J., REID J., TRIGGLE C. Endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse. **British Journal of Pharmacology**, 146: 1110–1118. 2005.

IV DIRETRIZES BRASILEIRAS SOBRE DISLIPIDEMIAS E DIRETRIZ DE PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE DO DEPARTAMENTO DE

ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 88 (suplemento I): 2 – 19. Apr. 2007.

DRONAVALLI S., DUKA I., BAKRIS G.L. The pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Clinical Practice: Endocrinology and Metabolism**, 4(8): 444-452. Aug. 2008.

D'SOUZA A., HUSSAIN M., HOWARTH F.C., NIALL M. WOODS N.M., BIDASEE K., SINGH J. Pathogenesis and pathophysiology of accelerated atherosclerosis in the diabetic heart. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 331: 89–116. 2009.

DZAU V.J., BRAUN-DULLAEUS R.C., SEDDING D.G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, 8(11): 1249-56. Nov. 2002.

EATON D.C., POOLER J.P. **Fisiologia Renal de Vander**. 6^a ed., Porto Alegre: Artmed, 2006.

SHERWIN R.S. Diabetes Melito. In: Cecil R.L. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 22^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. vol.2, p.1659-1692.

Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. Effect of intensive diabetes treatment on carotid artery wall thickness in the epidemiology of diabetes interventions and complications. **Diabetes**, 48(2): 383–390. 1999.

FORBES J.M., YEE L.T.L., THALLAS V., LASSILA M., CANDIDO R., JANDELEIT-DAHM K.A., THOMAS M.C., BURNS W.C., DEEMER E.K., THORPE S.M., COOPER M.E., ALLEN T.J. Advanced Glycation End Product Interventions Reduce Diabetes-Accelerated Atherosclerosis. **Diabetes**, 53:1813–1823. 2004.

FRANCH H.A. Kidney growth during catabolic illness: what it does not destroy makes it grow stronger. **Journal of Renal Nutrition**, 17(3): 167–172. 2007.

FUKUI M., TANAKA M., SHIRAIISHI E., HARUSATO I., HOSODA H., ASANO M., KADONO M., HASEGAWA G., YOSHIKAWA T., NAKAMURA N. Serum uric acid is associated with microalbuminuria and subclinical atherosclerosis in men with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism Clinical and Experimental**, 57: 625–629. 2008.

FUSTER V., MORENO P.R., FAYAD Z.A., CORTI R., BADIMON J.J. Atherothrombosis and high-risk plaque. Part I: Evolving concepts. **Journal of the American College of Cardiology**, 46 (6): 937–54. 2005.

GALISTEO M., GARCÍA-SAURA M.F., JIMÉNEZ R., VILLAR I.C., ZARZUELO A., VARGAS F., DUARTE J. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 259: 91–99. 2004.

GORAYA T.Y., LEIBSON C.L., PALUMBO P.J., WESTON S.A., KILLIAN J.M., PFEIFER E.A., JACOBSEN S.J., FRYE R.L., ROGER V.L. Coronary atherosclerosis in diabetes mellitus: a population-based autopsy study. **Journal of the American College of Cardiology**, 40(5): 946–53. 2002.

GRUNDY S.M., BREWER H.B., CLEEMAN J.I., SMITH S.C., LENFANT C. Definition of Metabolic Syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. **Circulation**, 109: 433-438. 2004.

HAFFNER S.M., LEHTO S., RONNEMAA T., PYORALA K., LAAKSO M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, 339: 229-234. 1998.

HAFFNER S.M. Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. **American Journal of Cardiology**, 92(suppl):18J–26J. 2003.

HAKIM F.A., PFLUEGER A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease. **Medical Science Monitor**, 16(2): RA37-48. 2010.

HOSTETTER T.H. Hypertrophy and hyperfunction of the diabetic kidney. **The Journal of Clinical Investigation**, 107(2): 161-162. 2001.

HU Q.H., WANG C., LI J.M., ZHANG D.M., KONG L.D. Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake: renal organic ion transporter involvement. **American Journal of Physiology and Renal Physiology**. 297(4):F1080-91. 2009.

ISHIKAWA Y., KITAMURA M. Bioflavonoid quercetin inhibits mitosis and apoptosis of glomerular cells *in vitro* and *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 279: 629–634. 2000.

ICHINOSE K., KAWASAKI E., EGUCHI K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. **American Journal of Nephrology**, 27: 554–564. 2007.

