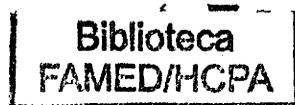


Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica



**Papel da Disfunção do Sistema Nervoso Autônomo
e Diabetes Mellitus por Estreptozotocina sobre a
Excreção Urinária de Albumina e Conteúdo Renal
dos Transportadores de Glicose**

Beatriz D'Agord Schaan

Orientadora: Profa. Dra. Helena Schmid

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Tese de Doutorado

1999

*Ao meu marido Cesar
e meus filhos,
Gabriel e Laura*

Agradecimentos:

À Professora Dra. Helena Schmid, pelo exemplo e orientação incansável desde o início de minha formação como médica endocrinologista e pesquisadora, não esquecendo em especial, os laços afetivos criados desde então;

À Professora Dra. Maria Cláudia Irigoyen, pelos ensinamentos dentro da pesquisa básica, desconhecidos por mim antes desta tese, e sobretudo pela amizade e apoio durante todo o período da realização da mesma, especialmente na fase de coleta de dados;

Aos colegas e funcionários do Laboratório do Departamento de Fisiologia da UFRGS, com especial atenção à contribuição da bióloga Sílvia Lacchini na realização dos procedimentos de desnervação renal e ao auxílio inestimável da boa amiga e técnica Tânia Gatelli Fernandes durante os procedimentos experimentais realizados;

Aos acadêmicos de iniciação científica Celso Maeda e Heberton Timm, pela eficiente contribuição na coleta de dados;

Ao Professor Dr. Ubiratan Fabres Machado (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, USP) pelo seu imprescindível suporte técnico na determinação dos transportadores de glicose no rim;

Ao Engenheiro Elton Ferlin (Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), pela realização das análises de variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial;

Ao Bioquímico Jarbas de Oliveira, pela excelente recepção no laboratório de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por ele chefiado, além do apoio técnico durante as determinações de excreção urinária de albumina;

Aos estatísticos Luciana Bertoldi Nucci e Mário Bernardes Wagner, pela orientação na análise estatística dos dados.

I. Resumo.....	9
II. Summary.....	12
III. Introdução.....	15
1. Diabetes Mellitus e neuropatia em humanos.....	15
1.1. Definição e classificação das neuropatias diabéticas.....	15
1.2. Neuropatia autonômica do Diabetes Mellitus.....	16
2. Diabetes Mellitus e neuropatia em modelos animais.....	17
2.1. Estudos anátomo-patológicos.....	18
2.2. Manifestações clínicas.....	19
3. Estudos funcionais.....	20
4. Achados funcionais e bioquímicos.....	24
4.1. Transmissão noradrenérgica e colinérgica.....	24
4.2. Mecanismos peptidérgicos.....	25
5. Métodos de avaliação da desnervação autonômica.....	26
5.1. Em humanos.....	26
5.1.1. Métodos cardiovasculares não invasivos.....	26
5.1.2. Métodos que avaliam a inervação simpática cardíaca através de radioisótopos.....	33
5.1.3. Outros métodos.....	34
5.2. Em ratos.....	35
5.2.1. Avaliação funcional autonômica.....	35
5.2.2. Métodos que avaliam a inervação simpática cardíaca através de radioisótopos.....	35
5.2.3. Métodos que avaliam a inervação simpática renal.....	36

5.2.4. Outros métodos	37
6. Patogênese das neuropatias diabéticas.....	38
7. Repercussões da desnervação autonômica diabética.....	41
7.1. Sobre o sistema gastrointestinal.....	41
7.2. Sobre a sudorese.....	41
7.3. Sobre a retina.....	41
7.4. Sobre o metabolismo.....	42
7.5. Sobre o sistema a respiratório.....	42
7.6. Sobre a função cardíaca.....	43
7.7. Sobre o sistema gênito-urinário.....	44
7.8. Sobre os rins.....	44
7.8.1. Neuropatia autonômica diabética cardiovascular e nefropatia diabética: achados na associação.....	44
7.8.2. Mecanismos patogênicos da nefropatia diabética: implicações na relação neuropatia autonômica e nefropatia diabética.....	47
7.8.3. Efeitos da inervação sobre a expressão de transportadores de glicose.....	52
IV. Objetivos.....	54
V. Material e Métodos.....	55
1. Animais.....	55
2. Métodos utilizados.....	55
2.1. Avaliação geral e metabólica.....	55
2.1.1. Pesos.....	55
2.1.2. Coleta de urina de 24h.....	56
2.1.3. Determinação da glicose plasmática e urinária.....	56
2.2. Avaliação cardiovascular.....	56

2.2.1. Cateterização de vasos.....	56
2.2.2. Registro controle de pressão arterial e frequência cardíaca.....	57
2.2.3. Bloqueio farmacológico dos sistemas nervoso simpático e parassimpático.....	57
2.2.4. Avaliação dos reflexos comandados pelos pressorreceptores.....	58
2.2.5. Avaliação da reatividade vascular.....	60
2.2.6. Avaliação dos componentes simpático e parassimpático dos reflexos comandados pelos pressorreceptores.....	60
2.2.7. Avaliação da reatividade vascular após bloqueio simpático.....	62
2.2.8. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo.....	62
2.2.9. Avaliação da variabilidade da pressão arterial média.....	63
2.3. Avaliação da carga excretada de albumina.....	68
3. Análise estatística.....	68
VI. Estudo I: Função autonômica e excreção urinária de albumina no rato diabético tratado com insulina:	70
Material e Métodos	71
1. Avaliação geral e metabólica.....	71
2. Avaliação cardiovascular.....	71
3. Avaliação da carga excretada de albumina.....	71
VII: Estudo I: Resultados	72
1. Características gerais e metabólicas dos animais estudados.....	72
2. Respostas autonômicas cardiovasculares nos animais estudados.....	74
2.1. Frequência cardíaca.....	74
2.2. Pressão arterial.....	76
3. Carga excretada de albumina nos animais estudados.....	77

4. Relação entre o grau de controle metabólico e as respostas cardiovasculares.....	78
VIII: Estudo II: Função autonômica e excreção urinária de albumina no rato diabético não tratado com insulina.....	82
Material e Métodos.....	83
1. Avaliação geral e metabólica.....	83
2. Avaliação cardiovascular.....	83
2.1. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência.....	84
3. Avaliação da carga excretada de albumina.....	85
IX: Estudo II: Resultados.....	86
1. Características gerais e metabólicas dos animais estudados.....	86
2. Respostas autonômicas cardiovasculares nos animais estudados.....	89
2.1. Frequência cardíaca.....	89
2.2. Pressão arterial.....	90
2.3. Reflexos comandados pelos pressoreceptores.....	91
2.4. Reatividade vascular.....	93
3. Carga excretada de albumina nos animais estudados.....	96
X: Estudo III: Efeitos da desnervação renal bilateral sobre a excreção urinária de albumina e expressão dos transportadores de glicose no rim de ratos normais e com Diabetes Mellitus.....	98
Material e Métodos.....	99
1. Avaliação geral e metabólica.....	99
2. Desnervação renal.....	99
3. Avaliação da carga excretada de albumina.....	100
4. Avaliação da efetividade da simpatectomia cirúrgica.....	100

5. Retirada dos rins para a determinação dos transportadores de glicose.	102
6. Avaliação dos transportadores de glicose no rim (GLUTs 1 e 2) por "Western Blotting".....	103
6.1. Preparo das amostras.....	103
6.2. "SDS-PAGE".....	103
6.3. "Eletrophoretic transfer".....	104
6.4. "Immunoblotting".....	104
XI: Estudo III: Resultados	107
1. Características gerais e metabólicas dos animais estudados.....	107
2. Carga excretada de albumina nos animais estudados.....	110
3. Níveis dos transportadores de glicose (GLUT 1 e 2) no córtex renal....	111
4. Níveis dos transportadores de glicose (GLUT 1) na medula renal.....	114
5. Relação entre os transportadores de glicose e glicose plasmática, glicose urinária e albuminúria.....	115
XII: Discussão	118
XIII: Conclusões	143
XIV: Referências Bibliográficas	144

Resumo

Foi observado em estudos clínicos que no Diabetes Mellitus de longa duração, a neuropatia autonômica avançada associa-se a uma maior prevalência de retinopatia e nefropatia diabéticas. O rato com Diabetes Mellitus induzido por estreptozotocina, por apresentar microalbuminúria e alterações mesangiais que caracterizam a nefropatia diabética foi considerado por nós um modelo experimental no qual as interações entre os sistemas renal e nervoso autônomo poderiam ser estudadas. Nossa hipótese foi a de que a avaliação da presença e evolução da excreção urinária de albumina e da presença ou não de disautonomia cardiovascular e efeito da desnervação renal neste modelo poderiam caracterizar a existência ou não desta associação. Além disto, tendo em vista que o aumento do conteúdo e metabolismo da glicose intra-celular na célula mesangial representam evento chave na patogênese da nefropatia diabética, existem sugestões na literatura de que alterações nos transportadores de glicose (GLUTs) poderiam estar vinculadas à ela. Os objetivos deste estudo foram: 1) Avaliar a função autonômica no Diabetes experimental em fases iniciais e tardias com e sem tratamento com insulina, estudando as repercussões desta função sobre a excreção urinária de albumina; 2) Estudar os efeitos da desnervação renal sobre a excreção urinária de albumina e expressão dos transportadores de glicose no rim de ratos normais e com Diabetes experimental. Para tanto, no estudo I foi injetada estreptozotocina, 60 mg/kg, pela veia da cauda (grupo D) ou tampão citrato de sódio (grupo ND) em ratos Wistar, o grupo D tendo sido tratado com insulina, e avaliado quanto à presença de neuropatia autonômica cardiovascular 7, 14, 30 e 120 dias após. Nas mesmas datas foram coletadas amostras de urina de 24h e também aos 60 e 90 dias, para medida de diurese, glicose urinária, e determinação da carga excretada

de albumina. No estudo II o Diabetes foi induzido da mesma forma, mas estes animais não receberam insulina; foram avaliados do ponto de vista cardiovascular 45 e 90 dias após a indução, e as mesmas variáveis descritas acima foram determinadas aos 30, 45, 60 e 90 dias de Diabetes. No estudo III foi realizada cirurgia de desnervação renal (DR) ou fictícia em animais tomados diabéticos 30 dias antes e num grupo ND, constituindo-se os grupos D-DR, D, ND-DR e ND. As variáveis descritas nos estudos I e II foram determinadas antes e após 15 dias do procedimento cirúrgico, ocasião em que os animais foram sacrificados para a quantificação dos GLUTs 1 e 2 nos rins. Para confirmar a desnervação, em alguns rins foi realizada a dosagem de norepinefrina. Os resultados do estudo I demonstraram que ratos diabéticos tratados com insulina apresentam, 7 a 120 dias após estreptozotocina, aumento da variabilidade da frequência cardíaca e menor variabilidade da pressão arterial, as quais se relacionam ao grau de descompensação metabólica. Nestas condições, não foram evidenciados déficits autonômicos, porém já observou-se aumento da excreção urinária de albumina no grupo D. Os resultados do estudo II demonstraram que, após 45 a 90 dias de Diabetes experimental, sem tratamento com insulina, havia menor tônus vagal, menor efeito simpático e menor variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, alterações provavelmente secundárias à disfunção do sistema nervoso autônomo determinadas pelo Diabetes. Um aumento da carga excretada de albumina também foi observado no estudo II em relação ao I, provavelmente porque os animais, por terem recebido insulina, estavam em melhores condições metabólicas. O estudo III demonstrou que a desnervação renal determinou aumento da excreção urinária de glicose e da proteína GLUT 1 no córtex renal e diminuição da proteína GLUT 2 na mesma região. O Diabetes determinou aumento das proteínas GLUT 2 e GLUT 1 no córtex renal, a primeira alteração favorecendo

a reabsorção proximal de glicose e a segunda podendo levar a aumento na concentração intra-celular de glicose em células mesangiais. No entanto, a desnervação renal em ratos diabéticos determinou diminuição da proteína GLUT 1 no córtex renal, o qual, se acompanhado de diminuição dos níveis de glicose nas células mesangiais, tenderia a reverter os danos causados pelo Diabetes no glomérulo.

Concluimos que: 1) O Diabetes induzido por estreptozotocina determinou maior carga excretada de albumina logo nos primeiros dias após a indução, o que aumentou durante a evolução; 2) Evidências de disfunção autonômica podem ser observadas com 45 a 90 dias de Diabetes experimental; 3) O tratamento com insulina previne a piora da função autonômica no Diabetes experimental; 4) Embora a desnervação simpática renal e o Diabetes determinem aumento da proteína GLUT 1 no córtex renal, o efeito da desnervação renal no Diabetes é de reduzir a proteína GLUT 1 nesta região, não havendo efeitos da menor estimulação simpática sobre a excreção urinária de albumina. Os resultados sugerem que uma diminuição do tônus simpático renal não determina progressão da disfunção renal no Diabetes experimental.

Summary

In clinical studies, it has been observed that in long-term Diabetes Mellitus there is a relationship between severe diabetic autonomic neuropathy and the presence of retinopathy and nephropathy. Since streptozotocin-diabetic rat develops microalbuminuria and mesangial modifications that characterize diabetic nephropathy, it was considered by us an experimental model in which the interactions between the renal and autonomic nervous systems could be studied. We assumed that by evaluating the existence, the development of urinary albumin excretion and the existence or not of cardiovascular dysautonomia and the effects of renal denervation in this model we could characterize that this association exists or not. Besides, as the increase of the intra-cellular glucose content and its metabolism in mesangial cells are a key event in the pathogenesis of diabetic nephropathy, there are suggestions in the literature that modifications in glucose transporters (GLUTs) could be related to it. The aims of the present study were: 1) To evaluate the autonomic function in experimental Diabetes in early and late stages, with and without treatment with insulin and the consequences of this function on urinary albumin excretion; 2) To evaluate the effects of renal denervation on urinary albumin excretion and content of glucose transporters in the kidneys of normal rats and streptozotocin-diabetic rats. In order to accomplish this, in study I, streptozotocin was injected, 60 mg/kg, through the caudal vein (D group) or citrate buffer (ND group), in Wistar rats, while group D was treated with insulin and evaluated for the presence of cardiovascular autonomic neuropathy 7, 14, 30 and 120 days after. In the same periods, 24h urine samples were collected and also at 60 and 90 days, for measuring diuresis, urinary glucose and urinary albumin excretion. In study II, rats were made diabetic in the same way, but these animals

did not receive insulin; they were evaluated 45 and 90 days after for the presence of cardiovascular autonomic neuropathy, and 24h urine samples were collected for determination of the same variables described above at 30, 45, 60 and 90 days of Diabetes. In study III, renal denervation (RD) or sham surgery was performed in animals made diabetic by streptozotocin 30 days before and in an ND group. As a result, we obtained 4 groups of animals: D-RD, D, ND-RD and ND. The variables described above were collected before and 15 days after the surgical procedure, occasion in which the animals were sacrificed for the determination of GLUTs 1 and 2 in the kidneys. To confirm denervation, the determination of norepinephrine was made in some kidneys. The results of study I showed that diabetic rats treated with insulin present, 7 to 120 days after the injection of streptozotocin, higher heart rate variability and lower arterial pressure variability, which correlate with the degree of metabolic decompensation. In these conditions, no autonomic deficits were identified, but higher urinary albumin excretion in D group can be already observed. The results of study II showed that 45 to 90 days of experimental Diabetes (no treatment with insulin), a lower vagal tone, lower sympathetic effect and lower heart rate variability (evaluated in time domain) can be observed. These modifications are probably related to the diabetic autonomic nervous dysfunction. In study II, when animals were in a worse metabolic condition, because they did not receive insulin, a higher urinary albumin excretion was also observed for the D group. The study III showed that renal denervation determined higher urinary glucose excretion and GLUT 1 protein in renal cortex and lower GLUT 2 protein in the same region. Diabetes determined higher GLUT 2 and 1 protein in the renal cortex, the first alteration could favour proximal tubular resorption of glucose and the second could lead to higher intra-cellular glucose concentration in mesangial cells. However, renal denervation in diabetic rats led to lower GLUT 1 protein in renal cortex, and if this

corresponds to a decreased content of glucose in mesangial cells, the expected effect should be a reversal of the diabetic damage on the glomeruli.

We concluded that: 1) Streptozotocin Diabetes determined higher urinary albumin excretion in the first days after its beginning, which increased during its evolution; 2) Evidence of autonomic dysfunction can be seen with 45 to 90 days of experimental Diabetes; 3) Treatment with insulin prevents the worsening of autonomic function in experimental Diabetes; 4) Although sympathetic renal denervation and Diabetes determine elevations on GLUT 1 protein in renal cortex, the net effect of renal denervation in Diabetes is to lower GLUT 1 protein in this region, and there are no effects of diminished sympathetic stimulation on urinary albumin excretion rate. The results suggest that the reduction in renal sympathetic tone do not determine progression of renal dysfunction in experimental Diabetes.

Introdução

A motivação para a realização deste estudo originou-se de observações clínicas, nas quais descreveu-se que pacientes com Diabetes Mellitus e neuropatia autonômica avançada apresentavam aumento da prevalência de retinopatia e nefropatia diabéticas (Smith e cols., 1981, Krolewski e cols., 1992 e Neumann e Schmid, 1995). Em estudo por nós realizado em pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 2, no entanto, quando as associações foram testadas através de regressão logística multi-variada, somente a retinopatia mostrou estar significativamente associada à disautonomia (Schmid e cols., 1995). Outros autores, no entanto, descreveram, no Diabetes tipo 1, a neuropatia como fator predisponente ou agravante também para a nefropatia (Molgaard e cols., 1992, Sundkvist e cols., 1993 e Spallone e cols., 1994).

Como o rato com Diabetes Mellitus induzido por estreptozotocina apresenta precocemente hiperfiltração glomerular, microalbuminúria e alterações mesangiais que caracterizam a nefropatia diabética (Bertoluci e cols., 1996 e Jensen e cols., 1981), foi por nós considerado um modelo experimental no qual as interações entre os sistemas renal e nervoso autônomo no Diabetes Mellitus poderiam ser melhor definidas. Nossa hipótese foi a de que a avaliação da presença e evolução da neuropatia autonômica e nefropatia diabéticas neste modelo poderiam caracterizar a existência ou não desta associação.

1. Diabetes Mellitus e neuropatia em humanos:

1.1. Definição e classificação das neuropatias diabéticas:

Neuropatia diabética é um termo que representa uma doença, clinicamente evidente ou subclínica, que ocorre em pacientes com Diabetes Mellitus sem outras

causas para neuropatia periférica, incluindo manifestações nas porções somáticas e/ou autonômicas do sistema nervoso periférico (ADA, 1988).

1.2. Neuropatia autonômica do Diabetes Mellitus:

A principal alteração patológica na neuropatia autonômica diabética consiste na perda dos axônios dos nervos mielinizados e não-mielinizados. Os nervos distais são mais afetados do que os proximais, como foi demonstrado em estudos "postmortem" e observações eletrofisiológicas (Chopra e Fannin, 1971 e Kimura e cols., 1979). Esta perda dos axônios é acompanhada pela desmielinização (Tomas e Lascelles, 1966), a qual pode ser primária, com a perda das células de Schwann, ou secundária, como resultado das alterações causadas no calibre axonal (Said e cols., 1983). Estão também descritas alterações nos nódulos de Ranvier nos nervos de indivíduos diabéticos, incluindo edema paranodal e alteração nas junções das células de Schwann aos axônios paranodais, conhecida como disjunção axo-glial (Sima e cols., 1988). Outro achado patológico já bem estabelecido são as alterações dos vasos sanguíneos dos nervos (vasa nervorum). Existe uma relação direta entre a gravidade das anormalidades neuropáticas e o espessamento da membrana basal endoneural (Fagerberg, 1959).

Antes do desenvolvimento de testes diagnósticos mais sofisticados, o diagnóstico e classificação da neuropatia autonômica do Diabetes era baseado na presença de sintomas e sinais característicos. Ainda hoje os mesmos são importantes no diagnóstico da neuropatia autonômica diabética grave, tendo em vista a alta sensibilidade e especificidade da presença de 4 ou mais sintomas característicos (93 e 89%, respectivamente) em relação à presença de neuropatia autonômica diabética diagnosticada por testes cardiovasculares não invasivos (Neumann e Schmid, 1995). Estes sintomas, no entanto, aparecem insidiosamente,

podendo em fases iniciais passar despercebidos se não cuidadosamente investigados (Ewing e Clarke, 1986).

Dentre as manifestações clínicas mais comuns, as que envolvem o sistema cardiovascular são taquicardia de repouso, intolerância ao exercício, arritmias cardíacas e hipotensão postural. Quando o sistema gastro-intestinal é afetado, pode-se observar pirose, disfagia, odinofagia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, diarreia, constipação e incontinência fecal. Os distúrbios gênito-urinários incluem bexiga neurogênica, infecções urinárias de repetição, disfunção sexual masculina (impotência sexual e ejaculação retrógrada) e feminina (diminuição de libido e de lubrificação vaginal). Outras manifestações envolvem anormalidades pupilares (menor diâmetro da pupila em resposta ao escuro e pupila tipo Argyll-Robertson), áreas de anidrose simétrica e sudorese gustatória paradoxal em face e parte superior do tórax em resposta a certos alimentos, e, do ponto de vista metabólico, a ocorrência de hipoglicemias assintomáticas e diminuição da resposta dos hormônios contrarreguladores às hipoglicemias (Vinik e cols., 1992).

2. Diabetes Mellitus e neuropatia em modelos animais:

Tanto o uso de estreptozotocina, como de aloxano são considerados agentes diabetogênicos adequados na indução de Diabetes experimental em ratos, tendo se demonstrado bom modelo experimental no estudo das neuropatias diabéticas (Junod e cols., 1969; Vadlamuti e McNeill, 1983). Em coelhos, da mesma forma, a estreptozotocina mostra-se boa droga tanto na indução do Diabetes, como da neuropatia autonômica (McDowell e cols., 1994). Mais recentemente, Diabetes espontâneo no rato Wistar "Bio Breeding" (BB) também passou a ser utilizado como modelo experimental de Diabetes Mellitus e suas complicações (Sima, 1983).

2.1. Estudos anátomo-patológicos:

Nawar e cols., em 1975 e Monckton e Pehovich, em 1980, foram os primeiros autores a relatar alterações degenerativas de nervos autonômicos em ratos Wistar com Diabetes Mellitus por estreptozotocina do ponto de vista histopatológico. Os primeiros as observaram em fibras nervosas aferentes das adrenais, associadas à cromatólise de células cromafins, achados similares aos encontrados em outras neuropatias autonômicas. Já em 1980 foi estudada a cadeia paravertebral simpática e as alterações degenerativas foram detectadas a partir de 24h do uso de estreptozotocina. Avaliação tardia (3 dias e 6 semanas) detectou ciclos de degeneração e regeneração do tecido axonal e redução do calibre axonal; o autor não descarta efeito tóxico da estreptozotocina como causa das alterações precoces.

Por outro lado, Schmidt e Sharp, em 1982 não observaram evidências histológicas de neuropatia em nervos mesentéricos no mesmo modelo experimental 3.5 meses após o uso de estreptozotocina, mas as detectaram aos 6, 9 e 12 meses de Diabetes. Estas diferenças podem se dever a diferentes raças de animais ou dose de estreptozotocina usada, assim como à possibilidade de que as alterações observadas por Monckton e Pehovich fossem transitórias.

As lesões descritas nos nervos aumentam em número com a progressão do Diabetes e caracterizam-se por distrofia axonal (axônios dilatados e desmielinizados com padrão focal contendo grande número de organelas subcelulares normais e anormais), alteração morfológica distinta que reflete regeneração neuronal aberrante ou frustra (Schmidt e Sharp, 1982). Elas ocorrem no Diabetes induzido por estreptozotocina e no Diabetes espontâneo (rato BB), tanto em nervos simpáticos, como parassimpáticos (Yagihashi e Sima, 1985 e 1986).

As lesões descritas são observadas em nervos mesentéricos e gânglios mesentéricos superiores (Schmidt e cols., 1983), pâncreas (Tominaga e cols., 1987), corpos cavernosos do pênis (Felten e cols., 1983), fibras pré-gangliônicas simpáticas (Kniel e cols., 1986), plexo mioentérico do íleo e cólon (Lincoln e cols., 1984) e coróide (Gartner e Fischer 1989). Baço, bexiga, vas deferens, íris, nervo vago, nervo frênico e nervo ciático não apresentaram alterações 4 a 12 meses após o uso de estreptozotocina segundo Schmidt e Plurad, em 1986, assim como a inervação noradrenérgica cardíaca 1 a 13 meses após (Felten e cols., 1982). É possível que cada tecido alvo responda de maneira individual específica e em tempos diferentes ao estado diabético.

Yagihashi, em 1985 e 1986, estudando ratos BB (Diabetes Mellitus espontâneo) demonstraram alterações distróficas em fibras simpáticas (gânglios para-vertebrais simpáticos) e parassimpáticas (nervos vago, mioentéricos do cólon e peniano), ao contrário de Schmidt e Plurad em 1986, que não observou alterações no estudo histo-patológico do nervo vago em ratos diabéticos por estreptozotocina.

2.2. Manifestações clínicas:

Diarréia é observada em ratos tornados diabéticos por estreptozotocina após 4 a 5 meses da injeção da droga, e não agudamente. Animais não diabéticos que foram submetidos à simpatectomia química pelo uso de 6-hidroxiopamina apresentam o mesmo quadro 3 dias após. O tratamento com clonidina reduz o número e quantidade das evacuações, o que sugere que a causa da diarréia seja a perda da inervação noradrenérgica dos enterócitos nestes modelos (Chang e cols., 1985). Outras manifestações incluem dilatação colônica e retenção urinária, observadas em ratos com Diabetes Mellitus por estreptozotocina e em ratos BB, com Diabetes Mellitus espontâneo (Yagihashi e Sima, 1985).

3. Estudos funcionais:

Disfunção autonômica secundária ao Diabetes Mellitus tem sido demonstrada em animais em ductos deferentes (Tomlinson e cols., 1982), bexiga (Kolta e cols., 1985), sistema gastro-intestinal (Chang e cols., 1985) e sistema cardiovascular (Chang e Lund, 1986).

As anormalidades do sistema cardiovascular neste modelo experimental são divergentes em alguns aspectos. Explicações para tanto podem residir em diferenças no agente diabetogênico utilizado, no método de avaliação cardiovascular, no tempo de Diabetes quando da avaliação, na idade dos animais quando induzido o estado diabético, e na intensidade do descontrole metabólico, o que inclui uso ou não de insulina.

O achado mais freqüentemente encontrado em relação à freqüência cardíaca de repouso no curso do Diabetes, é de bradicardia, precocemente (5, 15 e 30 dias após a injeção de estreptozotocina) (Maeda e cols., 1995b e Dall'Ago e cols., 1997a e b) ou tardiamente (5 a 48 semanas após a injeção de estreptozotocina) (Jackson e Carrier, 1983 e Chang e Lund, 1986). Van Buren e cols., no entanto, observaram bradicardia desde os primeiros dias após a indução do Diabetes, mas esta se manteve somente até 40 semanas de evolução, quando então a freqüência cardíaca dos animais diabéticos igualou-se a dos não diabéticos, provavelmente porque estes passaram a apresentar esta alteração em decorrência do envelhecimento (Van Buren e cols., 1998b). Os autores sugerem que a bradicardia resulte de maior sensibilidade à acetilcolina, diminuição de receptores adrenérgicos cardíacos, disfunção do nódulo sino-atrial, menor estímulo simpático ou maior atividade vagal. No entanto, a medida de tônus e efeito vagais, realizada no estudo de Maeda e cols., constatou que ambos estão diminuídos (Maeda e cols., 1995b). Além disto, Dall'Ago sugere disfunção parassimpática, já

que a frequência cardíaca aumenta em resposta ao estímulo elétrico vagal e injeções de doses crescentes de metacolina (Dall'Ago e cols., 1997b). O fato de haver reversão da bradicardia induzida pelo Diabetes experimental com o uso de insulina e não com o uso de Org 2766, análogo do ACTH que pode ter efeitos neurotróficos e neuroprotetores neste modelo experimental, sugere que ela se deva a alterações metabólicas induzidas pelo Diabetes e não a fatores neurogênicos (Chang e Lund, 1986 e Van Buren e cols., 1998b).

A frequência cardíaca intrínseca avaliada pela medida de frequência cardíaca após bloqueio ganglionar com pentolínio também apresentou-se diminuída no Diabetes por estreptozotocina (Hebden e cols., 1987), assim como quando foi avaliada através de duplo bloqueio farmacológico com propranolol e atropina (Maeda e cols., 1995b). Estes achados podem se dever a alterações na função de marca-passo do nódulo sino-atrial.

Quanto à pressão arterial sistêmica, encontra-se diminuída após 5 dias e 18 semanas de Diabetes experimental quando avaliada por medida intra-arterial, o que poderia se dever à hipovolemia secundária à diurese osmótica, não descartando menor atividade parassimpática ocasionando vasodilatação e menor resistência vascular periférica (Maeda e cols., 1995a, Dall'Ago e cols., 1997 a e b, Jackson e Carrier, 1983, Van Buren e cols., 1998a). A possibilidade da hipotensão se dever à desnutrição que estes animais invariavelmente apresentam é descartada frente ao achado de pressão arterial média normal nos ratos desnutridos utilizados como controles por Chang e Lund (1986). Por outro lado, a pressão arterial foi semelhante entre ratos diabéticos e não diabéticos 48 semanas após o uso de estreptozotocina e quando os animais foram tratados com insulina (Chang e Lund, 1986).

A possibilidade de que a estreptozotocina induza hipertensão arterial é levantada por alguns autores; o achado, no entanto, foi considerado um erro decorrente da técnica porque sua medida foi realizada indiretamente (restrição do animal, ocasionando stress e edema da cauda na colocação do manguito para a medida de pressão arterial). As medidas intra-arteriais demonstram invariavelmente que o estado diabético induz diminuição da pressão arterial (Kusaka e cols., 1987, Dall' Ago e cols., 1997a e Van Buren e cols., 1998a).

A sensibilidade do baroreflexo é uma excelente medida de função autonômica. Este reflexo pode ser ativado pelo estímulo mecânico dos corpos carotídeos, manobra de Valsalva, mudanças posturais e injeção de drogas, os quais induzem modificações de pressão arterial que devem ocasionar modificações da frequência cardíaca (Ferrer e cols., 1991). Jackson e Carrier, em 1983, injetando estreptozotocina em ratos com 42 dias de vida e avaliando-os conscientes 4 a 5 semanas após, demonstraram menor resposta a agentes pressores e aumento da sensibilidade barorreflexa, esta uma resposta esperada à baixa pressão arterial de repouso. No mesmo modelo experimental, outro autor observou hipersensibilidade do baroreflexo inicial (12 semanas), que se manteve até as 24 semanas e seguiu-se de hiposensibilidade do mesmo, que o autor atribuiu a dano autonômico. No entanto, os animais não diabéticos desnutridos apresentaram tendência à hipersensibilidade barorreflexa, o que pode sugerir que esta alteração se deva, no grupo diabético, à desnutrição e não ao estado diabético. O tratamento com insulina corrigiu as alterações hemodinâmicas e de sensibilidade do baroreflexo observadas nos animais não tratados (Chang e Lund, 1986). Estimulando eletricamente o nervo vago e simpático cervical em ratos anestesiados, com Diabetes por estreptozotocina de 4 a 12 semanas de duração, foi observada também hipersensibilidade barorreflexa por Homma e cols., em 1993. Maior

sensibilidade do baroreflexo em ratos diabéticos significa que o aumento (ou diminuição) da pressão arterial é marcadamente compensado por maior queda (ou aumento) da frequência cardíaca. Estas alterações podem decorrer de: 1) Hipersensibilidade do nó sino-atrial ao estímulo elétrico vagal e simpático ou a agentes colinérgicos e adrenérgicos; 2) O nervo vago e nervos simpáticos de ratos diabéticos liberariam no coração maior quantidade de neurotransmissores sob condições normais e sob estímulo; 3) Menor inotropismo por enrijecimento miocárdico ocasionado pelo Diabetes (Homma e cols., 1993).

No entanto, estudos realizados após 5, 15 e 30 dias da injeção de estreptozotocina demonstraram diminuição das respostas bradi e taquicárdica às injeções de nitroprussiato de sódio e/ou fenilefrina, o que está em desacordo com o encontrado pelos autores citados acima (Dall'Ago e cols., 1997a e 1997b e Maeda e cols., 1995a).

Como diversas das alterações encontradas nestes estudos são muito precoces no curso do Diabetes, poderiam ser funcionais, e até transitórias, relacionadas ao mau controle metabólico, desidratação e/ou desnutrição que estes animais apresentam nesta fase, tendo em vista o exíguo tempo para que ocorra lesão nervosa definitiva neste período (Chang e Lund, 1986).

Se as alterações cardiovasculares descritas se devem a anormalidades cardíacas e vasculares não relacionadas a defeitos neurais ou à neuropatia autonômica do Diabetes ainda não se sabe. Por este motivo, Van Buren e cols. analisaram os baroreflexos e resposta pressora e depressora no rato com Diabetes por estreptozotocina tratado ou não com Org 2766. Os achados de que esta droga restaura a resposta bradicárdica baroreflexo-mediada no Diabetes experimental com 6 semanas de duração, melhora a mesma com 12 semanas e não tem efeito

após 18 semanas, sugerem que ela se deva a efeito neuro-protetor da droga (Van Buren e cols., 1998a).

As primeiras alterações funcionais em nervos relacionadas ao Diabetes experimental foram detectadas em nervos somáticos em 1964 por Eliasson, que observou menor velocidade de condução nervosa em nervos periféricos de ratos com Diabetes por estreptozotocina, a qual foi relacionada a alterações estruturais por Jakobsen, em 1979. Quando medida a velocidade de condução nervosa sensorial e motora em nervos tibial e ciático neste mesmo modelo experimental, foi observada diminuição após 10 semanas do uso de estreptozotocina (Bravenboer e cols., 1992), alterações que também foram descritas em ratos BB (Diabetes espontâneo) (Sima e cols., 1981).

4. Achados funcionais e bioquímicos:

4.1. Transmissão noradrenérgica e colinérgica:

Alterações anátomo-patológicas em nervos autonômicos de ratos apresentam-se relativamente localizadas e ocorrem tardiamente no curso da doença. Alterações bioquímicas são mais difusas e precoces. Redução na atividade da enzima dopamina-beta-hidroxilase em gânglios cervicais superiores e aumento dos níveis de sorbitol em gânglios cervicais superiores, mesentéricos e celíacos associado à redução de mio-inositol nos gânglios cervicais superiores foram descritos (Schmidt e Plurad 1986, Schmidt e cols., 1989 e Greene e Mackay, 1986).

Os níveis de noradrenalina e dopamina no plasma e em vários tecidos estão relacionados à gravidade, duração e controle metabólico do Diabetes Mellitus. Entre 11 e 16 semanas após a injeção de estreptozotocina estes níveis estão elevados no plasma, artéria renal, veia cava, aorta, coração e rim (Fushimi e cols., 1982, Head e Berkowitz, 1979). O uso de insulina determina diminuição das catecolaminas teciduais (adrenal, coração, pele e rins) a valores normais (Fushimi e

cols., 1984 e Ganguly e cols., 1987), assim como o tempo mais prolongado de Diabetes, já que após 4 a 5 meses da injeção de estreptozotocina, os níveis de norepinefrina estão diminuídos na mucosa ileal e jejunal (Chang e cols., 1985),

O fato de estudos com histo-fluorescência demonstrarem uma maior densidade de nervos noradrenérgicos no coração de ratos diabéticos sugere que o aumento de noradrenalina tecidual observado origine-se de estoques intraneuronais (Felten e cols., 1982). Uma explicação para os aumentos de noradrenalina tecidual e plasmática encontrados no Diabetes experimental em fases iniciais é a liberação da mesma por degeneração neuronal precoce. No entanto, maior atividade simpática em resposta ao stress causado pelo Diabetes per se, pelo aumento da glicose plasmática ou pela desnutrição que estes animais desenvolvem não podem ser excluídos (Felten e cols., 1982), assim como alterações no "turnover", captação, síntese e liberação de noradrenalina (Ganguly e cols., 1987). Estes achados sugerem que o Diabetes induzido por estreptozotocina sem tratamento com insulina acompanha-se de maior atividade simpática, pelo menos em suas fases iniciais.

4.2. Mecanismos peptidérgicos:

Além das alterações bioquímicas e funcionais relacionadas a nervos noradrenérgicos e colinérgicos, também modificações em neuropeptídeos podem ser induzidas pela estreptozotocina em ratos. Foram relatados aumento no transporte de substância P e somatostatina no nervo vago (MacLean, 1987), aumentos teciduais de peptídeo vasoativo intestinal no cólon e estômago (Belai e cols., 1988) e resultados diversos em relação ao neuropeptídeo Y (de acordo com o tecido estudado) (Crowe e cols., 1987).

Recentemente, foi observado que a produção de fator de crescimento do nervo pode estar diminuída no Diabetes experimental, porque foi constatada

redução de seu conteúdo em alguns tecidos inervados por fibras simpáticas (glândulas salivares e ventrículos cardíacos) poucas semanas após o uso de estreptozotocina. Em uma fase mais tardia do Diabetes, nervo ciático e gânglio cervical superior apresentaram aumento do conteúdo de fator de crescimento do nervo (Hellweg e Hartung, 1990). Recentemente, estudando ratos diabéticos por estreptozotocina a mais longo prazo (6 e 9 meses), Schmid e cols. (1999) demonstraram redução de 52 e 82% no conteúdo de fator de crescimento do nervo proteína nos segmentos proximais e distais do miocárdio, respectivamente, o que associou-se a padrão característico de desnervação cardíaca (maior distalmente), quando da avaliação da inervação simpática com mapeamento por ^{11}C -hidroxiefedrina. Os autores sugerem que as flutuações regionais de fator de crescimento do nervo no miocárdio diabético contribuem para uma desnervação simpática cardíaca heterogênea característica do Diabetes Mellitus.

5. Métodos de avaliação da desnervação autonômica:

5.1. Em humanos:

5.1.1. Métodos cardiovasculares não invasivos:

- Testes clássicos propostos por Ewing:

Inicialmente desenvolvidos por Ewing e cols. e descritos em 1973, 5 testes não invasivos baseados nos reflexos cardiovasculares foram propostos pelos mesmos autores como forma de diagnóstico e seguimento da neuropatia autonômica diabética (Ewing e cols., 1973). Os autores demonstraram que a presença de anormalidades nos reflexos cardiovasculares espelhava dano de todo o sistema nervoso autônomo, tendo em vista a correlação entre os testes propostos e a presença de disfunção autonômica em outros órgãos, tais como sistema gastrointestinal (Campbell e cols., 1977) pupila, etc. (Martyn e Ewing, 1986). Além disto,

os testes apresentam valor prognóstico, já que a presença de sintomas associada a testes cardiovasculares alterados foi preditiva de taxa elevada de mortalidade (56%) em 5 anos (Ewing e cols., 1980).

Os 5 testes cardiovasculares não-invasivos propostos por Ewing são a resposta da frequência cardíaca às manobras de Valsalva, levantar e respiração profunda e a resposta da pressão arterial ao ortostatismo e contração isométrica sustentada (Ewing e Clarke, 1982). A manobra de Valsalva nada mais é do que uma forma conveniente e não invasiva de avaliar a sensibilidade do baroreflexo, já que resulta em diminuição e posterior aumento na pressão arterial, modificações que, em indivíduos normais, são seguidas respectivamente por aumento e diminuição da frequência cardíaca (Ferrer e cols., 1991). Inicialmente os testes foram categorizados de acordo com estarem avaliando o sistema parassimpático (alteração de testes de frequência cardíaca) ou simpático (alteração de testes de frequência cardíaca e pressão arterial), mas esta abordagem não é correta, já que todos os testes envolvem ambos os 2 tipos de fibras nervosas, simpáticas e parassimpáticas, em maior ou menor extensão. Os autores então propuseram classificar a neuropatia autonômica diabética de acordo com o número de testes alterados em ausente, leve, moderada e grave, o que foi e ainda é largamente utilizado (Ewing e cols., 1985).

Já na época em que foram descritos, observou-se que este tipo de avaliação poderia não diagnosticar tão precocemente a neuropatia autonômica diabética, já que alguns pacientes com sintomas sabidamente causados por ela apresentavam testes normais (Ewing e cols., 1980). No entanto, os testes propostos por Ewing ainda hoje são em geral a primeira escolha na investigação da disfunção autonômica do Diabetes Mellitus, já que foram padronizados e existem

vários estudos a longo prazo demonstrando seu valor prognóstico, o que não ocorre em relação às novas alternativas diagnósticas (Spallone e Menzinger, 1997).

- Métodos que avaliam o ritmo circadiano da frequência cardíaca e pressão arterial:

Na tentativa de obter teste de função autonômica mais sensível, e que avaliasse as respostas do sistema nervoso autônomo a estímulos fisiológicos, Ewing e cols., em 1983 e 1984, descreveram novo método utilizando monitorização eletrocardiográfica de 24h. Pacientes com Diabetes Mellitus com neuropatia autonômica apresentaram perda progressiva do padrão da frequência cardíaca de 24h normal, seguindo a piora do quadro autonômico, com perda da variação da frequência cardíaca diurna normal, maior frequência cardíaca ao acordar e durante o sono. Além disto, cerca de 50% dos pacientes com testes clássicos inalterados demonstraram ritmo circadiano da frequência cardíaca alterado, o que sugere que este teste é mais sensível na detecção de dano parassimpático precoce.

Da mesma forma, estudo de 1993 demonstrou modificação do ritmo circadiano diurno/noturno de pressão arterial em diabéticos neuropatas (menor descenso noturno da pressão arterial), o que associou-se à predominância simpática noturna que ocorria nestes pacientes (Spallone e cols., 1993b). Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado na cidade de São Paulo (Monteagudo e cols., 1996). A associação deste padrão de pressão arterial avaliada em 24h com a presença de graus mais elevados de excreção urinária de albumina levou ao questionamento quanto àquela alteração se dever à neuropatia autonômica diabética ou ao quadro clínico de nefropatia diabética incipiente. Utilizando análise de regressão logística, Spallone e cols., em 1993, observaram relação de padrão anormal de pressão arterial noturna somente com alteração dos testes autonômicos clássicos, o que sugere que a alteração de ritmo circadiano de

pressão arterial se deva à neuropatia autonômica diabética, o que poderia sugerir que a neuropatia autonômica diabética tenha influência patogênica sobre o desenvolvimento e/ou progressão da nefropatia diabética (Spallone e cols., 1993a).

- Métodos que avaliam a variabilidade da frequência cardíaca:

Quando analisamos detidamente o eletrocardiograma de um indivíduo normal, observamos que existem flutuações da frequência cardíaca de batimento a batimento, o que pode ser facilmente evidenciado medindo os intervalos R-R. Estas variações são resultados da ação do sistema nervoso autônomo sobre o nó sinusal, modulando a frequência por estímulo vagal ou simpático, os quais se apresentam como componentes distintos.

A variabilidade da frequência cardíaca, isto é, a quantidade de flutuações da frequência cardíaca em relação à frequência cardíaca média, pode ser utilizada para avaliar as funções simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo. As medidas de variabilidade da frequência cardíaca são fáceis de serem realizadas, não-invasivas e têm boa reprodutibilidade. São elas: cálculo de índices baseados em operações estatísticas sobre os intervalos R-R (análise no domínio do tempo) ou análise espectral de uma série de intervalos R-R (análise no domínio da frequência). Estas análises podem ser feitas em eletrocardiogramas habituais ou registros de 24h, a partir da detecção dos intervalos R-R normais, ou seja, todos os intervalos entre complexos QRS adjacentes que resultam de despolarizações do nó sinusal (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996).

Da análise no domínio do tempo pode-se obter os índices: média dos intervalos R-R normais (RRMED), desvio padrão de todos os intervalos R-R normais (SDNN), média dos desvios padrão dos intervalos R-R normais calculados em segmentos de 5 minutos nas 24 horas do dia (SDNNI), desvio padrão das

médias dos intervalos R-R normais calculadas em segmentos de 5 minutos nas 24 horas do dia (SDANNI), raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos R-R normais adjacentes nas 24 horas do dia (RMSSD), porcentagem das diferenças entre intervalos R-R normais adjacentes que excedem a 50 milissegundos (PNN50) (Malliani e cols., 1991).

A análise espectral da frequência cardíaca permite, diversamente dos índices anteriores, estudar as oscilações da frequência cardíaca no domínio da frequência, de forma que não apenas a quantidade de variação, mas a frequência destas oscilações pode ser obtida. A partir de um eletrocardiograma de 24h e conversão analógico-digital, um programa de computador reconhece as ondas R e os intervalos R-R e os insere num tacograma, a partir do qual é calculado o espectro da variabilidade dos intervalos R-R com algoritmo de transformação de Fourier, provendo avaliação quantitativa do número, frequência e poder (isto é, área) de cada componente espectral. Existem 2 principais componentes espectrais, o de baixa frequência (oscilações na faixa de 0,05 e 0,15 Hz), que depende basicamente de impulsos simpáticos, e o de alta frequência (oscilações na faixa de 0,15 a 0,35 Hz), este considerado marcador de atividade vagal. É mais apropriado, no entanto, considerar a relação entre estes índices em termos de balanço simpato-vagal do que avaliá-los separadamente (Van Ravenswaaij-Arts e cols., 1993).

A maioria dos índices de domínio do tempo e da frequência correlacionam-se muito bem com o tônus cardíaco vagal medido farmacologicamente (após o uso de atropina e de propranolol), o que indica que eles provêm medida acurada do tônus vagal cardíaco em repouso (Hayano e cols., 1991).

Em diabéticos, estudos comparando os testes clássicos de Ewing com índices de variabilidade da frequência cardíaca demonstraram que estes podem se

alterar mais precocemente que aqueles (Malpas e Maling, 1990). A análise espectral da frequência cardíaca também é método sensível, e permite melhor discriminação das influências vagais e simpáticas do que a análise no domínio do tempo. A comparação da análise espectral da frequência cardíaca com os testes propostos por Ewing demonstrou forte correlação entre eles, com a vantagem daquele não exigir a colaboração do paciente e ser um estudo único. Na neuropatia autonômica diabética grave desaparecem todos os componentes em decúbito, enquanto que quando ela é moderada há apenas diminuição destes componentes (Bellavere e cols., 1992).

A análise espectral da frequência cardíaca tem maior capacidade para diferenciar modulação vagal e simpática da frequência cardíaca, no entanto os índices de domínio do tempo são mais facilmente calculados e mais disponíveis na prática. Além disto, a especificidade da análise espectral não é completa, tendo em vista que a "desnervação" sinusal cardíaca farmacológica ou cirúrgica não abole completamente os componentes de baixa e alta frequência (Mancia e cols., 1997). Ambos os métodos não foram suficientemente padronizados e não foram avaliados quanto a seu valor prognóstico, o que lhes traz desvantagem em relação aos testes clássicos propostos por Ewing, apesar de sabidamente estarem mais precocemente alterados do que estes (Spallone & Menzinger 1997).

Mais recentemente, o uso da servopletismomanometria (Finapres) permitiu avaliar, de forma não invasiva, respostas da frequência cardíaca às manobras de Valsalva, contração isométrica sustentada e mudanças posturais (Netten e cols., 1992).

Outro método para avaliar variabilidade de frequência cardíaca é a análise de mapas de retorno bi-dimensionais, que é feita visualmente (Woo e cols., 1992); em nosso meio recentemente foi desenvolvido método com o objetivo de quantificar

os resultados obtidos com os mapas de retorno bi-dimensionais, através de sua modificação, o que originou o mapa de retorno tri-dimensional. Os índices obtidos com a quantificação do mapa de retorno tri-dimensional foram diferentes entre diabéticos com e sem neuropatia autonômica diabética, assim como observou-se correlação positiva ($r = 0.72$) entre eles e os índices no domínio do tempo (Moraes e cols., 1993).

- Métodos que avaliam a variabilidade da pressão arterial:

Assim como a frequência cardíaca, também a pressão arterial apresenta flutuações em relação à média, as quais são importante fonte de informação quanto aos mecanismos de regulação cardiovascular. No entanto, a regulação da frequência cardíaca é controlada basicamente pelo sistema nervoso autônomo, enquanto que a regulação da pressão arterial depende também de uma série de outros fatores (sistema renina-angiotensina, óxido nítrico, respiração, função cardíaca e volume de sangue circulante) (Japundzic Zigon, 1998).

A variabilidade da pressão arterial tem sido avaliada através do cálculo da média dos desvios padrões da pressão arterial sistólica, diastólica e média obtidas da análise batimento a batimento de medidas de pressão arterial de 24h intra-arterial, método que tem suas limitações (Mancia e Zanchetti, 1986).

Análise espectral da pressão arterial, obtida de registros de 24h é método não invasivo na avaliação da variabilidade da pressão arterial, mas não completamente estabelecido como índice autonômico (Parati e cols., 1995).

O uso da servopletismomanometria (Finapres) também permite avaliar, de forma não invasiva, respostas da pressão arterial a manobras que alteram seu controle. Em pequeno grupo de diabéticos em que foi utilizada, apresentou-se menos sensível do que os parâmetros de frequência cardíaca no diagnóstico de disfunção autonômica (Netten e cols., 1992).

5.1.2. Métodos que avaliam a inervação simpática cardíaca através de radioisótopos:

Análogos radiomarcados da norepinefrina, que são retidos pelos terminais nervosos simpáticos do coração permitem o mapeamento da integridade simpática cardíaca (Glowniak, 1995).

A meta-iodo-benzil-guanidina, quando marcada com ^{123}I (^{123}I MIBG), permite a detecção de nervos simpáticos que captam esta substância, o que ocorre em órgãos ricamente inervados, tais como o coração. Sua utilização no estudo da inervação simpática cardíaca baseia-se no fato de que, após a fase de captação, seu efluxo do tecido extra-neuronal é maior do que o do tecido neuronal (Glowniak, 1995). Redução da captação miocárdica de ^{123}I MIBG em diabéticos com testes cardiovasculares clássicos alterados e também com resultados alterados de análise espectral da frequência cardíaca foi observada por alguns autores, além de constatação de que alguns diabéticos com testes normais podem ter alteração na captação daquele radioisótopo. Estes resultados sugerem que a cintilografia miocárdica com ^{123}I MIBG é método não invasivo útil no estudo da disfunção simpática cardíaca e provavelmente mais sensível do que os métodos clássicos de diagnóstico da neuropatia autonômica diabética (Mantysaari e cols., 1992; Langer e cols., 1995 e Murata e cols., 1996).

O radiotraçador ^{11}C -hidroxiefedrina (^{11}C -HE), recentemente desenvolvido como análogo da norepinefrina para tomografia por emissão positrônica é especificamente captado e retido nos terminais simpáticos nervosos, o que permite caracterização regional quantitativa da disfunção e perda de neurônios simpáticos (Rosenspire e cols., 1990). Anormalidades na retenção cardíaca de ^{11}C -HE podem ser detectadas em 40% dos diabéticos com testes autonômicos clássicos normais. Indivíduos com neuropatia autonômica diabética leve apresentam defeitos de

captação apenas na parede inferior distal do ventrículo esquerdo, enquanto que os neuropatas graves têm envolvimento também de paredes ântero-laterais e inferiores. Além disto, estes pacientes apresentam aumento da captação de ^{11}C -HE da ordem de 33% nos segmentos miocárdicos proximais, sugerindo hiperinervação simpática nesta região (Stevens e cols., 1998).