IIDA K.T., SUZUKI H., SONE H., SHIMANO H., TOYOSHIMA H., YATOH S., ASANO T., OKUDA Y., YAMADA N. Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase–dependent pathway. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 22(3): 380-386. 2002.

INOKI K, HANEDA M, MAEDA S, KOYA D, KIKKAWA R. TGF- β 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. **Kidney International**, 55: 1704–1712. 1999.

IVEY M.E., OSMANA N., LITTLE P.J. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 199: 237–247. 2008.

JANDELEIT-DAHM K., LASSILA M., DAVIS B.J., CANDIDO R., JOHNSTON C.I., ALLEN T.J., BURRELL L.M., COOPER M.E. Anti-atherosclerotic and renoprotective effects of combined angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibition in diabetic apolipoprotein E-knockout mice. **Journal of Hypertension**, 23: 2071–2082. 2005.

JAWIEN J., NASTALEK P., KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 55 (3): 503-517. 2004.

KAHRAMAN A., ERKASAP N., SERTESER M., KOKEN T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Nephrology**, 16: 219–24. 2003.

KANTER M., ALTAN M.F., DONMEZ S., OCAKCI A., KARTAL M.E. The effects of quercetin on bone minerals, biomechanical behavior, and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochemistry and Function**, 25: 747–752. 2007.

KEANE W.F. The role of lipids in renal disease: Future challenges. **Kidney International**, 57(Suppl. 75): S-27–S-31. 2000.

KIM M., KIM H.K. Anti-diabetic effects of electrolyzed reduced water in streptozotocin-induced and genetic diabetic mice. **Life Sciences**, 79(24): 2288-92. 2006.

KUMARAPPAN C.T., MANDAL S.C. Polyphenolic extract of *Ichnocarpus frutescens* attenuates diabetic complications in streptozotocin-treated diabetic rats. **Renal Failure**, 30: 307–322. 2008.

LASSILA M., SEAH K.K., ALLEN T.J., THALLAS V., THOMAS M.C., CANDIDO R., BURNS W.C., FORBES J.M., CALKIN A.C., COOPER M.E., JANDELEIT-DAHM K.A.M. Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein E-knockout mouse: Role of advanced glycation end products. **Journal of the American Society of Nephrology**, 15: 2125–2138. 2004.

LASSILA M., JANDELEIT-DAHM K.A., SEAH K.K., SMITH C.M., CALKIN A.C., ALLEN T.J., COOPER M.E. Imatinib attenuates diabetic nephropathy in apolipoprotein E-knockout mice. **Journal of American Society of Nephrology**, 16: 363–373. 2005.

LÓPEZ-LÓPEZ G., MORENO L., COGOLLUDO A., GALISTEO M., IBARRA M., DUARTE J., LODI F., TAMARGO J., PEREZ-VIZCAINO F. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. **Molecular Pharmacology**, 65: 851–859. 2004.

LUZ, P.L. Atherosclerose: aspectos atuais. **Atheros**, 4(1): 14-17. 1993.

LUZ P.L., SERRANO J.R.C.V., CHACRA A.P., MONTEIRO H.P., YOSHIDA V.M., FURTADO M., FERREIRA S., GUTIERREZ P., PILEGGI F. The effect of red wine on experimental atherosclerosis: lipid-independent protection. **Experimental and Molecular Pathology**, 65: 150-159. 1999.

MACHHA A., MUSTAFA M.R. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 46: 36-40. 2005.

MARTÍNEZ-FLÓREZ S., GONZÁLEZ-GALLEGO J., CULEBRAS J.M., TUÑÓN M.A.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, 17:271-278. 2002.

MEIGS J.B. Epidemiology of the metabolic syndrome. **The American Journal of Managed Care**, 8: S283-S292. 2002.

MELHEM M.F., CRAVEN P.A., LIACHENKO J., DERUBERTIS F.R. α -Lipoic acid attenuates hyperglycemia and prevents glomerular mesangial matrix expansion in diabetes. **Journal of American Society of Nephrology**, 13:108–116. 2002.

Ministério da Saúde, Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. ELSA Brasil: maior estudo epidemiológico da América Latina. **Revista de Saúde Pública**, 43(1): 1-2. 2009.

MIURA Y., CHIBA T., TOMITA I., KOIZUMI H., MIURA S., UMEGAKI K., HARA Y., IKEDA M., TOMITA T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Nutrition**, 131: 27-32. 2001.

MO S.F., ZHOU F., LV Y.Z., HU Q.H., ZHANG D.M., KONG L.D. Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: Structure–activity relationships. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 30(8): 1551–1556. 2007.