5.1.3. Outros métodos:

Avaliação da função esofágica é feita através de manometria, cineradiografia e cintilografia. Esvaziamento gástrico pode ser avaliado através de estudos radiológicos com bário, técnicas cintilográficas com ingestão de refeição marcada com radioisótopos e ultrasonografia. Avaliação simplificada da função autonômica gênito-urinária inclui verificação e medida de resíduo vesical através de ultrasonografia pélvica ou pielografia intra-venosa após micção e medida de fluxo urinário durante a micção através de aparelhagem específica. Medida do diâmetro da pupila adaptada ao escuro é feita com câmara fotográfica e "flash" eletrônico. Também são descritos testes para avaliar áreas de perda de sudorese, sob estímulo ou não. Testes neuroendócrinos envolvem tecnologia de laboratório, e incluem a medida de polipeptídeo pancreático em resposta à hipoglicemia (testa a integridade vagal) e medida de catecolaminas plasmáticas (medida aproximada de atividade simpática) (Ewing e Clarke, 1986 e Martyn e Ewing, 1986).

Testes eletrofisiológicos permitem a medida de condução sensorial e motora no mesmo nervo, não são invasivos, mas habitualmente estudam apenas os axônios mielinizados de condução mais rápida. Os axônios não mielinizados, dentre os quais estão as fibras simpáticas, são tão dispersos e produzem sinais de amplitude tão baixa, que só podiam ser avaliados através de microneurografia, método invasivo e que dispense muita técnica e tempo para ser realizado. No entanto, medidas da atividade e resposta simpática na pele, registradas com

equipamento de eletromiografia comum, parecem ser úteis na avaliação de fibras simpáticas periféricas, que habitualmente não podem ser avaliadas por métodos comuns (Shahani e cols., 1984).

Inúmeros outros métodos são descritos e muito provavelmente ainda o serão, considerando a larga distribuição da inervação autonômica no organismo.

5.2. Em ratos:

5.2.1. Avaliação funcional autonômica:

Em animais também é feita através de testes cardiovasculares específicos. Através deles, são avaliados: o reflexo arterial baroreceptor e também seus componentes simpático e parassimpático isoladamente (Coleman e cols., 1980 e Maeda e cols., 1995a), a reatividade vascular (Krizsan-Agbas e cols., 1991), os efeitos do bloqueio farmacológico com propranolol e atropina sobre a pressão arterial e frequência cardíaca (Negrão e cols., 1992), a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo (Sgoifo e cols 1997 e Mansier e cols 1996) e da frequência (Malliani e cols., 1991), a variabilidade da pressão arterial (Mancia & Zanchetti, 1986, Daffonchio, e cols., 1995 e Moraes e cols., 1996). Estes métodos estão descritos detalhadamente mais adiante.

5.2.2. Métodos que avaliam a inervação simpática cardíaca através de radioisótopos:

Assim como em humanos, análogos radiomarcados da norepinefrina, ^{123}I MIBG e ^{11}C -HE têm sido utilizados na avaliação da inervação simpática cardíaca em animais (Glowniak, 1995).

O uso da ^{123}I MIBG demonstrou, em ratos com Diabetes Mellitus estreptozotocina-induzido, que após 4 a 9 semanas, ocorria menor retenção do radioisótopo globalmente no miocárdio (Herman e cols., 1994). No entanto, a elevação no conteúdo de norepinefrina miocárdica característica desta fase do

Diabetes, quando normalizada pelo uso de inibidores da aldose-redutase leva à normalização da retenção de ^{123}I MIBG miocárdica, o que sugere que as alterações na retenção de ^{123}I MIBG encontradas por Herman estejam refletindo inibição competitiva com a norepinefrina pela captação neuronal ou maior liberação de ^{123}I MIBG, e não disfunção ou perda neuronal (Kurata e cols., 1997).

O fato de ratos com Diabetes por estreptozotocina de longa duração (6 e 9 meses) apresentarem menor retenção de ^{11}C -HE em porções distais do ventrículo esquerdo, locais em que foi observado menor conteúdo de fator de crescimento do nervo, sugere que este método represente de forma fidedigna a desnervação simpática cardíaca e que alterações autonômicas só ocorrem neste órgão tardiamente (Schmid e cols., 1999).

5.2.3. Métodos que avaliam a inervação simpática renal:

O rim é um órgão ricamente innervado com barorreceptores, quimiorreceptores e nervos aferentes (simpáticos). Os barorreceptores aumentam sua atividade em resposta a alterações de perfusão renal e pressão intra-renal enquanto que os quimiorreceptores são estimulados por metabólitos isquêmicos e toxinas urêmicas. A ativação destes receptores pode estabelecer conexões com núcleos integrados do sistema nervoso simpático no sistema nervoso central, através de vias renais aferentes (Dibona, 1997). Os nervos renais aferentes projetam-se diretamente em áreas centrais envolvidas na regulação da pressão arterial, podendo contribuir na gênese da hipertensão arterial quando cronicamente estimulados. Sua ressecção não apenas previne a hipertensão, mas também a progressão de doença renal em ratos com ablação renal (Campese e cols., 1995).

O conteúdo de norepinefrina tecidual também tem sido descrito como índice que quantifica a inervação simpática renal, tendo em vista sua diminuição em

95% em rins de ratos desnervados cirurgicamente até 2 semanas após o procedimento (Kline e Mercer, 1980).

Através da implantação, sob anestesia, de um eletrodo de platina bipolar recoberto por borracha de silicone ao redor de um ramo do nervo renal, a atividade simpática renal em ratos pode ser diretamente avaliada. O valor é pré-amplificado através de amplificador de alto débito, e o sinal filtrado e armazenado em fita magnética. O sinal registrado é retificado, integrado e processado via conversor analógico-digital usando sistema de aquisição de dados para quantificar as descargas nervosas (Irigoyen e cols., 1988).

5.2.4. Outros métodos:

Medida tecidual das atividades bioquímicas das enzimas colina acetil-transferase, marcador de elementos colinérgicos pré-sinápticos e dopamina-beta-hidroxilase, restrita aos neurônios simpáticos pós-sinápticos, pode avaliar a integridade de gânglios autonômicos (Schmidt e Plurad, 1986).

Dosagem sérica da dopamina-beta-hidroxilase não é índice confiável na avaliação do sistema nervoso simpático em ratos diabéticos, já que sua meia-vida está aumentada nestes animais devido à competição entre esta enzima e os altos níveis de glicose pelos locais onde aquela é catabolisada (Munoz e cols., 1984).

Níveis teciduais de norepinefrina foram utilizados na avaliação da inervação noradrenérgica cardíaca, demonstrando resultados diferentes dos obtidos na avaliação histo-morfométrica, conforme já descrito previamente, sugerindo que as alterações funcionais podem ser mais precoces do que as estruturais neste modelo experimental e neste tecido (Felten e cols., 1982).

6. Patogênese das neuropatias diabéticas:

Neste ítem existem vários mecanismos propostos, todos suportados por estudos experimentais e clínicos, de modo que mais provavelmente, assim como ocorre para as outras complicações do Diabetes Mellitus, vários fatores patogénéticos estejam envolvidos, tanto no início como na progressão da doença.

Entre as possíveis etiologias levantadas encontram-se: alterações no metabolismo dos polióis, lipídios ou aminoácidos, insuficiência vascular, aumento na formação de radicais livres superóxido-induzido, menor transporte axonal e neurotrofismo diminuído. Estes defeitos estão provavelmente interrelacionados e, em conjunto com o estado diabético, são responsáveis pela progressão da neuropatia (Stevens cols., 1995). Didaticamente podemos dividir a etiologia das neuropatias diabéticas em de causa metabólica e vascular, as quais interagem entre si.

Os resultados do DCCT (1993) sugerem que o fator isolado mais importante no desenvolvimento das complicações crônicas do Diabetes Mellitus é a hiperglicemia. O aumento dos níveis de glicose no nervo e células endoteliais determina alterações nos níveis de lipídios, polióis, além de glicação protéica não-enzimática e disfunção em fatores de crescimento (Greene e cols., 1987 e Brownlee e cols., 1988).

Na via do poliol a glicose é metabolizada a sorbitol e frutose respectivamente pelas enzimas aldose redutase e desidrogenase do sorbitol. No Diabetes Mellitus, o acúmulo de sorbitol intra-celular com diminuição compensatória de mio-inositol associa-se à redução na síntese e "turnover" de fosfoinositol (Nakamura e cols., 1992 e Thomas e cols., 1993). A depleção de mio-inositol no rato diabético associa-se à menor atividade da Na-K-ATPase e diminuição da velocidade de condução nervosa e sua suplementação na dieta ou o

uso de inibidores da aldose redutase revertem estas alterações (Greene e Lattimer, 1983 e Greene e cols., 1993).

Redução no fluxo sanguíneo nervoso, aumento de resistência vascular e menor tensão de oxigênio em nervos ciáticos de ratos diabéticos também têm sido descritos (Tuck e cols., 1984). Biópsias de nervos surais de humanos demonstraram alterações vasculares tais como espessamento de membrana basal, edema e proliferação de células endoteliais, agregação plaquetária e oclusões de vasos (Dick e cols., 1986). Estes dados sugerem que, pelo menos em parte, a perda de fibras mielinizadas característica do Diabetes Mellitus deve-se a dano secundário à isquemia e hipóxia.

A unificação das duas hipóteses é sugerida por Stevens e cols., em revisão de 1995. Os autores acreditam que, precocemente no início do Diabetes Mellitus, defeitos metabólicos levam à ativação da via da aldose redutase e sorbitol desidrogenase. O óxido nítrico é um radical altamente reativo, mediador de vasodilatação e neurotransmissor inibitório. É sintetizado pela sintetase do óxido nítrico, que é NADPH-dependente. O fluxo de glicose pela via dos polióis diminui a disponibilidade de NADPH, o que limita reações dependentes da glutatona e também a atividade da sintetase do óxido nítrico, levando à sua depleção. A depleção de óxido nítrico leva a alterações de fluxo sanguíneo no nervo, que por sua vez diminui a capacidade do nervo em tamponar radicais livres, além de depletar as reservas energéticas disponíveis, o que promoveria início da neuropatia diabética. O uso de inibidores da aldose-redutase, bloqueando a formação de sorbitol e portanto a depleção de NADPH, preveniu o aparecimento de neuropatia diabética em ratos com Diabetes por estreptozotocina. A associação destes ao inibidor da sintetase do óxido nítrico (L-NAME) permitiu novamente que os animais desenvolvessem neuropatia diabética, dados que reforçam as teorias

de que fluxo contínuo de glicose através da via dos polióis limita a síntese de óxido nítrico por causar depleção de NADPH, e a diminuição de óxido nítrico resulta em vasoconstricção, isquemia e diminuição da velocidade de condução nervosa (Stevens e cols., 1995).

Em ratos normais desmamados e alimentados com uma dieta deficiente em α -tocoferol foi observada peroxidação lipídica endoneural, o que associou-se ao desenvolvimento de neuropatia sensitiva (Nickander e cols., 1994), portanto, o stress oxidativo em um rato normal produz sinais de neuropatia. A melhora do stress oxidativo poderia ser a principal função dos inibidores da aldose-redutase, assim como o aumento da atividade da glutatona (principal alvo mitocondrial para a detoxificação de peróxido de hidrogênio) e diminuição dos radicais livres de oxigênio (Feldman e cols., 1997).

Mais recentemente foi sugerido o papel de metabolismo alterado do fator de crescimento do nervo na patogênese da neuropatia diabética, mas estudos em diabéticos com e sem disfunção autonômica não demonstraram diferenças entre os grupos quanto à presença de auto-anticorpos anti-fator de crescimento do nervo (Zanone e cols., 1994). Já em ratos com Diabetes por estreptozotocina de longa duração, observou-se correlação das alterações no fator de crescimento do nervo com as alterações observadas na inervação miocárdica, avaliada através de métodos radioisotópicos (Schmid e cols., 1999).

Em ratos, estudos específicos em relação às fibras nervosas autonômicas (gânglios autonômicos simpáticos e nervos mesentéricos) foram realizados por Schmidt e cols., demonstrando prevenção da distrofia axonal ocasionada pelo Diabetes com o uso de insulina, transplante de pâncreas e uso de inibidores da aldose-redutase, mas não com a suplementação de mio-inositol. O uso destes

tratamentos após o estabelecimento da disfunção autonômica não ocasionou reversão completa da distrofia axonal (Schmidt e cols., 1989 e 1991).

7. Repercussões da desnervação autonômica diabética:

A neuropatia autonômica diabética tem sido relacionada como uma das possíveis causas de mortes súbitas. Estudos longitudinais acompanhando diabéticos neuropatas demonstraram mortalidade entre 16 e 53% em 5 anos destes pacientes; as maiores taxas de mortalidade ocorrem na presença de neuropatia autonômica diabética avançada (Ewing e cols., 1980).

7.1. Sobre o sistema gastrointestinal:

Esôfago, estômago, vesícula biliar, pâncreas, intestino delgado e grosso podem ser afetados pela disfunção autonômica do Diabetes Mellitus, determinando contrações descoordenadas do esôfago, dificuldade de esvaziamento gástrico e atonia da vesícula biliar e trânsito gastro-intestinal lento. No pâncreas, a neuropatia autonômica diabética pode acarretar ausência de resposta do polipeptídeo pancreático à hipoglicemia, usualmente sob controle vagal (Pfeifer e cols., 1993).

7.2. Sobre a sudorese:

A disfunção sudomotora caracteriza-se por degeneração de axônios não mielinizados pós-ganglionares, levando à anidrose distal bilateral simétrica (Faerman e cols., 1982). Outra consequência são os distúrbios na termorregulação, pela ausência de perspiração em membros inferiores e excesso de perspiração na região superior do corpo e face (Fealey e cols., 1989).

7.3. Sobre a retina:

Associação da neuropatia autonômica diabética com retinopatia proliferativa foi observada por Krolewski e cols. (1992) em pacientes com Diabetes Mellitus do

tipo 1 e em nosso meio em pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 2 (Schmid e cols, 1995).

7.4. Sobre o metabolismo:

Normalmente a diminuição da glicemia é seguida da liberação de glucagon, hormônio do crescimento, adrenalina e cortisol.

A queda progressiva da glicose plasmática produz uma resposta parassimpática assintomática com bradicardia e leve hipotensão seguida de resposta simpática com sintomas geralmente bem reconhecidos devido à liberação de norepinefrina (sudorese, taquicardia, palpitações), os quais dão o aviso ao paciente diabético da hipoglicemia (Campbell e cols., 1977).

O paciente com Diabetes de longa duração torna-se mais vulnerável às hipoglicemias devido à contrarregulação deficiente, inicialmente por secreção deficiente de glucagon, superimpondo-se deficiente resposta da adrenalina, em geral relacionada à neuropatia autonômica diabética. A contrarregulação deficiente e a ausência de sintomas quando das hipoglicemias podem gerar hipoglicemias graves e até dano neurológico permanente (Cryer, 1981).

7.5. Sobre o sistema a respiratório:

Os estudos que avaliaram as respostas ventilatórias à hipóxia e hipercapnia mostram resultados conflitantes (Soler e Eagleton, 1982 e Wanke e cols., 1993). Não são encontrados estudos que avaliem as áreas inervadas respiratórias.

Reatividade brônquica alterada em resposta a diferentes agentes farmacológicos tem sido descrita em diabéticos com neuropatia autonômica, mas as implicações clínicas destes achados não são claras; talvez possam causar diminuição dos reflexos de defesa (tosse) a agentes nocivos (Rhind e cols., 1987 e Vianna e cols., 1988).

Episódios de apnéia durante o sono têm sido implicados nas mortes súbitas que ocorrem nos pacientes com neuropatia autonômica diabética grave.

Um estudo em diabéticos com e sem neuropatia autonômica não demonstrou alteração na saturação de oxigênio, no eletrocardiograma e número de apnéias durante o sono entre os 2 grupos avaliados (Catteral e cols., 1984). Dados recentes de nosso meio diferem dos encontrados por Catteral e cols., pois comparando 12 pacientes diabéticos com disfunção autonômica grave a 8 indivíduos normais demonstrou que o primeiro grupo apresentava maior número de episódios de dessaturação de oxigênio abaixo de 85% durante o sono. As diferenças de resultados podem se dever ao grau de disfunção autonômica dos pacientes estudados e/ou método utilizado na avaliação dos resultados de oximetria (Neumann e cols., 1995). Mais recentemente, em acordo com os resultados de nosso meio, foi observado que 26% dos pacientes com neuropatia autonômica diabética apresentavam critérios para a síndrome da apnéia do sono, versus nenhum paciente sem neuropatia (Ficker e cols., 1998).

7.6. Sobre a função cardíaca:

Utilizando-se a ^{11}C -HE e ^{123}I MIBG como marcadores de neurotransmissão, tem sido observada desnervação cardíaca distal relacionada ao Diabetes, tanto em humanos (Stevens e cols., 1998) como em ratos (Schmid e cols., 1999). Em humanos, estudo recente mostrou que, além disto, áreas de hiperatividade simpática estão presentes no miocárdio proximal de indivíduos com neuropatia autonômica diabética grave. Propõe-se que estas áreas aumentariam o risco de arritmias cardíacas e morte súbita durante isquemia miocárdica, o que seria uma explicação para a especial cardioproteção obtida com o uso de beta-bloqueadores nestes indivíduos.

7.7. Sobre o sistema gênito-urinário:

No homem, a neuropatia autonômica diabética leva à impotência parcial e total, devida a dano da inervação simpática e parassimpática ao tecido erétil, com libido em geral mantida, e, mais tardiamente, ejaculação retrógrada (Pfeifer e cols., 1993).

A disfunção parassimpática determina aumento do resíduo vesical após as micções predispondo a infecções urinárias de repetição, as quais podem acelerar insuficiência renal já estabelecida. Quando ocorre acometimento dos nervos simpáticos, o que é raro, desenvolve-se incontinência urinária, o que é um sintoma tardio na evolução da neuropatia autonômica diabética (Buck e cols., 1976).

7.8. Sobre os rins:

Não encontramos na literatura estudos mapeando a inervação renal no Diabetes, da mesma forma como foram realizados em relação à inervação cardíaca, de modo que não se pode afirmar que ocorra desnervação renal como consequência do Diabetes.

7.8.1. Neuropatia autonômica diabética cardiovascular e nefropatia diabética: achados na associação:

Estudos de Dyrberg e cols. em 1981, de Zander e cols. em 1989 e 1992, e de Krolewski e cols., em 1985 e 1992 demonstraram a ocorrência de associação entre anormalidades do sistema nervoso autônomo e a presença de microalbuminúria e proteinúria em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1. Os autores sugerem que a neuropatia autonômica diabética poderia operar como fator de risco no desenvolvimento da nefropatia diabética nestes pacientes, ou que ambas as complicações advêm de mecanismos patogénéticos comuns. Estes achados são de interesse prognóstico, já que ambas as complicações associam-se a altas taxas de mortalidade (Ewing e cols., 1980 e Borch-Johnsen e cols., 1985)

Em 1993, estudo também em diabéticos tipo 1, acompanhados por 10 a 11 anos, evidenciou queda significativa da taxa de filtração glomerular dentre os indivíduos classificados inicialmente como apresentando neuropatia autonômica (diagnóstico por resposta da frequência cardíaca à respiração profunda e à inclinação 90° rápida) quando comparados àqueles sem a complicação. Maior número de pacientes com neuropatia autonômica diabética ao início do estudo vieram a apresentar micro e macroalbuminúria ao final do estudo do que os não-neuropatas. Respostas alteradas da pressão arterial diastólica e sistólica à inclinação quando da entrada no estudo correlacionaram-se com alterações de taxa de filtração glomerular ao final do estudo, sugerindo falha simpática como um dos fatores determinantes na deterioração da função renal. Já respostas alteradas da frequência cardíaca à respiração profunda, que avaliam basicamente o sistema parassimpático, não apresentaram correlação com a taxa de filtração glomerular ao final do estudo, sugerindo sua menor influência sobre a função renal (Sundkvist & Lilja 1993). No entanto, outros autores observaram associação entre distúrbio parassimpático e nefropatia diabética, o que pode se dever a estes autores terem utilizado, além dos testes cardiovasculares clássicos descritos por Ewing, medidas de variabilidade da frequência cardíaca em registros de 24h, sabidamente mais sensíveis na detecção de dano parassimpático (Molgaard e cols., 1992).

O conceito de associação de neuropatia autonômica simpática a alterações renais precoces da nefropatia diabética é suportado por conceitos morfológicos prévios, tais como a inervação de túbulos e glomérulos renais ser apenas simpática (Barajas, 1978). A desnervação simpática renal aumenta a excreção de sódio, diminui a secreção de renina e diminui a resistência vascular renal (Bello-Reuss e cols., 1975 e Kappagoda e cols., 1981). Pelo descrito, a desnervação simpática renal poderia tornar os rins mais vulneráveis a efeitos

hemodinâmicos da pressão arterial sistêmica, de forma que estes indivíduos teriam maior pressão intra-glomerular noturna que aqueles sem neuropatia autonômica diabética. Isto poderia resultar de falha de mecanismos compensadores habitualmente sob controle do sistema nervoso autônomo e ativos sobre a hemodinâmica renal.

Além disto, outras condições de disfunção autonômica que não a causada pelo Diabetes Mellitus também podem se acompanhar de anormalidades na função renal, tais como maior excreção urinária de sódio, especialmente noturna, mesmo em vigência de dieta hipossódica (Wilcox e cols., 1977).

Winocour e cols., em 1986 observaram maior excreção urinária de albumina e de sódio noturnas dentre os diabéticos com neuropatia autonômica, sugerindo que ela pode, de uma forma independente, afetar a função renal, e que a hemodinâmica renal noturna e balanço glomérulo-tubular podem estar modificados nestes indivíduos (Winocour e cols, 1986).

Estudo mais recente, utilizando monitorização ambulatorial de pressão arterial de 24 horas demonstrou perfil anormal em diabéticos tipo 1 normotensos, o que correlacionou-se com os testes autonômicos clássicos descritos por Ewing, especialmente hipotensão postural. Estes autores observaram maior excreção urinária de albumina e menor descenso da pressão arterial durante a noite em diabéticos com neuropatia autonômica. Foi observada correlação positiva entre a excreção urinária de albumina e pressão arterial sistólica medidas concomitantemente, correlação esta que foi mais intensa entre os neuropatas. Nenhum paciente neste estudo apresentava microalbuminúria pelos critérios habitualmente utilizados, o que levanta a possibilidade de que a disfunção autonômica possa contribuir para o desenvolvimento da nefropatia diabética

através de mudanças no perfil tensional intra-renal determinado pela falta de resposta às alterações posturais (Spallone e cols., 1994).

Outros estudos nos quais também é fortemente sugerido um papel de distúrbios autonômicos sobre a gênese da nefropatia diabética são os de Monteagudo e cols. (1996), Poulsen e cols. (1997) e Hansen e cols. (1996).

7.8.2. Mecanismos patogênicos da nefropatia diabética: implicações na relação neuropatia autonômica e nefropatia diabética:

Múltiplos fatores, que provavelmente interagem entre si, estão implicados no início e progressão das alterações glomerulares características da nefropatia diabética: predisposição genética à lesão renal (Seaquist e cols., 1989), composição da dieta alimentar, hiperfiltração glomerular com hipertensão intraglomerular capilar (Zatz e cols., 1985), hipertensão arterial sistêmica (Parving e cols., 1981), e principalmente hiperglicemia. As hipóteses patogênicas mais recentes envolvem alteração do metabolismo intra-celular da glicose na iniciação dos eventos patológicos, já que o fator isolado mais importante no desenvolvimento da nefropatia diabética é a hiperglicemia (DCCT, 1993).

Estudos em cultura de tecidos evidenciaram que aumento da glicose no meio exerce importante influência sobre o crescimento das células mesangiais e metabolismo da matriz extra-celular. Um aumento da concentração de glicose intra-celular e do seu metabolismo através de vias enzimáticas e não-enzimáticas promoveria maior síntese de matriz extra-celular (Ayo e cols., 1991b).

No Diabetes Mellitus, altas concentrações de glicose extra-celular refletem-se em altas concentrações intra-celulares de glicose em alguns tecidos, tais como nas células mesangiais e axônios. Ações de altas concentrações intra-celulares de glicose implicadas na patogênese da nefropatia diabética incluem ativação da via dos polióis induzindo depleção de mio-inositol e redução da atividade da Na-K-

ATPase (Greene e cols., 1987), alteração do balanço redox celular, geração de produtos reativos da glico-oxidação incluindo lipoproteínas oxidadas e superoxidadas (Williamson e cols., 1993), formação de produtos avançados da glicosilação não-enzimática (Vlassara, 1995), geração aumentada de eicosanóides (Tsfamarian e cols., 1990), maior expressão de TGF β 1 (Rocco e cols., 1992) e ativação do sistema da proteína quinase C (Ayo e cols., 1991a).

O aumento de produção de TGF β 1 tem sido relacionado a um aumento da atividade da proteína quinase C, enzima sabidamente superexpressa quando as concentrações intra-celulares de glicose aumentam (Ishii e cols., 1998). Além disto, células mesangiais cultivadas em meios com altas concentrações de glicose aumentam sua secreção de TGF β 1, colágeno do tipo IV e outros componentes da matriz extra-celular (Ayo e cols., 1991b). A observação de que TGF β 1 proteína está aumentada em glomérulos de ratos diabéticos por estreptozotocina com 24 e 40 semanas de duração e sua correlação com a albuminúria crescente que estes animais apresentam à medida que avança o Diabetes, sugere que esta citocina pode ser importante na gênese e manutenção da nefropatia diabética neste modelo experimental (Bertoluci e cols., 1996).

Com a excessão de alguns tecidos, como células epiteliais intestinais e túbulos renais proximais, em que a glicose é concentrada por processo ativo envolvendo co-transportadores ativos Na-glicose, a glicose entra nas células por um processo passivo de difusão facilitada. Neste tipo de processo, proteínas integrais de membrana específicas, identificadas como GLUTs, transportam a glicose do meio com maior concentração para o meio com menor concentração da mesma. Por este motivo, as concentrações intra-celulares de glicose aproximam-se daquelas do meio extra-celular. Hoje são conhecidos sete GLUT gens (GLUTs 1 a 7), um dos quais é um pseudogen (GLUT 6), e 6 são gens de transportadores de

glicose por difusão facilitada. A glicose entra nas células mesangiais por este processo, que independe da ação da insulina, mas que pode ser regulado pela ação dos GLUTs (Kreisberg & Ayo, 1993 e Mueckler, 1994).

A identificação dos transportadores de glicose nas células mesangiais e avaliação da cinética de captação de glicose, permite demonstrar que os transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) podem modificar a entrada de glicose para dentro destas células, regulando, desta forma, a atividade das vias do metabolismo da glicose e síntese de matriz extra-celular. Investigações recentes demonstraram pelo menos GLUTs 1, 3, 4 e 5 nos glomérulos de ratos (por "immunostaining", marcação "immunogold-silver" e "immunoblotting"), destacando-se GLUT 1 e 4 em células mesangiais (predominantemente GLUT 1) e epiteliais e 3 nos tufo glomerulares. O GLUT 2, transportador de baixa afinidade pela glicose, está presente especialmente em células onde ocorre alto fluxo de glicose, como ocorre nos túbulos proximais renais. Por outro lado, os GLUTs 1, 3 e 4 têm caracteristicamente alta afinidade pela glicose e são saturados em concentrações quase fisiológicas da mesma. Muito provavelmente, a capacidade que aumentos na concentração de glicose extra-celular têm de aumentar a captação de glicose pelas células mesangiais é limitada pela saturação dos GLUTs 1 e 4. A localização ultra-estrutural destes transportadores ainda não foi realizada nestas células (Heilig e cols., 1995b).

Além disto, um aumento da concentração de glicose intra-celular pode não necessariamente requerer quantidades supra-fisiológicas de glicose no meio, se houver maior transporte da mesma para dentro da célula. Células mesangiais de ratos que expressam excessivamente o gen e proteína transportadora de glicose GLUT 1 demonstram aumento importante da captação e metabolismo de glicose, assim como estímulo significativo para a síntese de matriz extra-celular, mesmo

quando as células foram cultivadas em meio com concentração de glicose normal (Heilig e cols., 1995a). Também aumento da glicose extra-celular pode levar à maior expressão de GLUT 1 e transporte de glicose IGF1 (insulin-like growth factor-1) mediado pela célula mesangial, exacerbando a produção de matriz extra-celular por estas células. Outros fatores (TGF β 1, sulfoniluréias, insulina, glicocorticóides, hipóxia) podem alterar a expressão de GLUT 1 e a captação de glicose pelas células mesangiais (Heilig e cols., 1997a e b).

Dados recentes indicam potencial da glicose em aumentar a expressão de GLUT 1, o que aumentaria a captação de glicose na presença de hiperglicemia. As respostas mais comumente encontradas à elevação da glicose são de supressão ou não alteração, o que protegeria a célula do efeito tóxico do excesso de glicose. Portanto, o potencial das células mesangiais em aumentar a expressão dos transportadores de glicose em resposta a elevações da mesma parece ser tão elevado a ponto de predispor estas células a dano glicose-induzido. Esta resposta da célula mesangial está de acordo com a proposta de que o Diabetes levaria a maior metabolismo da glicose por esta célula, já que, sem alterações de transportadores de glicose seria improvável que houvesse quantidade intra-celular suficiente da mesma para este maior metabolismo (Heilig e cols., 1995a e 1997b). Devido à sua alta afinidade e baixa capacidade para transportar glicose, os transportadores de glicose são saturados em concentrações quase fisiológicas de glicose, quando avaliados em "xenopus oocytes" o que supõe-se ocorra também em células mesangiais (Kahn e cols, 1992).

Pode-se daí especular que a fração de pacientes que desenvolve nefropatia diabética expressaria maior número de transportadores de glicose ou exibiria maior resposta do GLUT 1 à hiperglicemia do que o habitual, de forma que variações individuais na expressão do GLUT 1 explicariam a observação de que apenas uma

parcela dos diabéticos venham a apresentar nefropatia diabética (Heilig e cols., 1997a).

Dominguez e cols. estudaram as adaptações de GLUT 1 e 2 em túbulos renais de ratos tornados diabéticos por estreptozotocina 2, 3 e 4 semanas após sua injeção. Constataram redução de mRNA e proteína GLUT 1 e aumento de mRNA e proteína GLUT 2, o que associou-se a maior fluxo de glicose, adaptações que, segundo o autor, teriam papel ativo na gênese da nefropatia diabética (Dominguez e cols., 1994). No entanto, é sabido que a nefropatia diabética é de origem primariamente glomerular, e, conforme descrito previamente, sua gênese é na célula mesangial, no córtex, local não estudado pelo autor.

Nos relatos anteriores, todas as evidências da interação disfunção autonômica/nefropatia diabética são indiretas. Apesar das correlações significativas demonstradas nos estudos clínicos citados anteriormente, não é claro de que forma elas refletem interação entre as complicações ou sua etiologia em comum. Estudo de Matsuoka e cols. de 1993, buscando estas evidências, avaliou a excreção urinária de albumina semanal por 6 semanas consecutivas após desnervação renal cirúrgica e indução de Diabetes Mellitus por estreptozotocina em ratos Wistar. Demonstrou maior excreção urinária de albumina nos animais diabéticos versus controles 2 semanas após a desnervação. No entanto, de 3 semanas em diante após o procedimento ocorreu também maior excreção urinária de albumina nos diabéticos desnervados versus não desnervados, sugerindo que a desnervação simpática renal determinou maior progressão da lesão renal. A desnervação renal em animais não diabéticos não influenciou a excreção urinária de albumina, concluindo os autores sobre a necessidade da associação com o Diabetes para a indução da lesão glomerular. O autor sugere que os nervos simpáticos renais em condições normais protegem os rins de episódios de hipertensão glomerular e

hiperfiltração, o que poderia ser essencial nos animais diabéticos, particularmente suscetíveis à hiperfiltração glomerular. Os resultados indicam que a desnervação renal poderia estar envolvida na patogênese da nefropatia diabética (Matsuoka, 1993). No estudo citado, a desnervação renal não foi confirmada, nem tampouco avaliada a função do sistema nervoso autônomo em outras regiões.

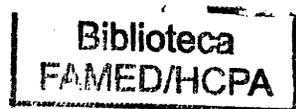
7.8.3. Efeitos da inervação sobre a expressão de transportadores de glicose:

Em 1987, estudo quanto ao efeito da insulina e exercício físico sobre a captação de glicose por fibras musculares desnervadas sugeriu que a desnervação reduzia o número de transportadores de glicose disponíveis, já que a ligação e fosforilação dos receptores de insulina apresentavam-se normais, apesar de diminuição da captação de glicose pelas fibras musculares estudadas (Turinski, 1987). Tendo sido reconhecido o GLUT 4 como principal transportador de glicose no músculo esquelético, através da determinação da quantidade de GLUT 4 proteína em músculo solear desnervado de rato, foram buscadas evidências que reforçassem a hipótese de Turinski. Foi observada diminuição de 52% desta proteína após desnervação, o que confirma que as mudanças no transporte de glicose neste modelo experimental se devem a menores níveis de GLUT 4 (Henriksen e cols., 1991). Quando estudado músculo desnervado da pata traseira de rato, diminuição de GLUT 4 proteína é temporalmente paralela à diminuição de mRNA GLUT 4, o que sugere que sua expressão protéica é regulada pela disponibilidade de mRNA (Block e cols., 1991).

O efeito da inervação na regulação da expressão dos transportadores de glicose pode se dar através da liberação no órgão ou tecido inervados de substâncias produzidas pelo nervo nos tecidos ou órgãos alvo. Utilizando modelo experimental específico, Megeney e cols., em 1994 constataram a influência de

substâncias provenientes do nervo sobre a quantidade de proteína GLUT 4 no músculo, a qual diminuiu mais rapidamente quando havia interrupção da atividade elétrica nervosa e do fluxo axoplasmático do que quando havia apenas desnervação, sem interrupção do recebimento de substâncias neurogênicas pela fibra muscular. Estes dados evidenciaram fortemente que um fator neurogênico contribui para a regulação de GLUT 4 no músculo, além da conhecida regulação deste transportador pela atividade elétrica nervosa (Megeney e cols., 1994).

Não há na literatura estudos que avaliem os níveis de GLUT 1 no córtex renal em resposta à desnervação local, bem como suas relações com a excreção urinária de albumina.



Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

Avaliar a função autonômica em fases iniciais e tardias do Diabetes Mellitus induzido por estreptozotocina tratado com insulina e relacionar esta função com a excreção urinária de albumina;

Avaliar a função autonômica após 45 a 90 dias de Diabetes Mellitus induzido por estreptozotocina e relacionar esta função com a excreção urinária de albumina;

Estudar os efeitos da desnervação renal bilateral sobre a excreção urinária de albumina e expressão dos transportadores de glicose no rim de ratos normais e com Diabetes Mellitus.

Material e Métodos

Este trabalho consistiu de 3 experimentos; a partir dos resultados preliminares do primeiro idealizou-se o segundo e assim consecutivamente. Muitos dos métodos utilizados no primeiro experimento são reutilizados nos seguintes, de forma que serão descritos uma só vez no texto que segue e depois discriminados, para cada experimento, especificamente os que foram utilizados em cada um.

1. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso médio de 206g (160 a 320g), provenientes do Biotério do Instituto de Biociências-UFRGS, os quais foram alimentados "ad libidum", com livre acesso à água. A temperatura era mantida em torno de 20 a 25°, o ciclo claro-escuro por 12 horas.

Aleatoriamente, 2/3 dos animais receberam estreptozotocina, 60mg/kg, diluída em tampão citrato (0.01M, pH 4.5), através de injeção endovenosa pela veia caudal, e o 1/3 restante o mesmo volume de tampão citrato de sódio. Após 48 horas da injeção, foi determinada qualitativamente a glicose plasmática através de fitas reagentes (glicose-oxidase) específicas para glicose (Haemoglukotest, Boehringer). Os animais injetados com estreptozotocina que apresentaram glicose plasmática maior ou igual a 300 mg/dl constituíram o grupo diabético (D). Os animais injetados com tampão citrato de sódio constituíram o grupo não diabético (ND).

2. Métodos utilizados:

2.1. Avaliação geral e metabólica:

2.1.1. Peso inicial e semanal até o final do experimento.

2.1.2. Coleta de urina de 24 horas (24h):

Realizada em gaiolas metabólicas específicas para este fim para medida de volume urinário e determinação da glicose e carga excretada de albumina. As amostras foram conservadas em azida sódica 2% e mantidas a -4°C até a determinação da carga excretada de albumina.

Amostras de urina de 24h foram obtidas aos 7 e 14 dias dias após a injeção de estreptozotocina ou tampão citrato de sódio e, nos estudos com tempos de avaliação maiores do que estes, mensalmente.

2.1.3. Determinação da glicose plasmática e urinária foi realizada através de método enzimático-colorimétrico (GOD-POD) glicose-peroxidase, com equipamento Centrifichem System 400-Roche/Cobas Mira-Roche (Trinder, 1969).

2.2. Avaliação cardiovascular:

2.2.1. Cateterização de vasos:

Foram canuladas artéria e veia femurais no dia anterior aos estudos cardiovasculares.

Este procedimento baseou-se na descrição de Waynforth e Flecknell (1992). Os animais foram anestesiados com éter etílico. Foram inseridos catéteres confeccionados com tubos de Tygon PE-50, aproximadamente 12 cm, conectados a tubos de polietileno PE-10, aproximadamente 5 cm (Clay Adams, USA) na aorta abdominal e veia cava inferior através de acesso pela artéria e veia femurais, respectivamente. Os catéteres foram exteriorizados no dorso do animal. Ao final do procedimento, as cânulas eram preenchidas com heparina sódica (Liquemine - Roche, 5000 UI) diluída em solução fisiológica de NaCl 0.9% na proporção de 1 para 100, com o objetivo de evitar obstruções.

2.2.2. Registro controle de pressão arterial e frequência cardíaca:

Foram realizados registros de pressão arterial e frequência cardíaca, com o animal acordado, durante o dia, pela manhã ou à tarde, por 40 minutos. O animal a ser estudado permanecia em sua caixa, sem tampa e coberto com uma compressa limpa, próximo ao local de registro, por um período de tempo suficiente para ambientação. Após conexão da cânula arterial a uma extensão, a qual estava conectada ao transdutor de pressão (P23Db, Gould-Statham, Oxnard, CA, USA), iniciava-se o registro de pressão batimento-a-batimento. O transdutor de pressão era acoplado a um condicionador de sinais Hewlett Packard (HP 8805C), o qual era ligado por um seletor de canais à placa analógico-digital CODAS (AT/MCA CODAS-DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA) em computador modelo PC 486 (66 Mhz e 8 Mb RAM). A frequência de amostragem utilizada foi de 2 KHz, com o objetivo de se obter maior precisão de valores. O programa utilizado (CODAS) permitiu trabalhar diretamente com a onda de pulso, que pode ser vista na tela do computador. Os dados obtidos foram gravados em disco rígido inicialmente. O mesmo programa permitiu calcular, para cada onda de pulso, valores de pico (sístole), vale (diástole) e período (entre um pico e outro), os quais geraram uma planilha, que foi analisada em programa Excel 5.0 para Windows. Desta análise, obteve-se valores de pressão arterial média, pressão arterial diastólica, sistólica e frequência cardíaca (calculada para cada batimento a partir dos períodos entre um pico e outro através do inverso do período multiplicado por 60 (segundos)), além de gráficos referentes às mesmas variáveis.

2.2.3. Bloqueio farmacológico dos sistemas nervoso simpático e parassimpático:

O registro da frequência cardíaca 10 minutos após o beta-bloqueio pela injeção de propranolol (antagonista adrenérgico β_1 e β_2), seguido do registro de

freqüência cardíaca 10 minutos após o bloqueio parassimpático pela injeção de atropina (antagonista dos receptores muscarínicos), ambas de forma endovenosa, com o uso das mesmas drogas em ordem inversa no dia seguinte, permitiu o cálculo das seguintes variáveis: 1) freqüência cardíaca intrínseca ou de marca-passo (média da freqüência cardíaca obtida após o duplo bloqueio nos dois dias), 2) tônus vagal (diferença entre a freqüência cardíaca intrínseca e a freqüência cardíaca após propranolol) e 3) efeito simpático (diferença entre a freqüência cardíaca basal e aquela obtida após a injeção de propranolol) (Negrão e cols., 1992).

Foi utilizado propranolol (Sigma) na dose de 4mg/kg, diluído em solução fisiológica e atropina (Sigma), na dose de 3 mg/kg diluída da mesma forma.

2.2.4. Avaliação dos reflexos comandados pelos pressorreceptores:

Os reflexos comandados pelos pressorreceptores exercem uma influência importante sobre as vias simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo e função cardiovascular. Alterações no reflexo arterial baroreceptor têm sido atribuídas à neuropatia autonômica em humanos (Bennett e cols., 1976 e 1978). O controle baroreflexo da freqüência cardíaca pode ser avaliado, em ratos, através da injeção de doses crescentes de fenilefrina (agonista α_1 seletivo, com efeito vasoconstrictor) e nitroprussiato de sódio (vasodilatador nítrico, dá origem a óxido nítrico), os quais aumentam e diminuem a pressão arterial, respectivamente, determinando como resposta baroreflexa quedas e aumentos na freqüência cardíaca (Stornetta e cols., 1987).

As soluções de fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram preparadas no máximo 1 dia antes de sua utilização, diluídas em soro fisiológico de NaCl 0,9% estéril. As injeções foram feitas endovenosamente, utilizando-se para tal uma

extensão confeccionada com o mesmo material das cânulas, de comprimento de aproximadamente 20 cm, para que as manobras não fossem vistas pelo animal.

Os reflexos comandados pelos pressorreceptores, quais sejam, bradi e taquicardia reflexas, foram avaliados após doses crescentes das duas drogas citadas, da forma a seguir descrita. A bradicardia reflexa foi avaliada após fenilefrina injetada em doses de 0.5, 2.0, 8.0 e 32.0 $\mu\text{g/ml}$, seguindo-se sempre o mesmo procedimento de registro de frequência cardíaca e pressão arterial média basais por 10 segundos aproximadamente, injeção da droga e registro das respostas das mesmas variáveis nos 50 segundos restantes. Deve-se ressaltar que após cada injeção e registro, somente injetava-se dose subsequente da droga após a pressão arterial média e frequência cardíaca terem retornado aos níveis prévios (controle). A taquicardia reflexa foi avaliada após nitroprussiato de sódio injetado em doses crescentes de 2.5, 10.0, 40.0 e 80.0 $\mu\text{g/ml}$, seguindo-se o procedimento descrito acima.

Para cada dose de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio infundida, criou-se uma planilha factível de ser analisada pelo programa Excel 5.0 para Windows, pelo mesmo sistema usado para os registros controles previamente descritos. Tanto para as injeções de uma ou outra droga, identificou-se o período de registro controle de aproximadamente 10 segundos (frequência cardíaca basal), a alteração máxima de pressão arterial média obtida após a injeção da droga em questão (pressão arterial média máxima ou mínima, de acordo com a droga) e a resposta máxima ou mínima de frequência cardíaca apresentada pelo animal à esta variação de pressão arterial média.

Para representar os reflexos comandados pelos pressorreceptores utilizou-se índices, calculados pela divisão da diferença de frequência cardíaca após a injeção da droga menos a basal pela diferença de pressão arterial média após a

injeção da mesma menos a basal; este índice corresponde a quantos batimentos por minuto foram alterados para cada mmHg de pressão arterial média modificada. O índice é calculado para cada dose administrada, sendo feita, no final, uma média dos índices obtidos com fenilefrina e com nitroprussiato de sódio para cada animal (Coleman e cols., 1980).

O método de avaliação dos valores de bradicardia e taquicardia reflexas em resposta à infusão de drogas vasoativas pode ser melhor compreendido observando-se a figura 1.

2.2.5. Avaliação da reatividade vascular:

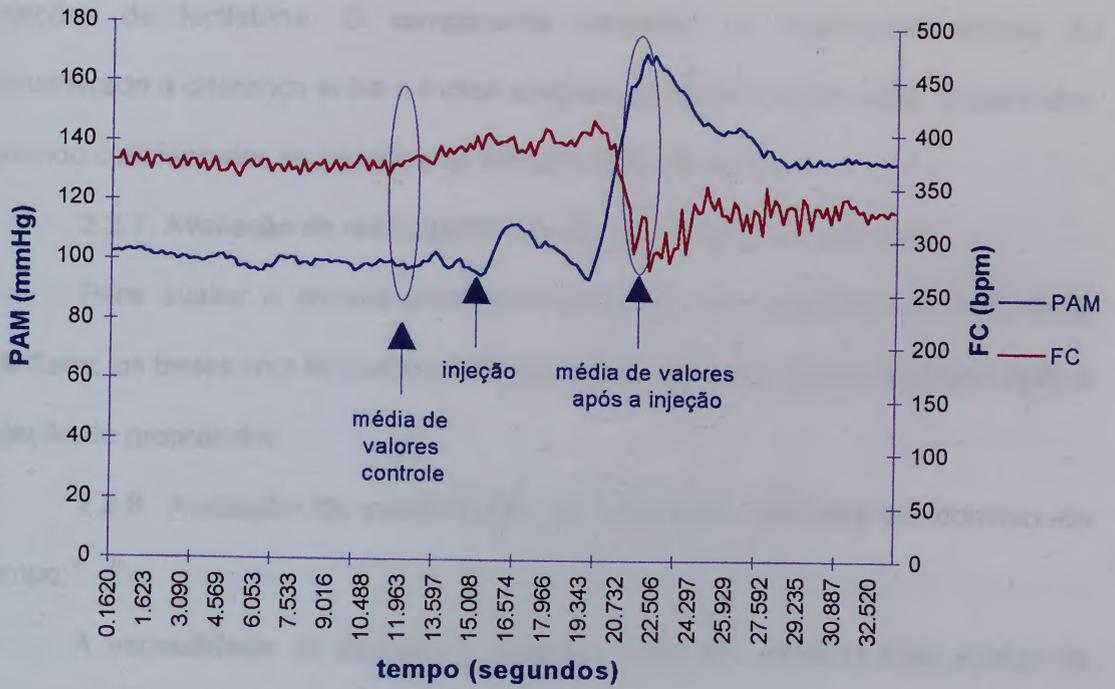
O uso de injeções de doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio pode também avaliar a reatividade vascular, através da observação da variação da pressão arterial média, positiva para a fenilefrina ou negativa para o nitroprussiato. Resposta pressora é a variação de pressão arterial média obtida após a injeção de diferentes concentrações de fenilefrina, e depressora aquela obtida após a injeção de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (Maeda e cols., 1995b).

2.2.6. Avaliação dos componentes simpático e parassimpático dos reflexos comandados pelos pressorreceptores:

Para avaliar apenas os componentes simpático e parassimpático das respostas de frequência cardíaca, os testes com fenilefrina e nitroprussiato de sódio podem ser repetidos após beta-bloqueio pela injeção de propranolol (McDowell e cols., 1994).

O componente parassimpático da bradicardia reflexa foi considerado o índice obtido após propranolol quando consideradas as injeções de fenilefrina. O componente parassimpático da taquicardia reflexa foi considerado o índice obtido após propranolol, quando consideradas as injeções de nitroprussiato de sódio. O

A



B

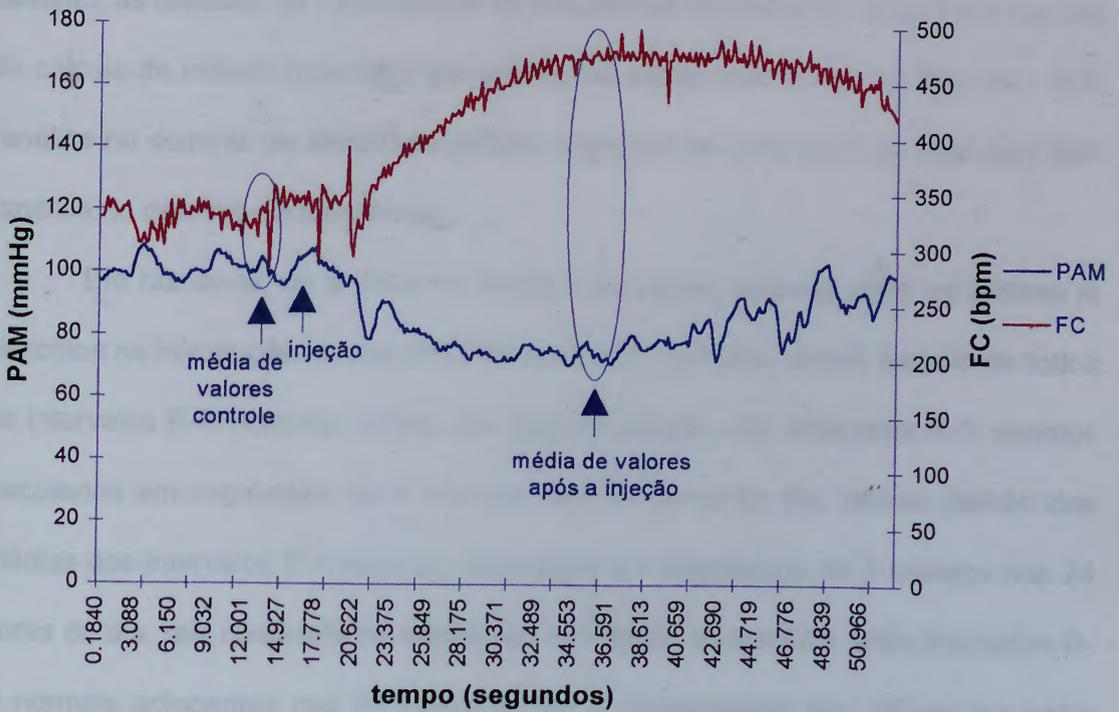


Figura 1: Método de avaliação de bradicardia reflexa (A) e de taquicardia reflexa (B) em resposta a infusões de drogas vasoativas (A: fenilefrina; B: nitroprussiato de sódio)

componente simpático da bradicardia reflexa foi considerado a diferença entre o índice obtido após propranolol e o índice controle, quando consideradas as injeções de fenilefrina. O componente simpático da taquicardia reflexa foi considerado a diferença entre o índice controle e o índice obtido após propranolol, quando consideradas as injeções de nitroprussiato de sódio.

2.2.7. Avaliação da reatividade vascular após bloqueio simpático:

Para avaliar o componente parassimpático das respostas de frequência cardíaca, os testes com fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram repetidos após a injeção de propranolol.

2.2.8. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo:

A variabilidade da frequência cardíaca pode ser utilizada para avaliar as funções simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo. Conforme já descrito, as medidas de variabilidade da frequência cardíaca são realizadas através do cálculo de índices baseados em operações estatísticas sobre os intervalos R-R (análise no domínio do tempo) ou análise espectral de uma série de intervalos R-R (análise no domínio da frequência).

Em humanos, da análise no domínio do tempo pode-se obter os índices já descritos na introdução: média dos intervalos R-R normais, desvio padrão de todos os intervalos R-R normais, média dos desvios padrão dos intervalos R-R normais calculados em segmentos de 5 minutos nas 24 horas do dia, desvio padrão das médias dos intervalos R-R normais calculadas em segmentos de 5 minutos nas 24 horas do dia, raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos R-R normais adjacentes nas 24 horas do dia e porcentagem das diferenças entre intervalos R-R normais adjacentes que excedem a 50 milissegundos (Malliani e cols., 1991).

Em animais, foi descrita análise da variabilidade da frequência cardíaca utilizando telemetria para obter as séries temporais de intervalos R-R (Sgoifo e cols., em ratos expostos ao stress (1997) e Mansier e cols. em camundongos (1996)).

Neste estudo foram calculados, a partir dos dados de frequência cardíaca obtidos nos registros de controle de 40 minutos, os seguintes índices: desvio padrão de todo os intervalos R-R normais (SDNN), raiz quadrada média das diferenças sucessivas entre intervalos R-R normais adjacentes (RMSSD) e média dos intervalos R-R normais do registro controle (RRMED).