MOGENSEN C.E., POULSEN P.L. Microalbuminuria, glycemic control, and blood pressure predicting outcome in diabetes type 1 and type 2. **Kidney International**, 66 (Suppl 92): S40–S41. 2004.

MORENO P.R., FUSTER V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. **Journal of the American College of Cardiology**, 44 (12): 2293–300. 2004.

MORIKAWA K., MATOBA T., KUBOTA H., HATANAKA M., FUJIKI T., TAKAHASHI S., TAKESHITA A., SHIMOKAWA H. Influence of diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and their combination on EDHF-mediated responses in mice. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 45(5): 485–490. 2005.

NAGHAVI M., LIBBY P., FALK E., CASSCELLS W., LITOVSKY S., RUMBERGER J., BADIMON J.J., STEFANADIS C., MORENO P., PASTERKAMP G., FAYAD Z., STONE P.H., WAXMAN S., RAGGI P., MADJID M., ZARRABI A., BURKE A., YUAN C., FITZGERALD P.J., SISCOVICK D.S., KORTE C.L., AIKAWA M., AIRAKSINEN K.E., ASSMANN G., BECKER C.R., CHESEBRO J.H., FARB A., GALIS Z.S., JACKSON C., JANG I.K., KOENIG W., LODDER R.A., MARCH K., DEMIROVIC J., NAVAB M., PRIORI S.G., REKHTER M.D., BAHR R., GRUNDY S.M., MEHRAN R., COLOMBO A., BOERWINKLE E., BALLANTYNE C., INSULL W. JR., SCHWARTZ R.S., VOGEL R., SERRUYS P.W., HANSSON G.K., FAXON D.P., KAUL S., DREXLER H., GREENLAND P., MULLER J.E., VIRMANI R., RIDKER P.M., ZIPES D.P., SHAH P.K., WILLERSON J.T. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies. Part I. **Circulation**, 108: 1664-1672. 2003.

NIGRO J., OSMAN N., DART A.M., LITTLE P.J. Insulin resistance and atherosclerosis. **Endocrine Reviews**, 27(3): 242–259. 2006.

ODETTI P., PESCE C., TRAVERSO N., MENINI S., MAINERI E.P., COSSO L., VALENTINI S., PATRIARCA S., COTTALASSO D., MARIANARI U., PRONZATO M.A. Comparative trial of N-acetyl-cystein, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. **Diabetes**, 52:499–505. 2003.

OGBERA A.O., AZENABOR A.O. Hyperuricaemia and the metabolic syndrome in type 2 DM. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 2:24. 2010.

PARK L., RAMAN K.G., LEE K.J., LU Y., FERRAN, JR. L.J., CHOW W.S., STERN D., SCHMIDT A.M. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. **Nature Medicine**, 4(9): 1025-1031. 1998.

PETER R., EVANS M.C. Management of diabetes in cardiovascular patients. **Heart**, 94(3): 269-275. 2008.

POORNIMA I.G., PARIKH P., SHANNON R.P. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. **Circulation Research**, 98:596-605. 2006.

RAMALHO A.C.R., LIMA M.L. Insulina e Antidiabéticos Orais. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

REES D.A., ALCOLADO J.C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, 22: 359-370. 2005.

RIVERA L., MORÓN R., SÁNCHEZ M., ZARZUELO A., GALISTEO M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. **Obesity**, 16: 2081–2087. 2008.

RODRIGO R., RIVERA G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. **Free Radical Biology & Medicine**, 33(3): 409–422. 2002.

RODRIGO R., BOSCO C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 142: 317–327. 2006.

ROMERO M., JIMÉNEZ R., HURTADO B., MORENO J.M., RODRÍGUEZ-GÓMEZ I., LÓPEZ-SEPÚLVEDA R., ZARZUELO A., PÉREZ-VIZCAINO F., TAMARGO J., VARGAS F., DUARTE J. Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, 627 242–250. 2010.

ROSA R.S., SCHIMIDT M.I. Diabetes mellitus: magnitude das hospitalizações na rede pública do Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 17(2): 131-4. 2008.

SÁNCHEZ-LOZADA L.G., TAPIA E., AVILA-CASADO C., SOTO V., FRANCO M., SANTAMARÍA J., NAKAGAWA T., RODRÍGUEZ-ITURBE B., JOHNSON R.J., HERRERA-ACOSTA J. Mild hyperuricemia induces glomerular hypertension in normal rats. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, 283: F1105–F1110. 2002.