2.2.9. Avaliação da variabilidade da pressão arterial média (PAM):

Assim como a frequência cardíaca, também a pressão arterial apresenta flutuações em relação à média, as quais são importante fonte de informação quanto aos mecanismos de regulação cardiovascular. No entanto, a regulação da frequência cardíaca é controlada basicamente pelo sistema nervoso autônomo, enquanto que a regulação da pressão arterial depende também de uma série de outros fatores (sistema renina-angiotensina, óxido nítrico, respiração, função cardíaca e volume de sangue circulante) (Japundzic Zigon, 1998).

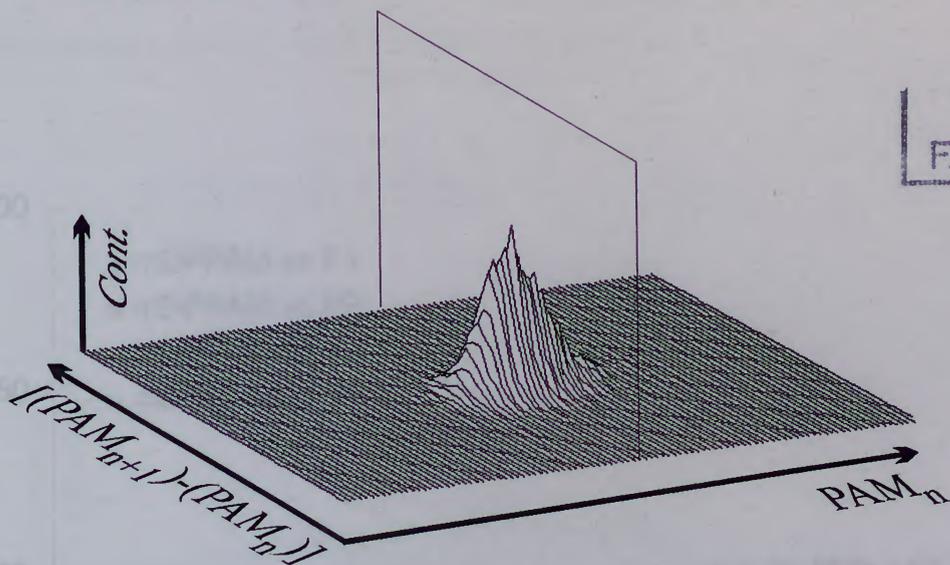
Tem sido utilizados o cálculo da média dos desvios padrões da pressão arterial sistólica, diastólica e média obtidas da análise batimento a batimento de medidas de pressão arterial intra-arterial e análise espectral da pressão arterial, obtida de registros de 24h, em humanos e animais (Mancia & Zanchetti, 1986 e Rubini e cols., 1993).

Neste estudo, foi utilizada a média dos desvios padrões da pressão arterial média a partir dos dados de pressão arterial média obtidos nos registros de controle de 40 minutos e índices obtidos pela modificação do método proposto por Moraes e cols., 1993. Este consistiu na montagem de um mapa de retorno tri-dimensional,

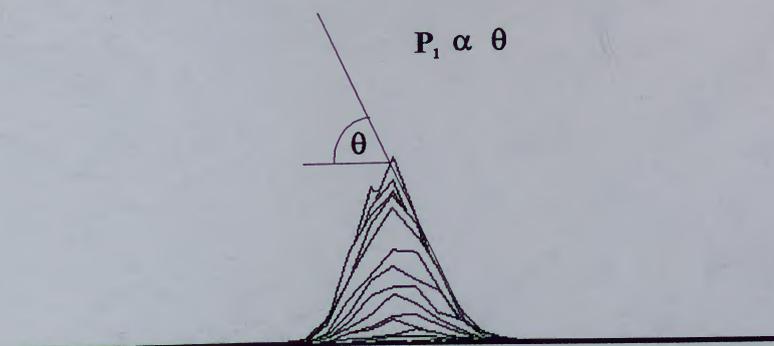
utilizando como eixo $PAM_n \times [(PAM_{n+1}) - (PAM_n)] \times$ densidade. A distribuição gerada foi avaliada de modo a quantificar os diferentes padrões de comportamento. Com o objetivo de quantificar o mapa de retorno tri-dimensional, foram criados índices baseados na análise das imagens obtidas, os quais foram denominados P_1 , P_2 , P_3 e MN. P_1 representa a máxima concentração de pontos, P_2 o eixo longitudinal, e P_3 o eixo transversal. O índice P_1 está associado com a inclinação média da superfície do mapa de retorno tri-dimensional, calculada na intersecção do plano perpendicular à PAM_n no pico de maior concentração de pontos, quer dizer, a inclinação do pico de maior concentração de pontos. O índice P_2 está associado com o comprimento da imagem obtida através do mapa de retorno tri-dimensional, medido no plano paralelo à RR_n , que intercepta o zero em $(PAM_{n+1}) - PAM_n$. O índice P_3 representa a largura transversa medida no pico da máxima concentração. O padrão global foi medido pelo índice MN ($MN = P_1 \times P_2 \times P_3 \times 10^{-3}$). Estes índices são expressos em unidades arbitrárias (figura 2).

Observou-se correlação positiva entre P_1 , P_2 , P_3 e MN obtidos do mapa de retorno tri-dimensional e a média dos desvios padrões da pressão arterial média ($r=0.42$, $p=0.03$, $r=0.88$, $p<0.001$, $r=0.57$, $p=0.003$ e $r=0.65$, $p<0.001$, respectivamente). Aparentemente o mapa de retorno tri-dimensional reproduz os resultados obtidos pela média dos desvios padrões da pressão arterial média, método classicamente utilizado para avaliar a variabilidade da pressão arterial média. A fraca correlação obtida entre média dos desvios padrões da pressão arterial média e índice P_1 e forte correlação com P_2 , P_3 e MN demonstra que o mapa de retorno tri-dimensional poderia discriminar diferentes padrões de comportamento da variabilidade da pressão arterial média, o que não é possível com a média dos desvios padrões da pressão arterial média (Figura 3).

Mapa de Retorno 3-Dimensional



$$MN = P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$$



$P_1 \propto$ declividade na máxima concentração

P_2 dispersão longitudinal máxima

P_3 dispersão transversal máxima

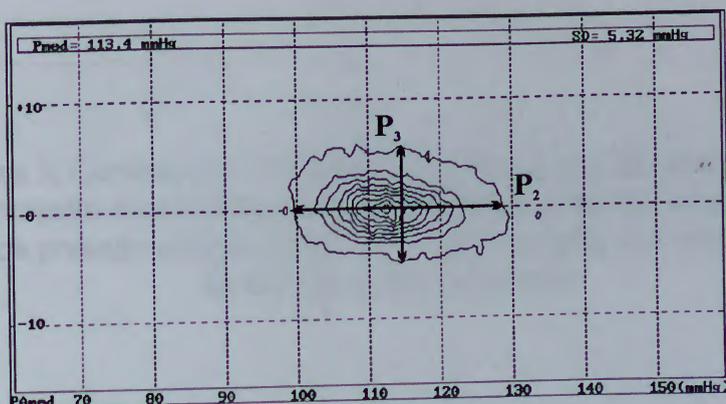


Figura 2: Representação gráfica da forma como são medidos os índices obtidos da análise do mapa de retorno tri-dimensional, P_1 , P_2 , P_3 e MN .

Exemplos Representativos

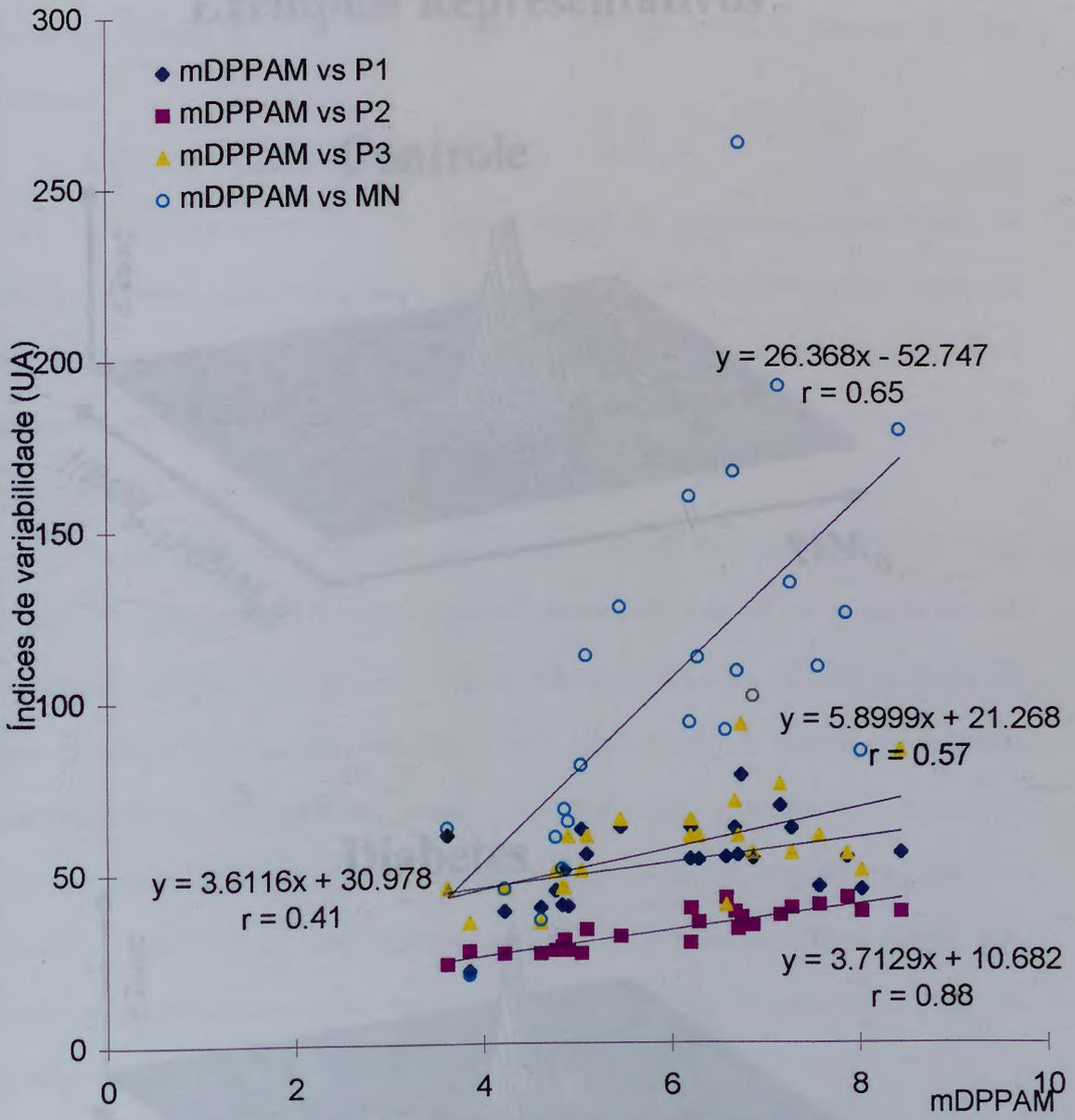
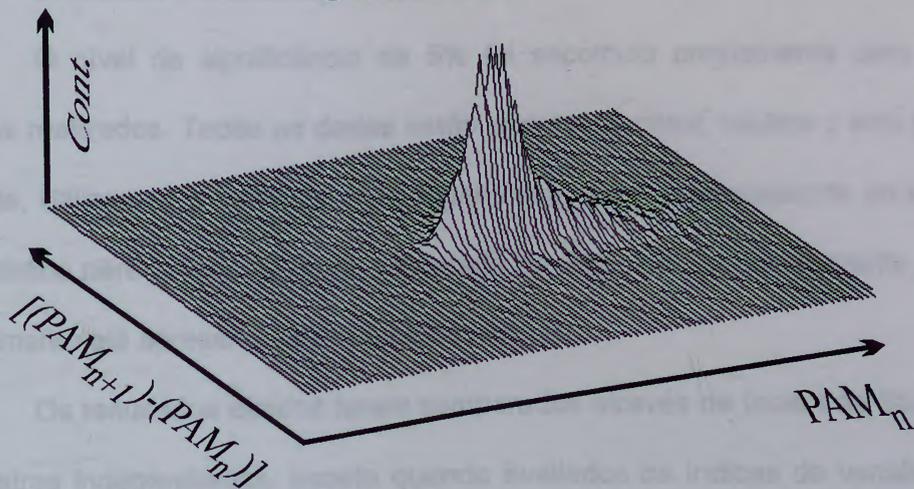


Figura 3: Correlações obtidas entre a média dos desvios padrões da pressão arterial média (mDPPAM) vs índices de variabilidade de pressão arterial média (P1, P2, P3 e MN) nos animais diabéticos e não diabéticos.

Exemplos representativos do mapa de retorno tri-dimensional em ratos diabéticos e não diabéticos são demonstrados na figura 4.

Exemplos Representativos

Controle



Diabetes

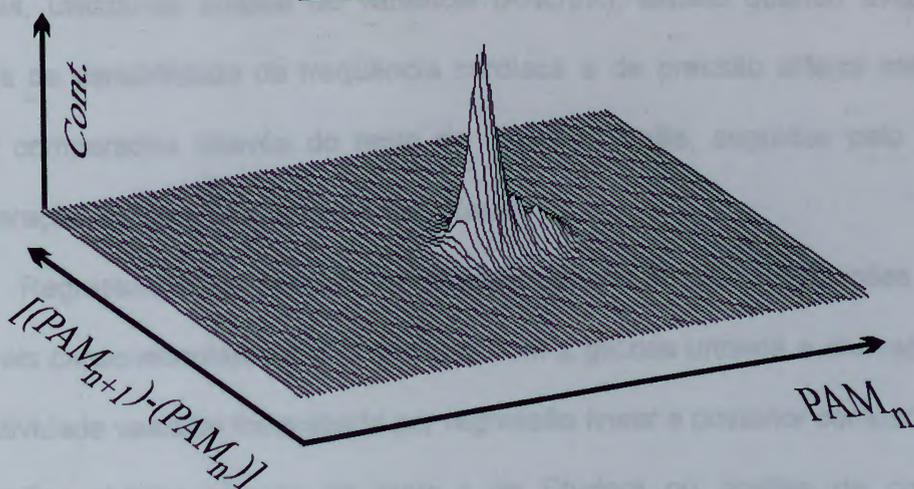


Figura 4: Mapa de retorno tri-dimensional: exemplos representativos

2.3. Avaliação da carga excretada de albumina:

Realizada através de eletroimunoensaio em gel de agarose adaptado por Schmid e cols., 1989. Utilizou-se anticorpo anti-albumina de rato desenvolvido em coelhos e padrões de albumina de rato de 25, 50 e 100 mg/ml, e agarose 1% (Tipo I, Sigma).

3. Análise estatística:

O nível de significância de 5% foi escolhido previamente para todos os testes realizados. Todos os dados estão expressos como médias \pm erro padrão da média. Utilizou-se a transformação logarítmica decimal previamente ao tratamento estatístico para a variável carga excretada de albumina, já que somente após este tratamento ela apresentava distribuição normal.

Os resultados obtidos foram comparados através de teste t de Student para amostras independentes, exceto quando avaliados os índices de variabilidade da frequência cardíaca e de pressão arterial média, analisados através do teste de Mann-Whitney, nos estudos em que foram comparados 2 grupos de animais, diabéticos e não diabéticos. No estudo 3, em que foram comparados 4 grupos de animais, utilizou-se análise de variância (ANOVA), exceto quando avaliados os índices de variabilidade da frequência cardíaca e de pressão arterial média, que foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls.

Regressão linear simples foi utilizada quando se buscou relações entre as variáveis cardiovasculares e das mesmas com a glicose urinária e diurese de 24h. A reatividade vascular foi avaliada por regressão linear e posterior comparação das inclinações obtidas através de teste t de Student ou análise de covariância (ANCOVA), quando o número de inclinações a ser comparado era maior do que 2. Da mesma forma, a comparação das inclinações das retas obtidas quando

correlacionados os índices do mapa de retorno tri-dimensional à média dos desvios padrões da pressão arterial média foi realizada por ANCOVA.

Os testes estatísticos foram feitos com o auxílio do programa Excel 5.0, Statmost 2.5 e SPSS para Windows.

*Função Autonômica e Excreção
Urinária de Albumina no Rato
Diabético Tratado com Insulina*

Estudo I: Material e Métodos

Neste experimento os animais diabéticos foram tratados com insulina NPH 100, sendo administrada 1 UI por via subcutânea diariamente, a partir de 1 semana após a injeção de estreptozotocina, enquanto que os não diabéticos receberam solução fisiológica de NaCl 0.9% no mesmo volume.

1. Avaliação geral e metabólica:

Os animais foram avaliados quanto aos pesos semanalmente. Amostras de urina de 24h para medida de diurese e determinação de glicose foram obtidas aos 7, 14, 30, 60, 90 e 120 dias após a injeção de estreptozotocina ou tampão citrato de sódio.

2. Avaliação cardiovascular:

A avaliação cardiovascular foi realizada aos 7 (4 D e 4 ND), 14 (8 D e 6 ND), 30 (4 D, 5 ND) e 120 dias (3 D, 6 ND) após a indução do Diabetes.

Após canuladas artéria e veia femurais no dia anterior ao estudo, os animais foram submetidos aos procedimentos: registro controle de pressão arterial e frequência cardíaca, bloqueio farmacológico dos sistemas nervoso simpático e parassimpático, avaliação da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e avaliação da variabilidade da pressão arterial média.

3. Avaliação da carga excretada de albumina:

Foi realizada nas amostras de urina de 24h coletadas aos 7, 14, 30, 60, 90 e 120 dias após a indução do Diabetes

Estudo I: Resultados

1. Características gerais e metabólicas dos animais estudados:

O peso inicial dos animais estudados foi semelhante entre o grupo D ($169.3 \pm 2.2g$) e ND ($161.1 \pm 2.4g$) ($p=0.70$). O grupo D apresentou tendência a menor peso que o grupo ND aos 7 dias ($p=0.08$) e menor peso que o grupo ND aos 14 ($p=0.01$) e 30 ($p<0.001$) dias de avaliação; a partir daí os 2 grupos mantiveram pesos semelhantes, apesar de tendência preservada do peso manter-se menor no grupo D, como se observa na figura 5.

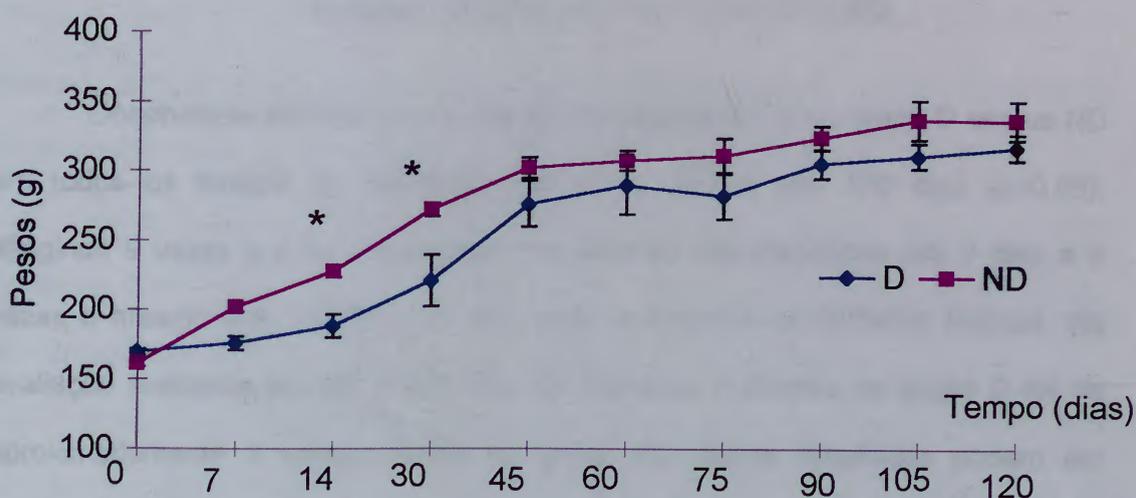


Figura 5: Pesos (g) dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Tempo = dias após a indução do Diabetes.

* $p < 0.05$ D vs ND.

A glicose urinária de 24h foi significativamente maior no grupo D versus ND em todos os tempos avaliados, aproximando-se de 300 vezes o valor encontrado no grupo ND aos 7 ($p=0.02$) e 90 dias ($p<0.001$) de Diabetes, ao redor de 450 vezes estes valores aos 14 ($p<0.001$), 30 ($p<0.001$) e 60 dias ($p<0.01$) de Diabetes e próximo de 150 vezes quando da avaliação de 120 dias ($p=0.02$) (Figura 6).

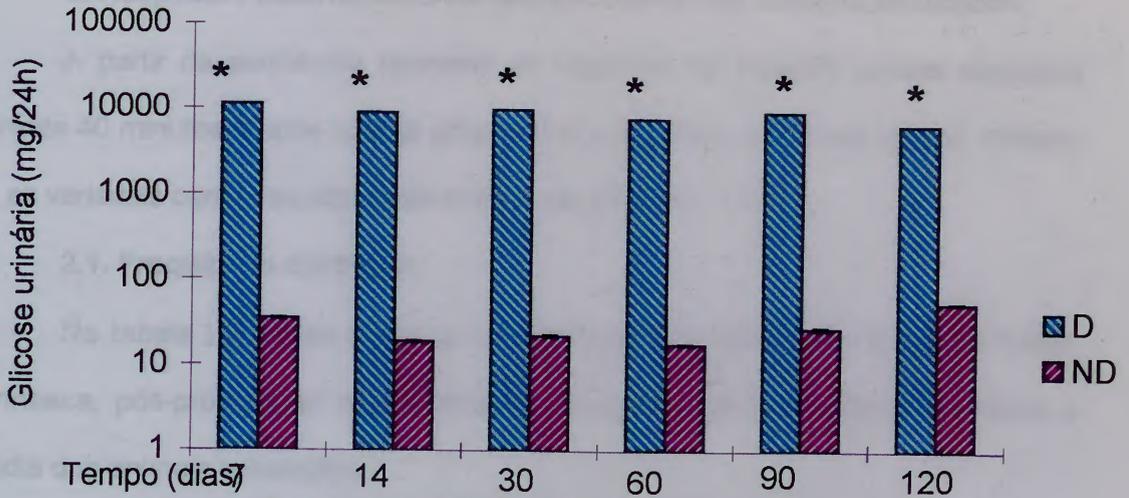


Figura 6: Glicose urinária de 24h nos animais estudados, diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Tempo = dias após a indução do Diabetes. * $p < 0.05$ D vs ND.

Observou-se diurese de 24h significativamente maior no grupo D versus ND em todos os tempos de avaliação ($p < 0.001$), exceto aos 120 dias ($p = 0.08$), atingindo 9 vezes o valor encontrado nos animais não diabéticos aos 7 dias e 5 vezes o mesmo aos 14, 30 e 90 dias após a indução do Diabetes Mellitus. Na avaliação realizada aos 60 e 120 dias de Diabetes a diurese no grupo D foi de aproximadamente 3 vezes aquela do grupo ND. Estes resultados podem ser visualizados na figura 7.

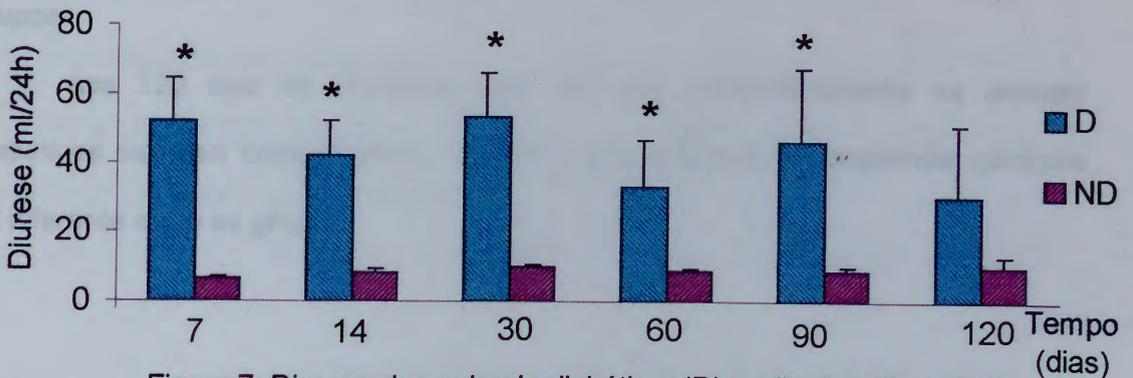


Figura 7: Diurese dos animais diabéticos(D) e não diabéticos(ND). Tempo = dias após a indução do Diabetes.* $p < 0.05$ D vs ND.

2. Respostas autonômicas cardiovasculares nos animais estudados:

A partir da seqüência temporal de registros de pressão pulsátil realizada durante 40 minutos e após uso de propranolol e atropina para cada animal, obteve-se as variáveis cardiovasculares descritas nas tabelas I, II e III.

2.1. Frequência cardíaca:

Na tabela I pode-se observar os resultados de frequência cardíaca basal, intrínseca, pós-propranolol e pós-atropina, pressão arterial sistólica, diastólica e média dos animais estudados.

Sete dias após o uso de estreptozotocina, observou-se menor frequência cardíaca basal ($p=0.04$), após atropina ($p=0.03$) e após propranolol ($p=0.009$) no grupo D quando comparado ao ND, além de uma tendência à menor frequência cardíaca intrínseca naquele grupo em comparação a este ($p=0.08$).

Após 14 dias de Diabetes, a frequência cardíaca intrínseca ainda foi menor no grupo D ($p=0.02$), mas não se observaram mais diferenças para com o grupo ND em relação às medidas basais e após atropina e propranolol.

A frequência cardíaca intrínseca apresentou o mesmo comportamento aos 30 dias de Diabetes, menor no grupo D versus ND ($p=0.02$), enquanto que as medidas basais e após atropina e propranolol mantiveram-se semelhantes entre os grupos.

Aos 120 dias de Diabetes, fase em que metabolicamente os animais diabéticos estavam compensados, nenhuma das medidas de frequência cardíaca foi diferente entre os grupos.

Tabela I: Características cardiovasculares dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) 7, 14, 30 e 120 dias após a indução do Diabetes.

	7 dias		14 dias		30 dias		120 dias	
	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND
FC (bpm)	319±20*	381±13	379±29	388±8	334±8	380±22	342±22	365±20
FCI (bpm)	405±16	490±21	377±18*	435±11	359±15*	405±9	380±8	384±15
FCP (bpm)	289±10*	395±9	340±20	372±22	311±40	377±34	324±15	340±16
FCA (bpm)	455±19*	518±7	430±18	480±13	364±41	482±29	447±55	470±20
PAS (mmHg)	140±7	139±11	138±8	145±4	119±12	139±8	126±12	150±6
PAD (mmHg)	101±7	99±6	100±7	102±5	72±18	95±6	77±18	106±6
PAM(mmHg)	120±7	118±8	108±7.5	123±4	95±15	115±7	101±14	127±6

* p < 0.05 ND vs D. FC = Frequência cardíaca; FCI = FC intrínseca; FCP = FC pós-propranolol; FCA = FC pós-atropina; PAS = Pressão arterial sistólica; PAD = Pressão arterial diastólica; PAM = Pressão arterial média.

Na tabela II pode-se observar os índices que expressam a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo: RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos R-R normais adjacentes), SDNN (desvio padrão de todos os intervalos R-R normais) e RRMED (média dos intervalos R-R normais). Destes, apenas o terceiro demonstrou ser maior no grupo D versus ND (p=0.03), enquanto que os demais apresentaram uma tendência a serem maiores naquele grupo versus este (p=0.07 para ambos), sugerindo maior variabilidade da frequência cardíaca naquele grupo.

Tabela II: Variabilidade da frequência cardíaca avaliada através dos índices de domínio do tempo nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) 7, 14, 30 e 120 dias após a indução do Diabetes.

	7 dias		14 dias		30 dias		120 dias	
	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND
RMSSD (ms)	12±2	5±1	4±0.7	4±0.5	5±0.6	7±2	5±1	6±1
SDNN (ms)	20±3	12±2	12±3	14±3	15±0.7	13±1	14±3	15±2
RRMED (ms)	199±14*	158±7	164±10	154±3	175±11	161±11	160±14	171±11

* $p \leq 0.05$ D vs ND. RMSSD = raiz quadrada média das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes; SDNN = desvio padrão de todos os intervalos RR normais; RRMED = média de todos os intervalos RR normais.

2.2. Pressão arterial:

As pressões arterial sistólica, diastólica e média não foram diferentes entre os grupos, como pode ser observado na tabela I.

A tabela III apresenta os índices que expressam a variabilidade da pressão arterial média, que são: média dos desvios padrões da pressão arterial média, semelhante entre os grupos estudados; P_1 , P_2 e MN (índices obtidos do mapa de retorno tri-dimensional), que foram menores no grupo D versus ND aos 7 dias de Diabetes ($p=0.02$ para todas as diferenças). Apenas o índice P_3 foi semelhante entre os grupos aos 7 dias de avaliação ($p=0.15$).

Os resultados indicam menor variabilidade da pressão arterial média no grupo D, o que infere maior variabilidade da frequência cardíaca, ou seja, maior controle autonômico do que os ND, o que vem ao encontro do que foi observado na avaliação da variabilidade de frequência cardíaca analisada no domínio do tempo.

No Diabetes com 14, 30 e 120 dias de duração, todas estes índices não diferiram em relação aos animais ND.

Tabela III: Variabilidade da pressão arterial média (PAM) nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) 7, 14, 30 e 120 dias após a indução do Diabetes.

	7 dias		14 dias		30 dias		120 dias	
	D	ND	D	ND	D	ND	D	ND
mDPPAM	8±0.1	5±0.03	6.6±1.2	7± 0.4	4.7±0.7	7±0.6	8±1.2	9±0.9
P₁ (UA)	52±2*	60±5	56±5	67±2	60±2	60±2	59±6	60±2
P₂ (UA)	29±2*	41±0.9	37±5	37±1	31±5	34±2	44±10	35±3
P₃ (UA)	51±4	64±6	50±3	64±2	65±11	65±3	72±23	57±7
MN (UA)	77±10*	157±30	107±19	157±11	132±47	139±14	200±82	125±29

* $p \leq 0.05$ ND vs D; mDPPAM = Média dos desvios padrões da pressão arterial média; UA=Unidades arbitrárias.

3. Carga excretada de albumina nos animais estudados:

A carga excretada de albumina foi maior no grupo D versus ND aos 7, 30 e 120 dias após estreptozotocina, o que pode ser visualizado na figura 8.

Sete dias após a indução do Diabetes, ela foi 67% maior no grupo D ($p=0.03$); 30 dias após, ela foi 33% maior neste grupo ($p=0.02$) e 120 dias após, ela atingiu valores 76% maiores no mesmo grupo em relação ao grupo ND ($p=0.04$). Embora as avaliações realizadas aos 14, 60 e 90 dias não tenham demonstrado diferenças estatísticas entre os grupos estudados, manteve-se sempre tendência à maior carga excretada de albumina no grupo diabético.

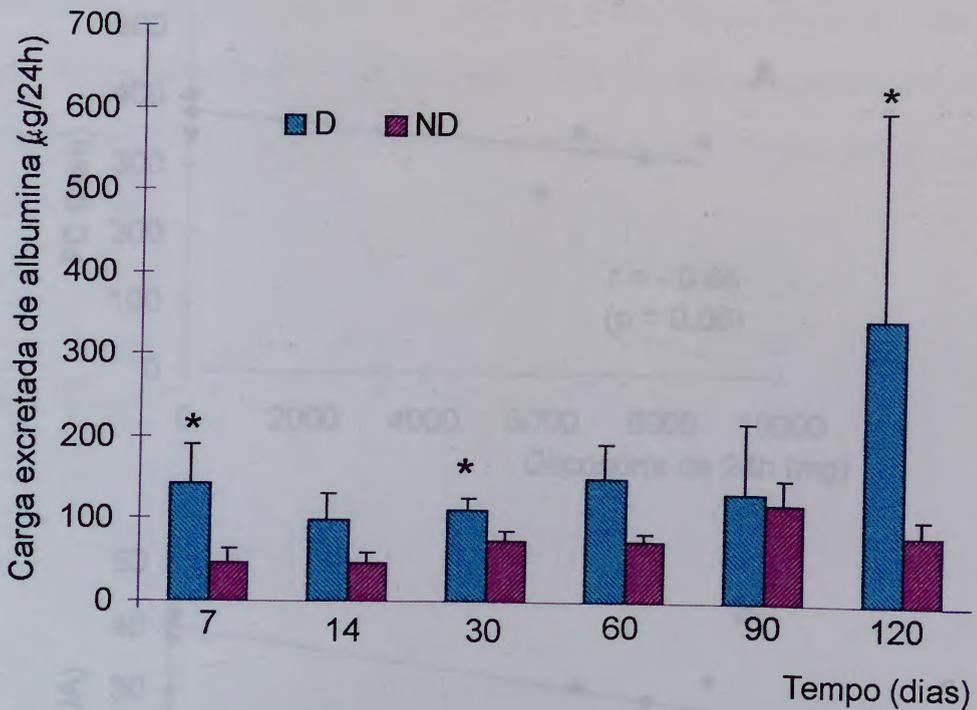


Figura 8: Carga excretada de albumina ($\mu\text{g}/24\text{h}$) nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Tempo = dias após a indução do Diabetes.
* $p < 0.05$ D vs ND.

4. Relação entre o grau de controle metabólico e as respostas cardiovasculares:

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de correlação entre a intensidade do descontrole metabólico causado pelo Diabetes de curta duração no grupo D e as variáveis cardiovasculares encontradas alteradas neste grupo aos 7 dias de experimento, buscou-se uma relação entre estas e a glicose urinária e diurese de 24h, através de regressão linear simples.

Foi observada tendência à correlação inversa entre glicose urinária de 24h e frequência cardíaca ($r = -0.65$, $p = 0.08$, figura 9A). Não houve correlação entre glicose urinária de 24h e índices P_1 e P_3 ($r = -0.59$, $p = 0.12$ para ambos). Ocorreu correlação inversa quando comparadas a glicosúria de 24h com o índice P_2 ($r = -0.85$, $p = 0.007$, figura 9B) e com o índice MN ($r = -0.73$, $p = 0.04$, figura 9C).

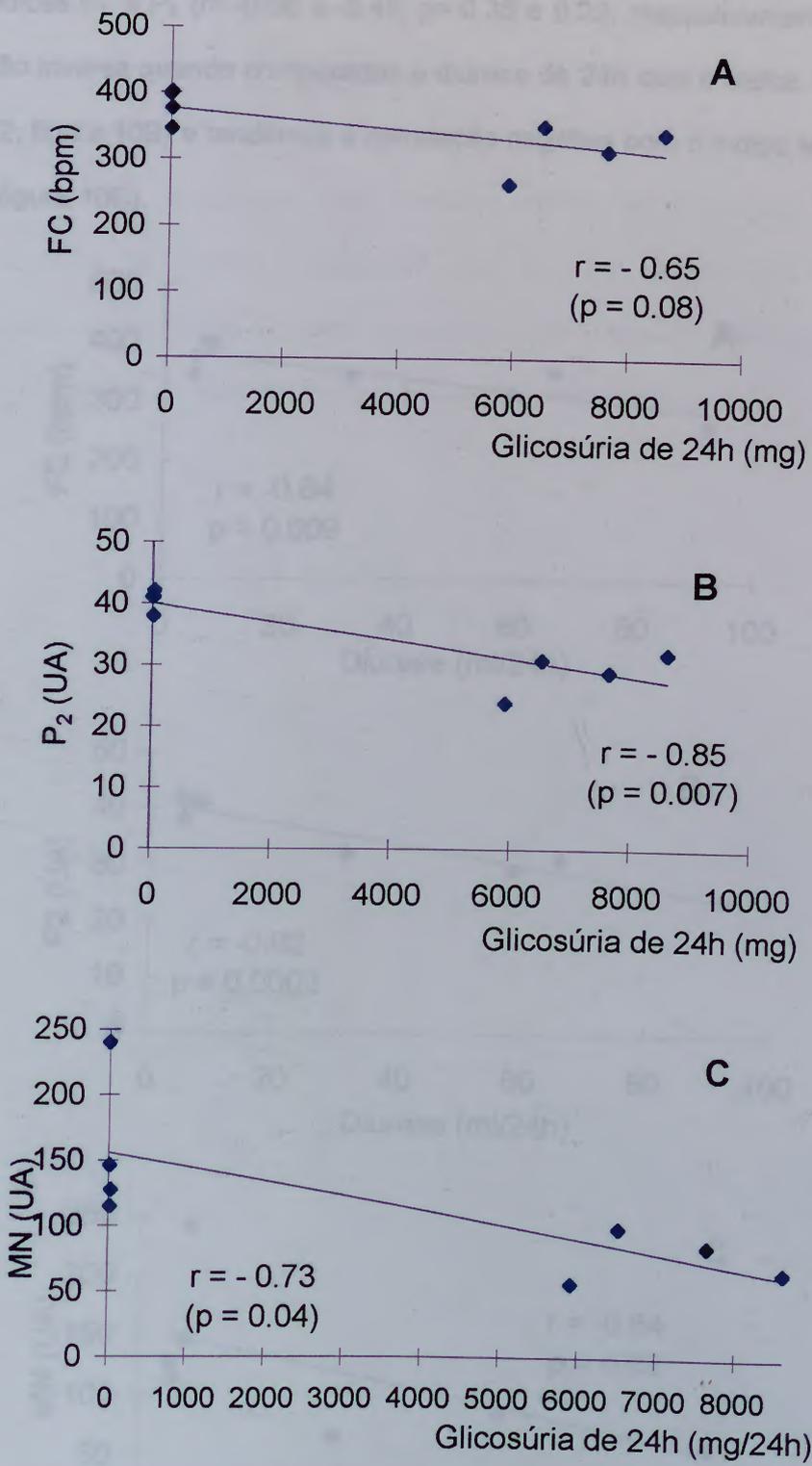


Figura 9: Correlações entre a glicosúria de 24h e a frequência cardíaca (A), índices P_2 (B) e MN (C) 7 dias após a indução do Diabetes. FC = Frequência cardíaca; UA = Unidades arbitrárias.

Observou-se correlação inversa entre a diurese de 24h e frequência cardíaca ($r = -0.84$, $p = 0.009$, figura 10A). Não houve correlação entre diurese de

24h e índices P_1 e P_3 ($r = -0.36$ e -0.48 , $p = 0.38$ e 0.22 , respectivamente). Ocorreu correlação inversa quando comparadas a diurese de 24h com o índice P_2 ($r = -0.95$, $p = 0.0002$, figura 10B) e tendência à correlação negativa com o índice MN ($r = -0.64$, $p = 0.08$, figura 10C).

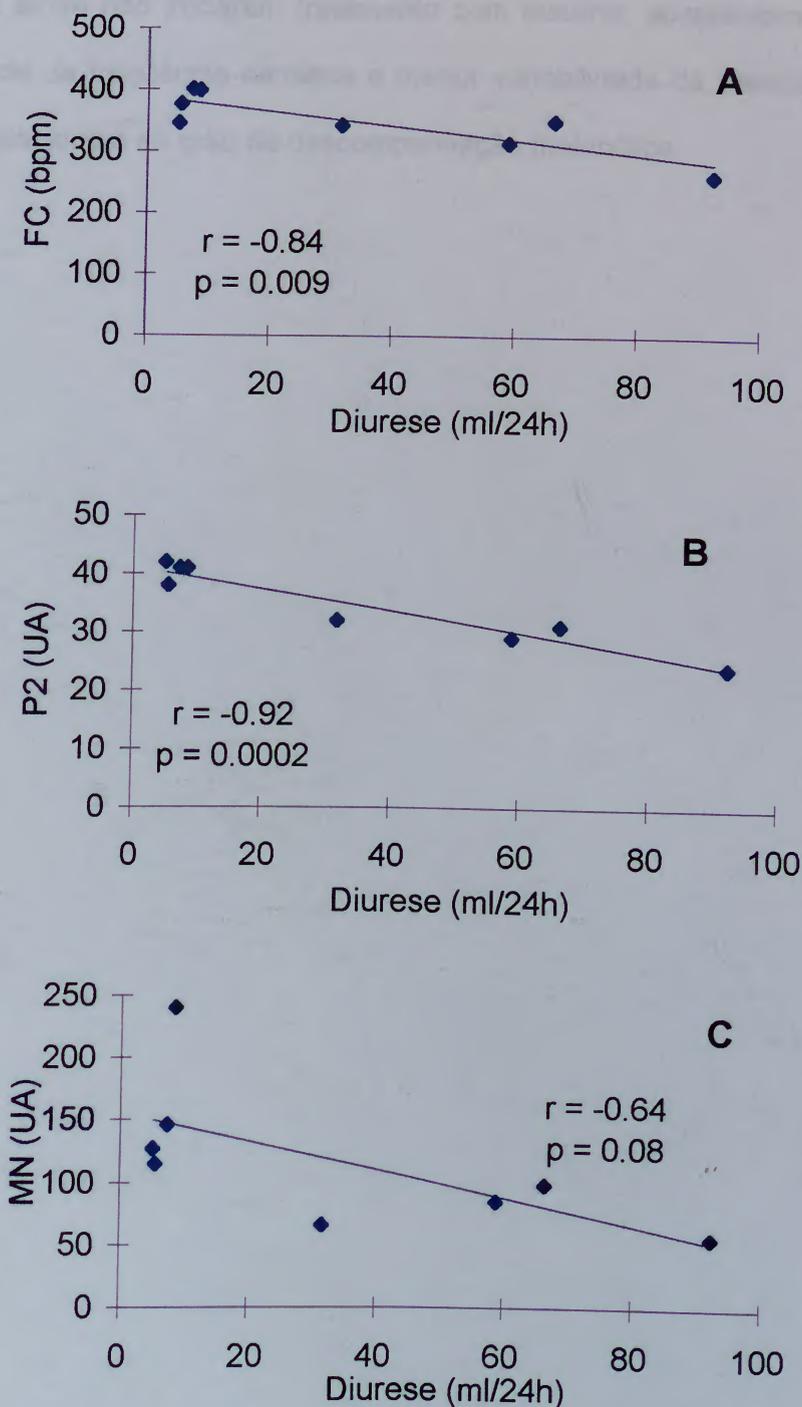


Figura 10: Correlações entre a diurese de 24h e a frequência cardíaca (A), índices P_2 (B) e MN (C) 7 dias após a indução do Diabetes. FC = Frequência cardíaca; UA = Unidades arbitrárias.

Em resumo, ratos diabéticos tratados com insulina, em fases iniciais (14 a 120 dias após estreptozotocina), não apresentam déficits autonômicos, porém já se observa aumento da excreção urinária de albumina.

No entanto, os animais com Diabetes experimental de curta duração (7 dias), que ainda não iniciaram tratamento com insulina, apresentam aumento da variabilidade da frequência cardíaca e menor variabilidade da pressão arterial, as quais se relacionam ao grau de descompensação metabólica.

*Função Autonômica e Excreção
Urinária de Albumina no Rato
Diabético não Tratado com Insulina*

Estudo II: Material e Métodos

Neste experimento os animais diabéticos não receberam tratamento com insulina.

1. Avaliação geral e metabólica:

Os animais foram avaliados quanto aos pesos semanalmente. Amostras de urina de 24h para medida de diurese e determinação de glicose foram obtidas aos 30, 45, 60 e 90 dias após a injeção de estreptozotocina ou tampão citrato de sódio. No dia em que foi realizada a canulação de vasos (45 e 90 dias após a indução do Diabetes ou tampão citrato de sódio) foi coletada amostra de sangue venoso para a determinação de glicose plasmática, que foi realizada seguindo a metodologia empregada para a glicose urinária.

2. Avaliação cardiovascular:

A avaliação cardiovascular foi realizada aos 45 e 90 dias (17 D e 17 ND) após a indução do Diabetes.

Após canuladas artéria e veia femurais no dia anterior ao estudo, os animais foram submetidos aos procedimentos: registro controle de pressão arterial e frequência cardíaca, bloqueio farmacológico dos sistemas nervoso simpático e parassimpático, avaliação dos reflexos comandados pelos pressorreceptores e da reatividade vascular, avaliação dos componentes simpático e parassimpático dos reflexos comandados pelos pressorreceptores, avaliação da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e avaliação da variabilidade da pressão arterial média.

Além da avaliação já descrita, com o objetivo de obter-se maior precisão dos valores dos intervalos R-R para também analisar a variabilidade da frequência cardíaca através do mapa de retorno tri-dimensional, realizou-se eletrocardiograma.

O registro de eletrocardiograma neste experimento foi realizado no mesmo período em que se obtinha o registro controle de pressão arterial. Para o eletrocardiograma foram confeccionados eletrodos especiais, revestidos pelo mesmo material utilizado na confecção das cânulas, os quais foram implantados no subcutâneo dos animais no final do procedimento em que eram cateterizados. Estes eletrodos foram implantados no mesmo momento cirúrgico em que foi realizada a canulação de vasos. Eram em número de 3 por animal, 2 na região torácica anterior e superior e um, terra, no dorso e foram exteriorizados próximo ao local em que eram exteriorizadas as cânulas. No dia do registro cardiovascular, os 3 eletrodos eram conectados ao cabo de eletrocardiograma e este ao condicionador de sinais, o qual era ligado por um seletor de canais à placa analógico-digital CODAS, conforme especificações descritas para o experimento I. O programa utilizado (CODAS) permitiu trabalhar também com a onda de eletrocardiograma. Desta análise, obteve-se valores de frequência cardíaca, calculada para cada batimento a partir dos períodos entre um pico e outro através do inverso do período multiplicado por 60 (segundos).

2.1. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência:

Neste estudo, a partir dos dados de frequência cardíaca obtidos nos registros de controle de 40 minutos com eletrocardiograma, foi utilizado o método proposto por Moraes e cols., 1993, para avaliar a variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência. Este consistiu na montagem de um mapa de retorno tri-dimensional, utilizando como eixo $RR_n \times [(RR_{n+1}) - (RR_n)] \times$ densidade. Para quantificar o mapa de retorno tri-dimensional, foram criados os mesmos índices já descritos, calculados da mesma forma, baseados na análise das imagens obtidas (P_1 , P_2 , P_3 and MN).

3. Avaliação da carga excretada de albumina:

Foi realizada nas amostras de urina de 24h coletadas aos 30, 45, 60 e 90 dias após a indução do Diabetes.

Estudo II: Resultados

Os animais diabéticos não tratados com insulina foram avaliados 45 e 90 dias após a indução do Diabetes. O fato das avaliações metabólica, cardiovascular e da carga excretada de albumina terem sido muito similares entre estes 2 grupos nos levou a analisá-los conjuntamente, o que constituiu o estudo II.

1. Características gerais e metabólicas dos animais estudados:

Os animais estudados apresentaram peso inicial semelhante: 252.5 ± 9.1 g (grupo D) e 245.5 ± 6.9 g (grupo ND) ($p=0.61$). Os pesos finais foram de 192.6 ± 7.0 g e 299.3 ± 6.8 g nos mesmos grupos ($p<0.001$). Pode-se observar na figura 11 estes dados e a evolução dos pesos dos animais dos 2 grupos. Pode-se visualizar que durante todo o experimento ocorreu menor peso dos animais do grupo D versus ND.

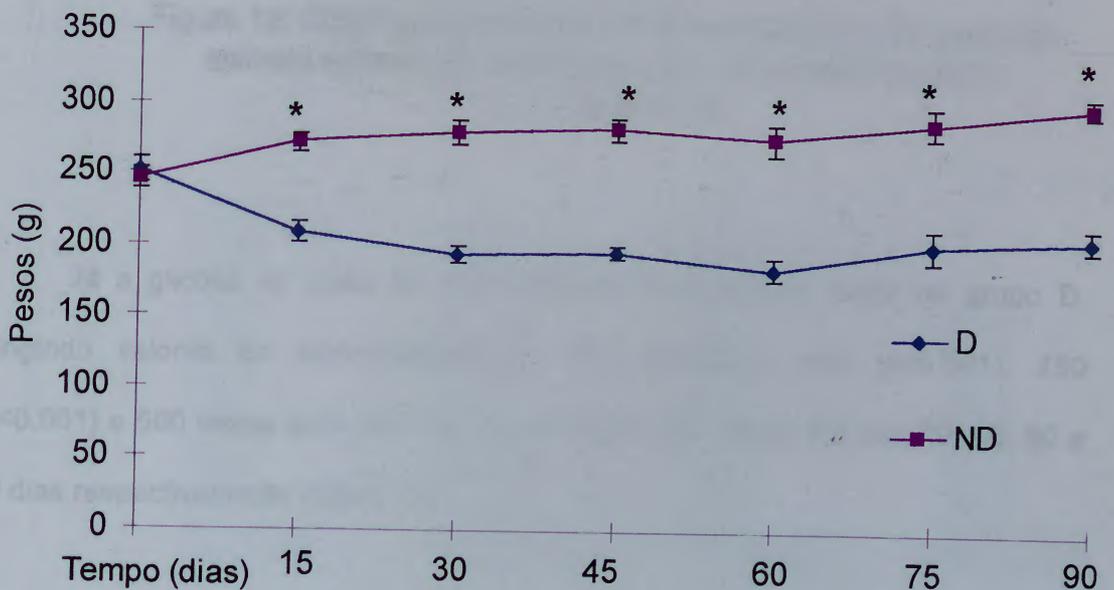


Figura 11: Pesos dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) durante o curso do estudo. Tempo = dias após a indução do Diabetes. * $p < 0.05$ D vs ND.

A glicose plasmática, medida 45 a 90 dias após a indução do Diabetes foi significativamente maior no grupo D (322.3 ± 41.8 mg%) comparativamente ao grupo ND (108.9 ± 11.7 mg%) ($p < 0.001$). Estes dados estão representados na figura 12.

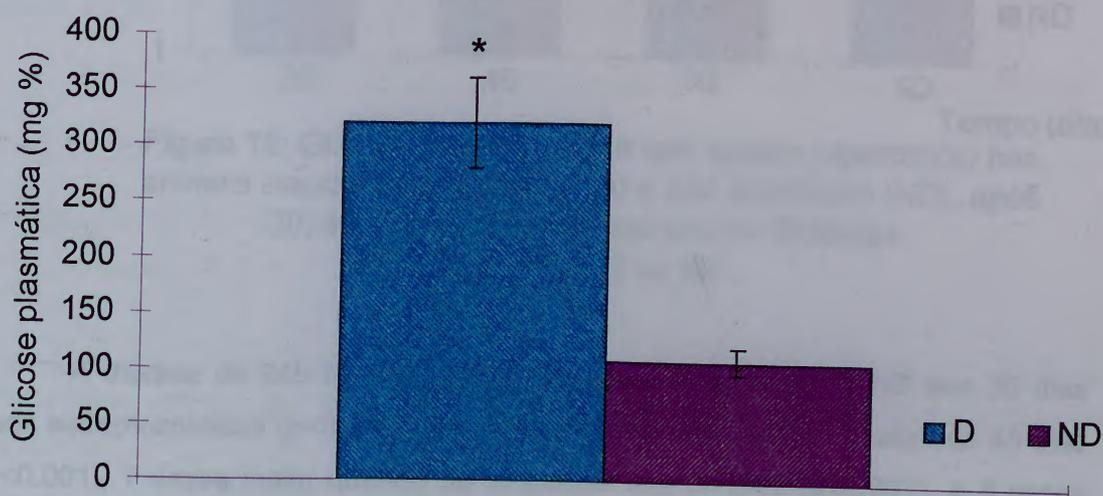


Figura 12: Glicose plasmática ao final do estudo (45-90 dias) nos animais estudados, diabéticos (D) e não diabéticos (ND).
* $p < 0.05$ D vs ND.