SARTORELLI D.S., FRANCO L.J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cadernos de Saúde Pública**, 19 (Sup.1): S29-S36. 2003.

SCHENA F.P., GESUALDO L. Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, 16: S30–S33. 2005.

SCHRIJVERS B.F., DE VRIESE A.S., FLYVBJERG A. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. **Endocrine Reviews**, 25: 971–1010. 2004.

SHAFRIR E., RAZ I. Diabetes: mellitus or lipidus?. **Diabetologia**, 46: 433–440. 2003.

SHERWIN R.S. Diabetes Mellito. In: Cecil R.L. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 22ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. vol.2, p.1659-1692.

SNIDERMAN A.D., LAMARCHE B., TILLEY J., SECCOMBE M.D., FROHLICH J. Hypertriglyceridemic hyperapoB in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 25: 579-582. 2002.

STOCLET J.C., CHATAIHNEAU T., NDIAYE M., OAK M., BEDOUI J.E., CHATAIGNEAU M., SCHINI-KERTH V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, 500: 299-313. 2004.

STRATMANN B., TSCHOEPE D. Atherogenesis and atherothrombosis – focus on diabetes mellitus. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 23: 291–303. 2009.

TESCH G.H., NIKOLIC-PATERSON D.J. Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. **Nephron Experimental Nephrology**, 104: e57–e62. 2006.

TSENG C.H. Correlation of uric acid and urinary albumin excretion rate in patients with type 2 diabetes mellitus in Taiwan. **Kidney International**, 68: 796–801. 2005.

The United States Renal Data System. USRDS Annual Data Report. Bethesda, National Institutes of Health. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2006. Disponível em: www.usrds.org/atlas.htm. Acesso em fevereiro 2010.

VASAVADA N., AGARWAL R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. **Advances in Chronic Kidney Disease**, 12 (2): 146-154. 2005.

VESSAL M., HEMMATI M., VASEI M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 135: 357–364. 2003.

VINSON J.A., TEUFEL K., WU N. Red wine, dealcoholized red wine, and specially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, 156: 67-72. 2001.

XU S., JIANG B., MAITLAND K.A., BAYAT H., GU J., NADLER J.L., CORDA S., LAVIELLE G., VERBEUREN T.J., ZUCCOLLO A., COHEN R.A. The thromboxane receptor antagonist S18886 attenuates renal oxidant stress and proteinuria in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. **Diabetes**, 55: 110–119. 2006.

WANG S., GRACE M. MITU G.M., HIRSCHBERG R. Osmotic polyuria: an overlooked mechanism in diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 23: 2167–2172. 2008.

WASSERMAN A., SHNELL M., BOURSI B., GUZNER-GUR H. Prognostic Significance of Serum Uric Acid in Patients Admitted to the Department of Medicine. **The American Journal of the Medical Sciences**, 339 (1):15–21. 2010.

WEI M., ONG L., SMITH M.T., ROSS F.B., SCHMID K., HOEY A.J., BURSTOW D., BROWN L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of chronic complications of human diabetes. **Heart, Lung and Circulation**, 12: 44-50. 2003.

WEN M., SEGERER S., DANTAS M., BROWN P.A., HUDKINS K.L., GOODPASTER T., KIRK E., LEBOEUF R.C., ALPERS C.E. Renal injury in apolipoprotein E-deficient mice. **Laboratory Investigation**, 82: 999–1006. 2002.

WU K.K., HUAN Y. Diabetic atherosclerosis mouse models. **Atherosclerosis**, 191: 241–249. 2007.

YAMAGATA K., ISEKI K., NITTA K., IMAI H., IINO Y., MATSUO S., MAKINO H., HISHIDA A. Chronic kidney disease perspectives in Japan and the importance of urinalysis screening. **Clinical and Experimental Nephrology**, 12:1–8. 2008.

ZELMANOVITZ T., GERCHMAN F., BALTHAZAR A.P.S., THOMAZELLI F.C.S., MATOS J.D., CANANI L.H. Diabetic nephropathy. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 1:10. 2009.

ZERBINI G., BONFANTI R., MESCHI F., BOGNETTI E., PAESANO P.L., GIANOLLI L., QUERQUES M., MAESTRONI A., CALORI G., DEL MASCHIO A., FAZIO F.,

LUZI L., CHIUMELLO G. Persistent renal hypertrophy and faster decline of glomerular filtration rate precede the development of microalbuminuria in type 1 diabetes. **Diabetes**, 55: 2620–2625. 2006.