Já a glicose na urina de 24h apresentou-se sempre maior no grupo D, atingindo valores de aproximadamente 500 ($p < 0.001$), 900 ($p < 0.001$), 250 ($p < 0.001$) e 500 vezes ($p < 0.001$) os encontrados no grupo ND aos 30, 45, 60 e 90 dias respectivamente (figura 13).

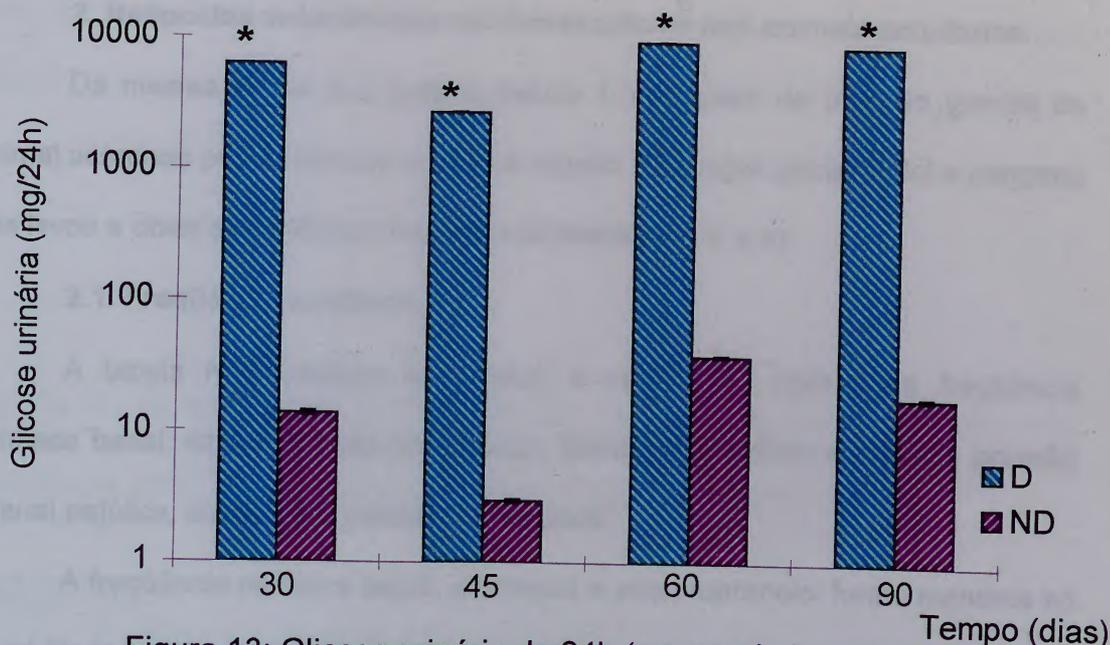


Figura 13: Glicose urinária de 24h (em escala logarítmica) nos animais estudados, diabéticos (D) e não diabéticos (ND), após 30, 45, 60 e 90 dias de indução do Diabetes. * $p < 0.05$ D vs ND

A diurese de 24h foi 5.5 vezes maior no grupo D versus ND aos 30 dias após estreptozotocina ($p < 0.001$), 3 vezes maior na avaliação realizada aos 45 dias ($p < 0.001$), 7 vezes maior quando da avaliação dos 60 dias ($p < 0.001$), e 5 vezes maior na avaliação aos 90 dias, o que pode ser visualizado na figura 14.

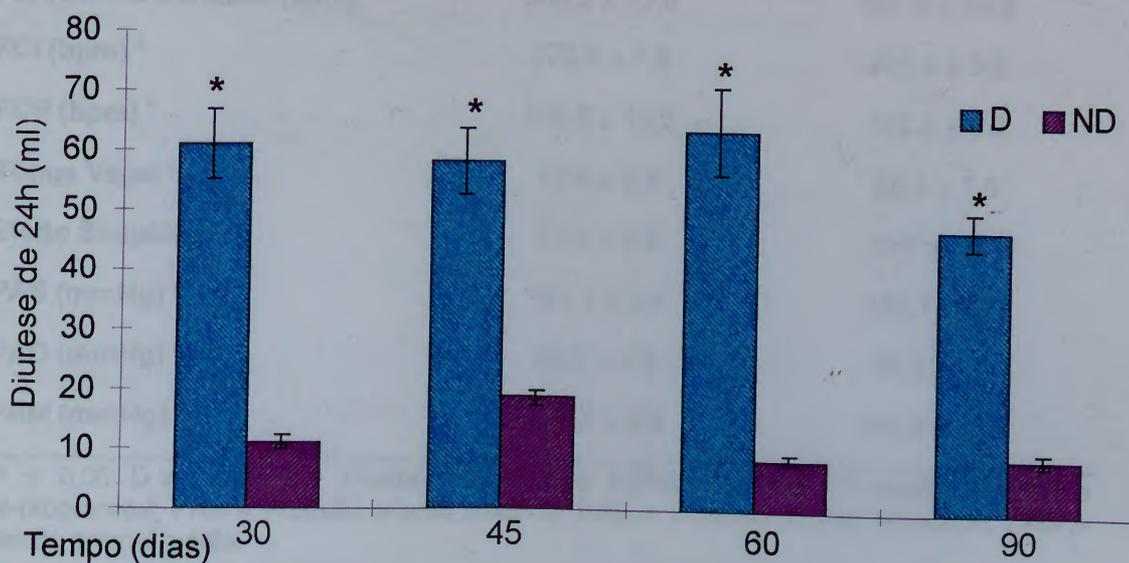


Figura 14: Diurese de 24h nos animais estudados, diabéticos (D) e não diabéticos (ND), após 30, 45, 60 e 90 dias da indução do Diabetes. * $p < 0.05$ D vs ND.

2. Respostas autonômicas cardiovasculares nos animais estudados:

Da mesma forma que para o estudo I, o registro de pressão pulsátil do animal acordado por 40 minutos e após a injeção de drogas (propranolol e atropina) nos levou a obter as variáveis descritas nas tabelas IV, V e VI.

2.1. Freqüência cardíaca:

A tabela IV apresenta as médias e seus erros padrão de freqüência cardíaca basal, intrínseca, pós-propranolol, tônus vagal, efeito simpático, pressão arterial sistólica, diastólica e média dos 2 grupos.

A freqüência cardíaca basal, intrínseca e pós-propranolol foram menores no grupo D versus ND ($p=0.003$, $p<0.001$ e $p=0.001$, respectivamente), assim como as medidas de tônus vagal ($p<0.001$) e do efeito simpático ($p=0.04$).

Tabela IV: Características cardiovasculares de repouso dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) 45 a 90 dias após a indução do Diabetes.

	D	ND
Freqüência Cardíaca (bpm) *	300.2 ± 13.6	357.9 ± 10.6
FCI (bpm) *	275.4 ± 7.6	391.4 ± 5.2
FCP (bpm) *	270.8 ± 13.2	322.6 ± 9.2
Tônus Vagal *	12.6 ± 2.4	68.5 ± 7.5
Efeito Simpático *	21.9 ± 5.8	55.7 ± 10.4
PAS (mmHg) *	121.1 ± 3.4	140.7 ± 2.3
PAD (mmHg)	89.2 ± 2.8	93.8 ± 1.7
PAM (mmHg) *	105.7 ± 2.9	114.2 ± 10.6

* $P \leq 0.05$ D vs ND. FCI = Freqüência cardíaca intrínseca; FCP = Freqüência cardíaca pós-propranolol; PAS = Pressão arterial sistólica; PAD = Pressão arterial diastólica; PAM = Pressão arterial média.

A variabilidade da freqüência cardíaca foi menor no grupo D versus ND, quando avaliada pelos índices de domínio do tempo RMSSD ($p=0.03$) e RRMED

($p=0.008$), observando-se tendência a um menor SDNN ($p=0.09$) naquele grupo (Tabela V). No entanto, quando avaliada no domínio da frequência, pelos índices obtidos do mapa de retorno tri-dimensional, a variabilidade da frequência cardíaca não foi diferente entre os grupos (Tabela VI).

Tabela V: Variabilidade da frequência cardíaca avaliada através dos índices no domínio do tempo nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) 45 a 90 dias após a indução do Diabetes.

	D	ND
RMSSD (ms) *	4.17 ± 4.1	6.01 ± 0.5
SDNN (ms)	11.08 ± 3.7	14.85 ± 1.3
RRMED (ms) *	213.62 ± 1.8	170.98 ± 5.2

* $p < 0.05$ D vs ND. RMSSD = raiz quadrada média das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes; SDNN = desvio padrão de todos os intervalos RR normais; RRMED = média de todos os intervalos RR normais

Tabela VI: Variabilidade da frequência cardíaca (FC) avaliada através dos índices no domínio da frequência nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) 45 a 90 dias após a indução do Diabetes.

	D	ND
P ₁ (UA)	63.8 ± 5.7	62.1 ± 2.8
P ₂ (UA)	37.7 ± 3.7	39.3 ± 2.6
P ₃ (UA)	68.6 ± 5.7	74.6 ± 6.7
MN (UA)	161.0 ± 29.5	178.6 ± 33

UA = unidades arbitrárias.

2.2. Pressão arterial:

A pressão arterial diastólica também não diferiu entre os grupos, como pode ser observado na tabela IV ($p=0.15$). No entanto, a pressão arterial sistólica e

média foram menores no grupo D em comparação ao ND ($p < 0.001$ e $p = 0.01$, respectivamente).

A variabilidade da pressão arterial média, avaliada pelos índices P_2 , P_3 e MN do mapa de retorno tri-dimensional e pela média dos desvios padrões da pressão arterial média foi menor no grupo D versus ND ($p = 0.001$, 0.004 , 0.007 e 0.01 , respectivamente). Não houve diferença entre os grupos quanto ao índice P_1 ($p = 0.16$) (tabela VII).

Tabela VII: Variabilidade da pressão arterial média (PAM) nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) 45 a 90 dias após a indução do Diabetes.

	D	ND
mDPPAM *	5.7 ± 0.4	6.9 ± 0.3
P_1 (UA)	50.7 ± 3.9	59.3 ± 2.5
P_2 (UA) *	30.4 ± 1.3	35.7 ± 0.9
P_3 (UA) *	50.0 ± 3.9	66.2 ± 3.5
MN (UA) *	84.4 ± 15.1	145.8 ± 14.2

* $p < 0.05$ D vs ND. mDPPAM = Média dos desvios padrões da PAM; UA = Unidades arbitrárias.

2.3. Reflexos comandados pelos pressorreceptores:

Quanto aos reflexos comandados pelos pressorreceptores (bradi e taquicardia reflexas), observou-se resposta bradicárdica à fenilefrina e taquicárdica ao nitroprussiato de sódio semelhantes entre os grupos (figura 15), assim como quando foram avaliadas após bloqueio simpático com propranolol (figura 16).

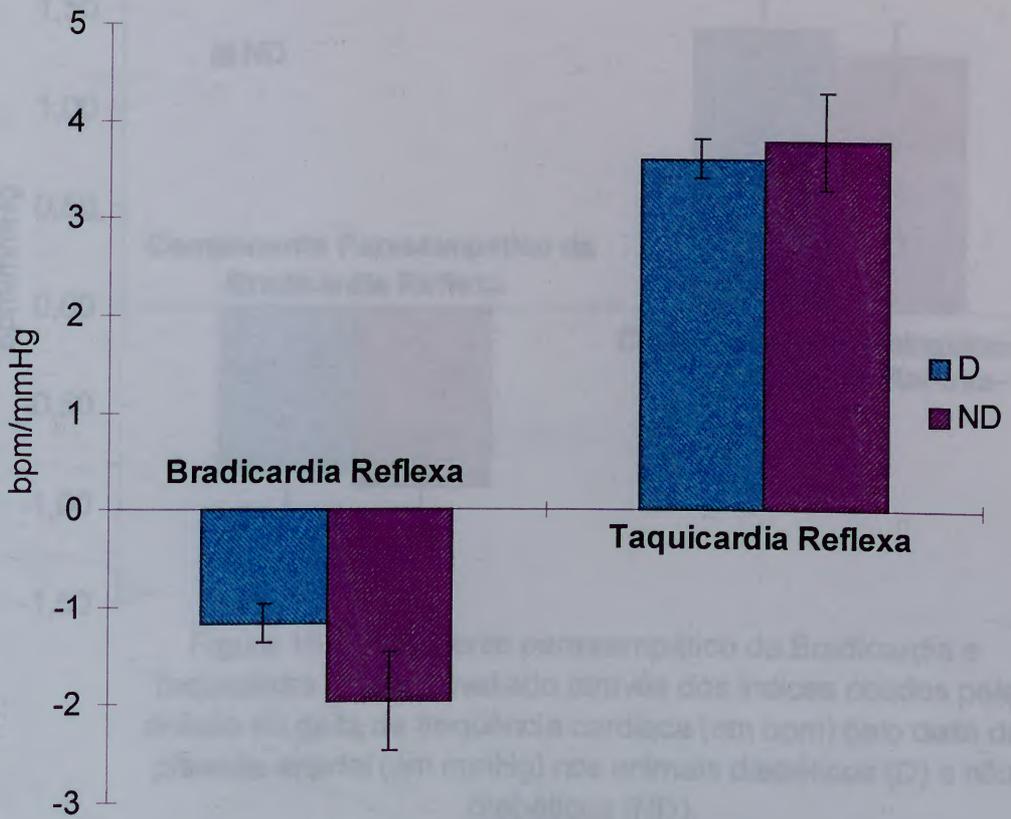


Figura 15: Bradicardia e Taquicardia reflexas avaliadas através dos índices obtidos dividindo delta de frequência cardíaca (em bpm) pelo delta de pressão arterial (em mmHg) nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND).

2.4. Resistência vascular

Também a resistência vascular, avaliada pela resposta pressora às doses crescentes de fenilefrina após o teste bloqueio simpático com propranolol (Figura 17) e depressão da resposta pressora do nitroglicerina de 200µg, também arde em após o uso de insulina única (Figura 18) foi semelhante entre os 2 grupos estudados.

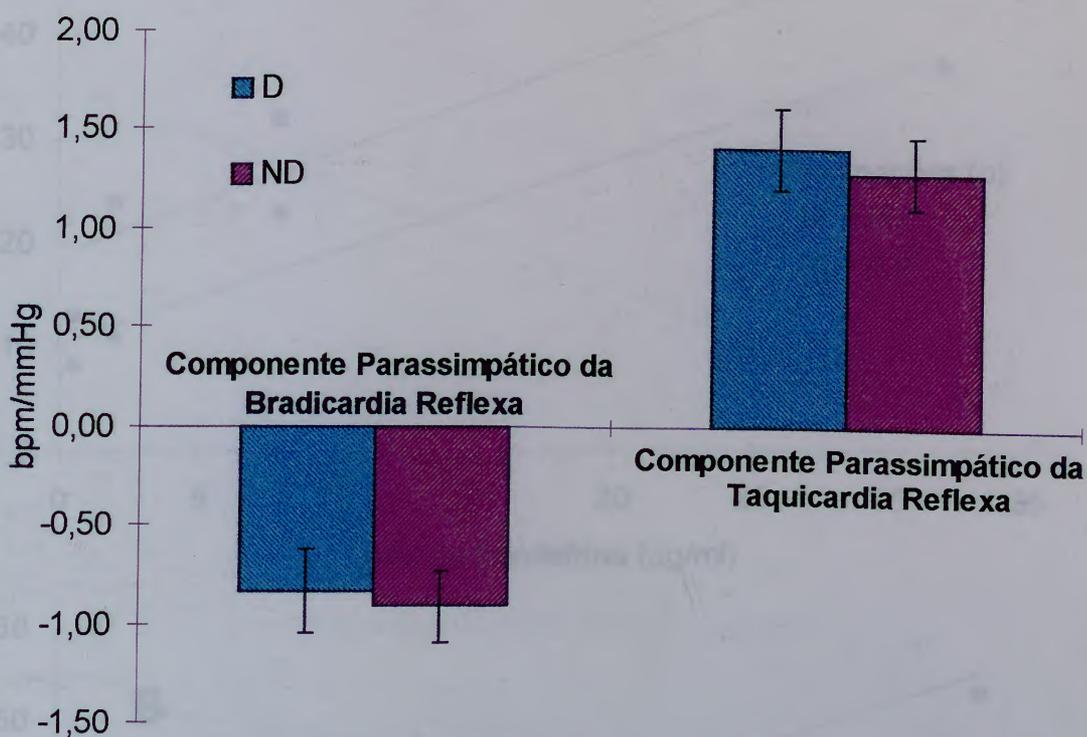


Figura 16: Componente parassimpático da Bradicardia e Taquicardia reflexas avaliado através dos índices obtidos pela divisão do delta de frequência cardíaca (em bpm) pelo delta de pressão arterial (em mmHg) nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND).

2.4. Reatividade vascular:

Também a reatividade vascular, avaliada pela resposta pressora às doses crescentes de fenilefrina antes e após bloqueio simpático com propranolol (Figura 17) e depressora às doses crescentes de nitroprussiato de sódio, também antes e após o uso da mesma droga (Figura 18) foi semelhante entre os 2 grupos estudados.

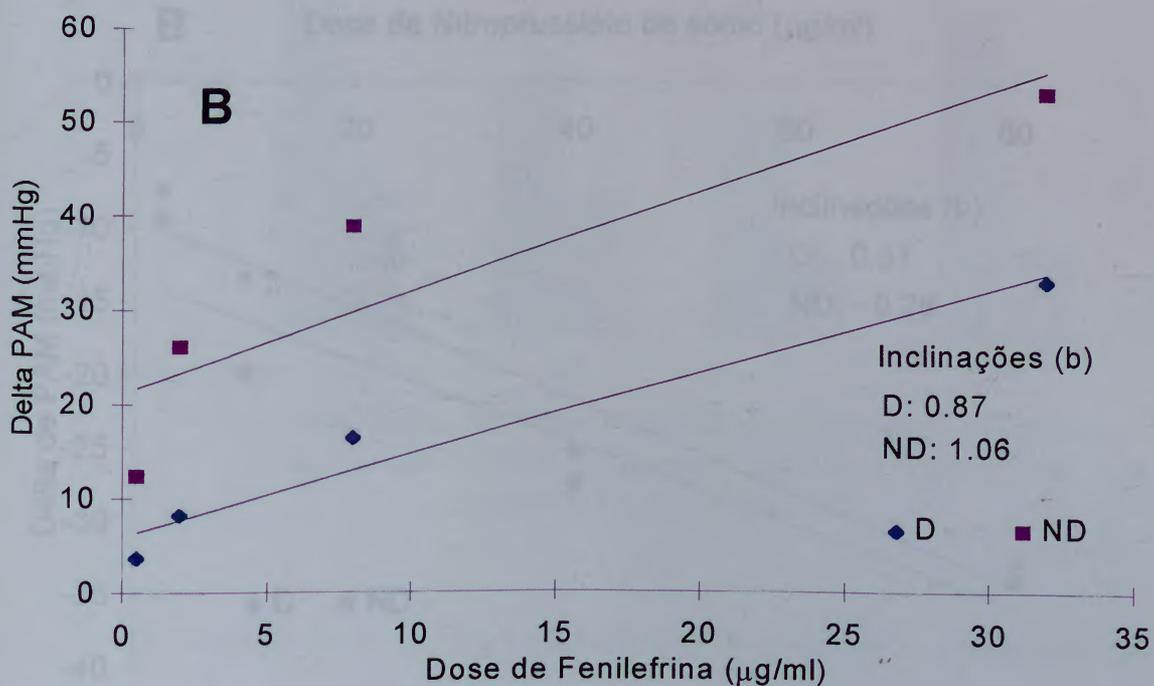
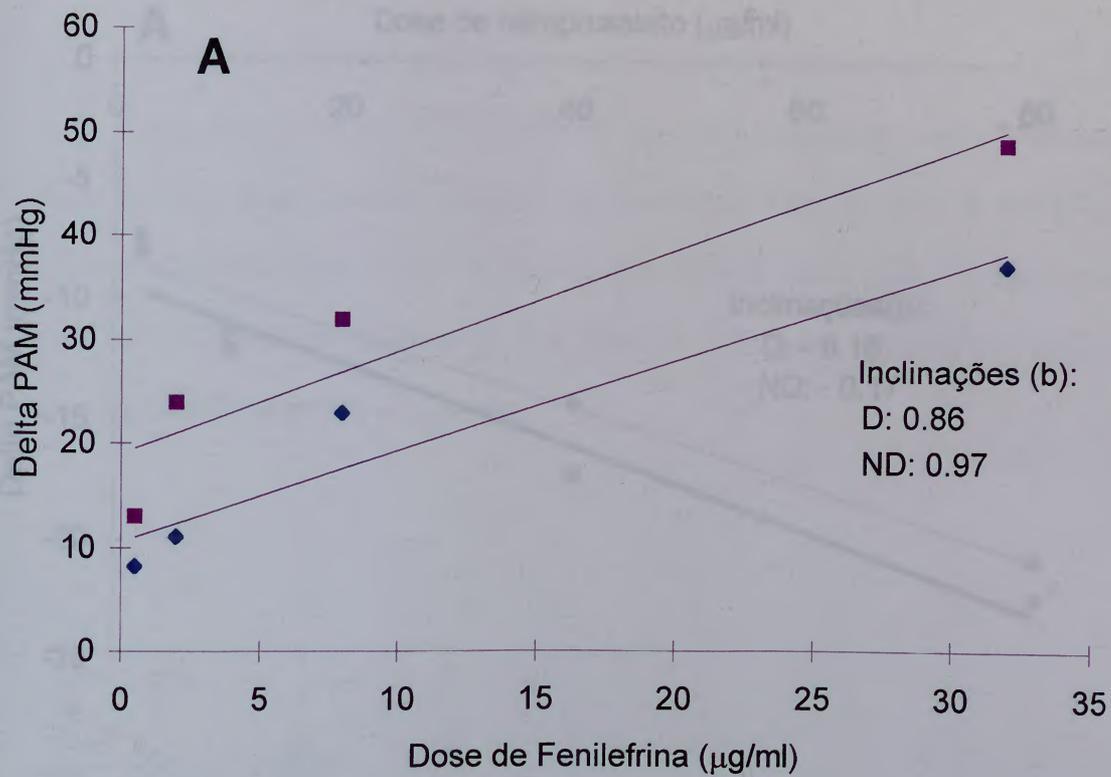


Figura 17 : Resposta pressora à injeção de doses crescentes de fenilefrina nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND), antes (A) e após (B) o bloqueio simpático com propranolol.

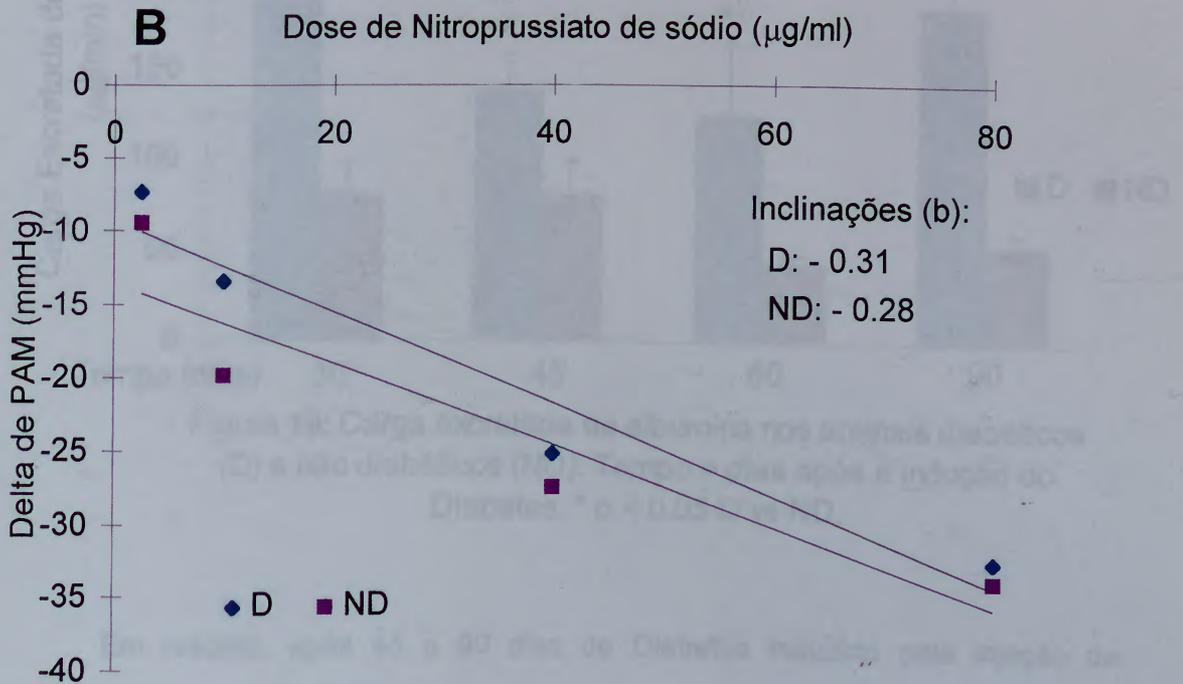
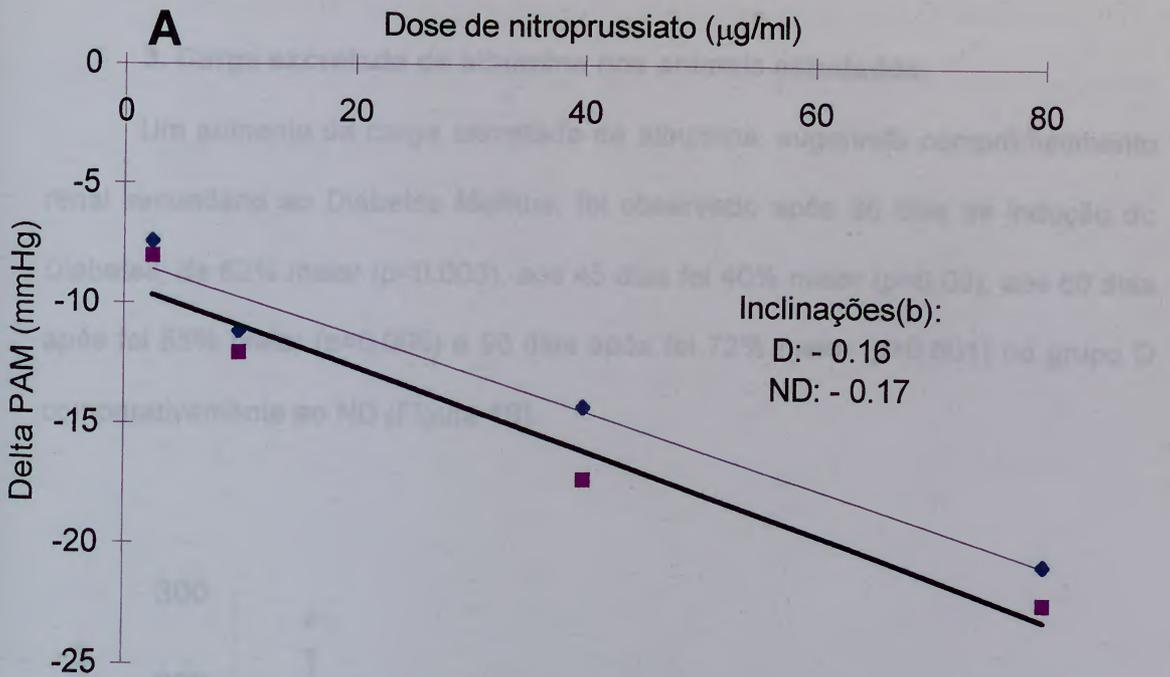


Figura 18: Resposta depressora à injeção de doses crescentes de nitroprussiato de sódio nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) antes (A) e após (B) bloqueio simpático com propranolol.

3. Carga excretada de albumina nos animais estudados:

Um aumento da carga excretada de albumina, sugerindo comprometimento renal secundário ao Diabetes Mellitus, foi observado após 30 dias de indução do Diabetes, de 62% maior ($p < 0.003$), aos 45 dias foi 40% maior ($p = 0.03$), aos 60 dias após foi 65% maior ($p = 0.005$) e 90 dias após foi 72% maior ($p < 0.001$) no grupo D comparativamente ao ND (Figura 19).

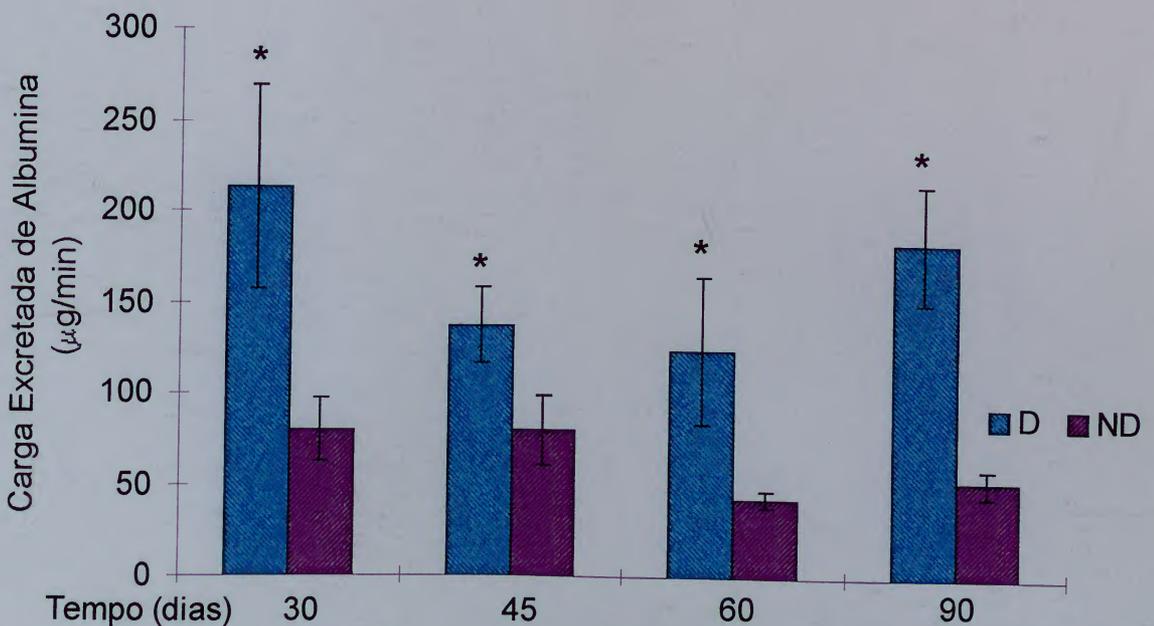


Figura 19: Carga excretada de albumina nos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND). Tempo = dias após a indução do Diabetes. * $p < 0.05$ D vs ND.

Em resumo, após 45 a 90 dias de Diabetes induzido pela injeção de estreptozotocina (sem tratamento com insulina) observou-se menor tônus vagal, menor efeito simpático e menor variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, alterações provavelmente secundárias à disfunção do sistema nervoso autônomo determinadas pelo Diabetes.

O Diabetes também induziu aumento da carga excretada de albumina, mais evidente do que no estudo I, quando os animais estavam em melhores condições metabólicas (tratados com insulina).

*Efeitos da Desnervação Renal Bilateral
sobre a Excreção Urinária de
Albumina e Expressão dos
Transportadores de Glicose no Rim de
Ratos Normais
e com Diabetes Mellitus*

Estudo III: Material e Métodos

Assim como no anterior, neste experimento os animais diabéticos não receberam tratamento com insulina.

Trinta dias após terem recebido estreptozotocina ou tampão citrato de sódio, os animais foram submetidos à desnervação renal bilateral (DR) ou cirurgia fictícia, de forma que constituíram-se 4 grupos experimentais distintos: diabéticos desnervados (D-DR, n=7), diabéticos não desnervados (D, n=6), não diabéticos desnervados (ND-DR, n=5) e não diabéticos não desnervados (ND, n=8).

Os animais foram avaliados quanto às condições metabólicas e carga excretada de albumina antes e 15 dias após a desnervação renal (30 e 45 dias de Diabetes). No dia seguinte foram sacrificados para a retirada dos rins, onde foram determinadas as proteínas GLUT 1 e 2 em córtex e medula.

Em relação à escolha de tempo de desnervação renal de 15 dias para avaliar seu efeito sobre as variáveis estudadas, foi baseada em dados de literatura, que sugerem a possibilidade de reinervação após este período (Kline e Mercer, 1980).

1. Avaliação geral e metabólica:

Os animais foram avaliados quanto aos pesos semanalmente. Amostras de urina de 24h para medida de diurese e determinação de glicose foram obtidas aos 30 e 45 dias após a injeção de estreptozotocina ou tampão citrato de sódio. Previamente ao sacrifício dos animais (45 dias de Diabetes), foi coletada amostra de sangue venoso para a determinação de glicose plasmática.

2. Desnervação renal:

Este procedimento foi realizado conforme Oliveira e cols., 1992 e Greenberg e Osborn (1994), com modificações. Após anestesiados com éter etílico, foi

realizada uma incisão transversal no flanco, paralela às costelas, cortando-se a pele e a musculatura. Com o auxílio de afastadores (confeccionados com fio metálico recoberto de um tubo de polietileno), foi visualizado o tecido adiposo que recobre o rim (situado na região dorsal do animal). Utilizando-se uma pinça delicada, levantou-se o tecido adiposo e isolou-se o rim, sempre manipulando o tecido adiposo, de forma a não manusear diretamente o rim; ainda desta forma, colocou-se, com cuidado, um afastador que tracionava o rim para a região ventral do animal, sem obstruir o fluxo sanguíneo por artéria e veia renais. Com auxílio de lupa (modelo M90, d.f. Vasconcellos, com aumento de 1 x 16), visualizou-se a artéria renal, fazendo-se a retirada mecânica da adventícia (e inervação) que envolve a artéria renal da sua origem, na aorta abdominal, até o hilo; o mesmo procedimento foi feito com a veia renal. Seguiu-se a desnervação química, passando-se sobre a artéria um pequeno pedaço de algodão previamente embebido em fenol 20% diluído em etanol. O mesmo procedimento foi realizado no outro rim. Ao término destes procedimentos, realizou-se a sutura da musculatura e da pele, colocando-se o animal sob fonte de calor até seu total restabelecimento.

3. Avaliação da carga excretada de albumina:

Foi realizada nas amostras de urina de 24h coletadas aos 30 e 45 dias após a indução do Diabetes.

4. Avaliação da efetividade da simpatectomia cirúrgica:

A quantificação de catecolaminas renais reflete uma medida direta de liberação destas pelos nervos renais. Uma amostra dos animais trabalhados foi utilizada para a quantificação de noradrenalina, a partir de partes de tecido. Para tanto, foram estudados 5 animais ND e 7 animais ND-DR, 15 dias após a cirurgia de desnervação renal ou fictícia. Estes animais foram sacrificados por desnucamento cervical, e imediatamente retirados os rins. A cápsula renal foi

retirada e os rins colocados em tubos estéreis previamente identificados, os quais foram mergulhados em nitrogênio líquido. Posteriormente estes tubos foram mantidos em freezer -70°C até o processamento da dosagem tecidual de noradrenalina, a qual foi realizada no Laboratório do InCor-USP.

Os níveis de noradrenalina renal foram determinados como descrito por Karlsson e cols. (1988). Amostras de tecido de 100 mg foram homogeneizadas em ácido perclórico 0.1 M. Após a remoção protéica pela adição de Tris-HCl (pH 8.6), os extratos foram agitados por 20 minutos com 10 mg de alumina (Sigma) reativada por lavagem com ácido. O padrão interno utilizado foi dihidroxibenzilamina. Após deposição da alumina, as catecolaminas foram eluídas com ácido perclórico 0.1 M. A noradrenalina foi isolada dos eluados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa. A noradrenalina e o padrão foram quantificados com detector eletroquímico. Os valores são expressos em $\text{pg}/\mu\text{g}$ de proteínas não colagenosas.

A noradrenalina renal foi em média 130 vezes menor nos animais ND-DR quando comparada aos controles (ND), o que pode ser visualizado na figura 20.

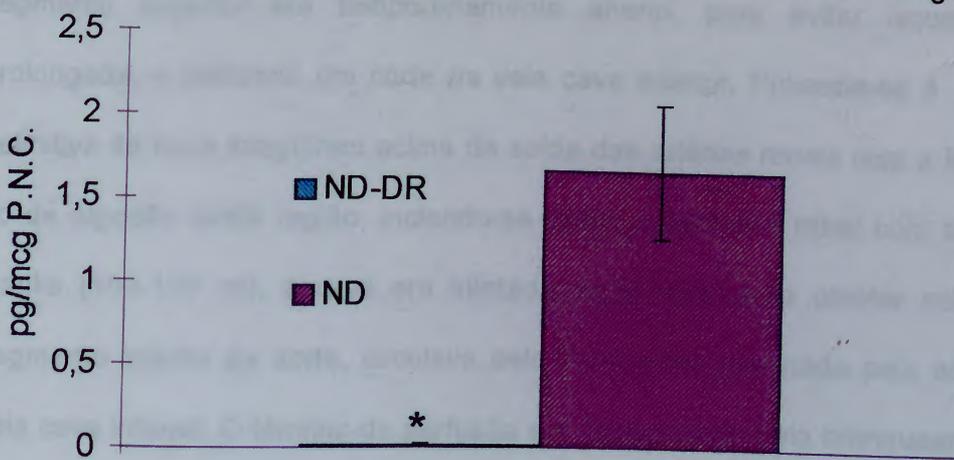


Figura 20: Noradrenalina renal nos animais não diabéticos (ND) e após desnervação renal (DR).

* $p < 0.001$ ND vs ND-DR.

5. Retirada dos rins para determinação dos transportadores de glicose:

Quinze dias após o procedimento cirúrgico de deservação renal ou cirurgia fictícia, os animais foram anestesiados com tiopental (diluído na proporção de 1g para 40 ml de solução fisiológica estéril), EV, na dose de 20 mg/kg. Os animais eram então posicionados em decúbito ventral, sendo então realizada uma ampla incisão retangular incluindo em profundidade o peritônio. Ao rebater a pele para cima, o interior do abdômen ficava totalmente exposto, sendo possível dissecar a aorta num segmento inferior, abaixo da saída das artérias renais, e num segmento superior, acima da saída das mesmas artérias. Ambos os segmentos foram reparados com 2 fios de algodão cada. Foi então utilizado um oclisor confeccionado com os mesmos materiais que os afastadores descritos previamente, para ocluir temporariamente o segmento superior da aorta. Rapidamente voltava-se ao segmento inferior, era realizado um pequeno corte na parede anterior da artéria e introduzida uma cânula de polietileno de diâmetro PE-50, a qual era fixada nesta posição com o outro fio de algodão. O oclisor do segmento superior era temporariamente aberto, para evitar isquemia renal prolongada, e realizado um corte na veia cava inferior. Procedia-se à obstrução definitiva do fluxo sangüíneo acima da saída das artérias renais com a ligadura do fio de algodão desta região, iniciando-se então a perfusão renal com solução de Hanks (100-150 ml), a qual era injetada lentamente pelo catéter colocado no segmento inferior da aorta, circulava pelos rins e era eliminada pela abertura na veia cava inferior. O término da perfusão era determinado pelo branqueamento dos rins. Seguia-se a retirada de ambos os rins, retirada de suas cápsulas, separação e pesagem de córtex e medula através de manipulação com pinça e tesoura delicadas, com manutenção em embalagens separadas de cada uma destas

porções em freezer -70°C (Bio Freezer-modelo 8425, Forma Scientific Inc., USA) até o processamento da análise dos transportadores de glicose.

6. Avaliação dos transportadores de glicose no rim (GLUT 1 e GLUT 2):

A quantificação dos transportadores de glicose GLUT 1 e GLUT 2 foi realizada por "Western blotting", como descrito por Timmons e Dunbar em 1990, o primeiro em medula e córtex, e o segundo em córtex dos rins dos 4 grupos de animais descritos. O método envolve os seguintes passos:

6.1. Preparo das amostras:

As amostras foram homogeneizadas em tampão que consistiu de TRIS (10 mM), EDTA (1mM) e sacarose (250 mM) na proporção peso:volume de 1:6, utilizando-se Polytron. Posteriormente o homogeneizado foi centrifugado a 2000 x g por 15 min. O sobrenadante separado foi então recentrifugado (12000 x g, 20 min) e o precipitado final ressuspenso no tampão, sendo considerada uma fração enriquecida em fragmentos de membrana plasmática.

6.2. "SDS-PAGE" ("Sodium Dodecil Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis"):

O primeiro passo do "Western Blotting" consistiu em submeter as amostras à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Através deste método, foi possível separar proteínas de acordo com seu peso molecular, sem que as unidades protéicas fossem perdidas, o que permitiu estudos posteriores nestas frações protéicas. O método utilizado foi desenvolvido por Laemmli e modificado por Garfin, 1990. O mesmo envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos, mas diferentes: o gel de resolução (stacking gel 6% T, 2.7% C) e o gel de separação (10% T, 2.7 % C). Amostras de frações de membranas (20-40 mg de proteína/poço, dependendo da amostra) foram solubilizadas em tampão de Laemmli (Tris 0.5 M pH 7.5; SDS 9%; glicerol 15%; bromofenol blue 0.05%; 2-mercaptoetanol 6%) e

então, submetidas à fervura durante 2 minutos para posterior aplicação no sistema de corrida. A constituição do gel de resolução foi: acrilamida 5.8%, bisacrilamida 0.16%, Tris HCl 150 mM pH 6.8, EDTA 2.5 mM, SDS 0.1%, TEMED 0.05% e persulfato de amônio 0.06%. A constituição do gel de separação foi: acrilamida 9.7%, bisacrilamida 0.3%, Tris HCl 375 mM pH 8.9, EDTA 2.0 mM, SDS 0.125%, TEMED 0.05% e persulfato de amônio 0.05%. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 60 mA, durante cerca de 5 horas, utilizando-se como tampão de corrida Tris HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, EDTA 2 mM, pH 8.3. Com o objetivo de localizar a proteína desejada para o estudo, juntamente com as amostras sempre foi colocado um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares (marcadores).

6.3. "Electrophoretic transfer":

Após a separação das frações protéicas em gel de poliacrilamida, foi feita a transferência eletroforética destas frações para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (Amersham ®, Pure NC, Supported). A transferência foi realizada sob corrente constante de 25 mA, "overnight" a 4°C, utilizando-se como tampão de transferência Tris HCl 12.5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8.3. A qualidade da transferência foi avaliada corando-se o gel pós-transferência com azul brilhante de Coomassie. Esta metodologia é baseada em Timmons e Dunbar (1990).

6.4. "Immunoblotting":

Após a transferência eletroforética, iniciou-se o processo de imunodeteção de proteínas específicas, conforme o anticorpo utilizado. A membrana de nitrocelulose foi primeiramente incubada na presença de PBS pH 7.2 (NaCl 0.8%, Na₂HPO₄.(12H₂O) 0.115%, KCl 0.02%, KH₂PO₄ 0.02%) acrescido de BSA 6% durante 30 minutos à temperatura ambiente, em agitação constante e, então, foi incubada na presença de um primeiro anticorpo, anti-GLUT 1, em estufa a 37°C

durante 2 horas. O anticorpo anti-GLUT 1 utilizado foi um soro de coelho "New Zealand" imunizado com um peptídeo sintético de 12 aminoácidos correspondente à seqüência carboxi-terminal da proteína transportadora GLUT 1 de ratos. Este anticorpo já foi previamente utilizado, tendo sido demonstrada alta reatividade (Machado e cols, 1994). Posteriormente, foram realizadas cinco lavagens da membrana de nitrocelulose cada uma com 100 mL de tampão PBS, durante 15 minutos. A membrana foi então incubada durante 2 horas com proteína A marcada com I^{125} (Affinity Purified Protein A- I^{125} 38 mCi/mg, obtido do Amersham International Buckinghamshire, England) sendo utilizados 1.5 mCi/50 mL de PBS adicionado de BSA 6%. A proteína A- I^{125} liga-se especificamente a regiões FC de imunoglobulinas, marcando as moléculas de anticorpo anti-GLUT 1. Novamente, foram realizadas 5 lavagens da membrana de nitrocelulose cada uma com 100 mL de PBS acrescido de TRITON X 100 1%, com duração de cinco minutos cada lavagem.

Por fim, a membrana de nitrocelulose foi exposta a Hyperfilm ® (High Performance Radiography Film-Amersham), durante 5 dias, a -70°C . O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX (KODAK BRASILEIRA-Companhia e Indústria Ltda.), sendo na revelação evidenciados os "blots" correspondentes à proteína transportadora GLUT 1. A quantificação da proteína transportadora foi realizada através da análise densitométrica dos "blots" da autorradiografia, e os resultados expressos em Unidades Arbitrárias/ μg de proteína submetida à eletroforese.

Os mesmos procedimentos foram realizados para avaliação do GLUT 2, utilizando-se anticorpo específico desenvolvido a partir de imunização de coelho "New Zealand" com o decapeptídeo sintético correspondente à seqüência carboxi-terminal do GLUT 2 de rato.

A isoforma GLUT 2 foi avaliada em amostras de córtex renal, devido à sua ocorrência específica em segmento S1 do túbulo proximal. A isoforma GLUT 1 foi avaliada em amostras de córtex e medula renais, devido à sua ocorrência específica nas células mesangiais e em segmentos S3 do túbulo proximal.

Para que o GLUT 1 fôsse detectável em córtex renal foram utilizadas maiores quantidades das amostras de tecido cortical (200 µg), e ao final os resultados foram corrigidos para a quantidade de amostra utilizada no experimento relatado anteriormente para a mesma proteína, mas em medula renal (100 µg).

Estudo III: Resultados

1. Características gerais e metabólicas dos animais estudados:

A figura 21 representa os pesos dos animais estudados. O peso inicial foi semelhante entre os grupos: 260.6 ± 6.5 , 240.5 ± 10.9 , 250.3 ± 3.8 e $250.6 \pm 11.9g$ ($p=0.54$) para os animais nos grupos D-DR, D, ND-DR e ND, respectivamente. A partir daí, o peso dos animais não diabéticos foi sempre maior do que o dos diabéticos. Não houve diferença entre o peso dos grupos desnervados e não desnervados, tanto diabéticos, como controles, em nenhuma das avaliações realizadas após o procedimento cirúrgico.

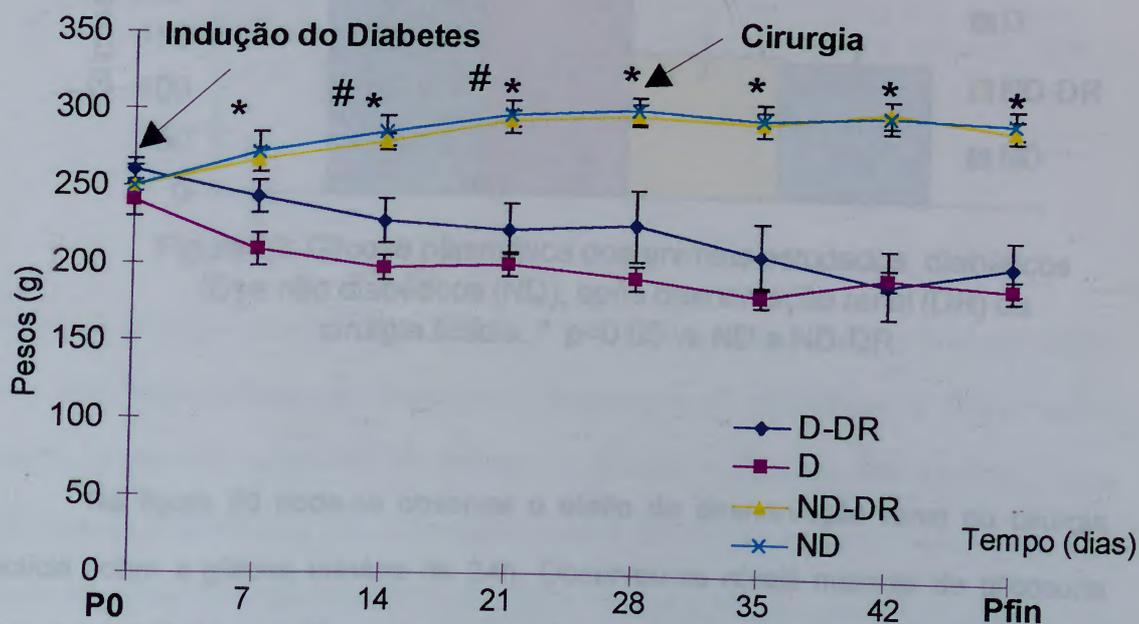


Figura 21: Pesos dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND), inicial (P0) e semanal após a indução do Diabetes até a cirurgia de desnervação renal (DR) ou fictícia e ao final do experimento (Pfin).
* $p < 0.05$ D vs ND; # $p < 0.05$ D-DR vs D.

A glicose plasmática foi significativamente maior nos grupos diabéticos (D-DR: 402.3 ± 46.3 e D: 409.2 ± 52.6 mg%) comparativamente aos grupos não diabéticos (ND-DR: 139.5 ± 18.3 e ND: 132.3 ± 16.1 mg%) ($p < 0.001$), não diferindo entre desnervados e seus respectivos controles. Estes dados estão representados na figura 22.

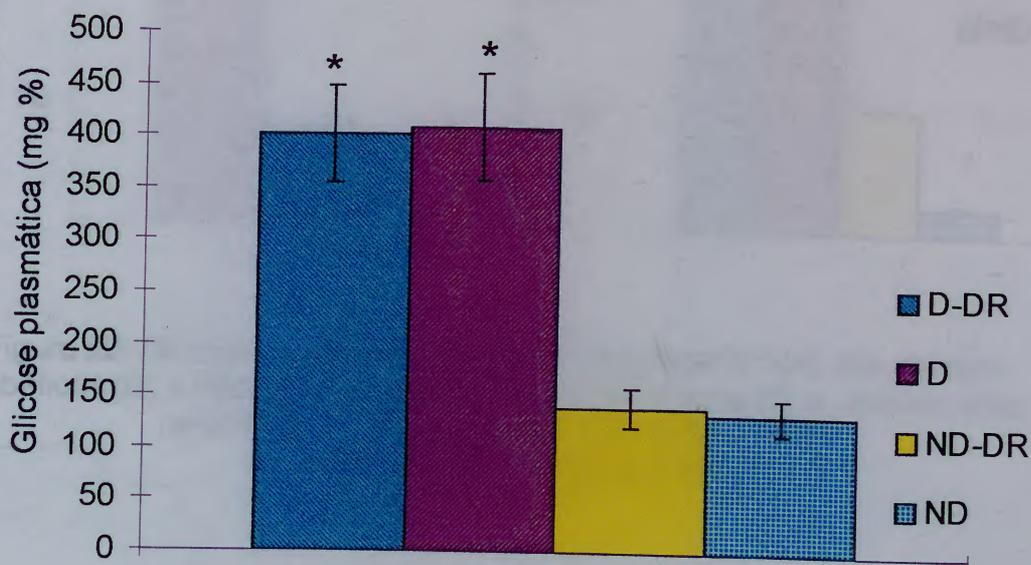


Figura 22: Glicose plasmática dos animais estudados, diabéticos (D) e não diabéticos (ND), após desnervação renal (DR) ou cirurgia fictícia. * $p < 0.05$ vs ND e ND-DR.

Na figura 23 pode-se observar o efeito da desnervação renal ou cirurgia fictícia sobre a glicose urinária de 24h. Observou-se níveis maiores de glicosúria nos grupos D em relação aos grupos não diabéticos ($p < 0.001$), assim como no grupo D-DR em relação ao D ($p = 0.002$).

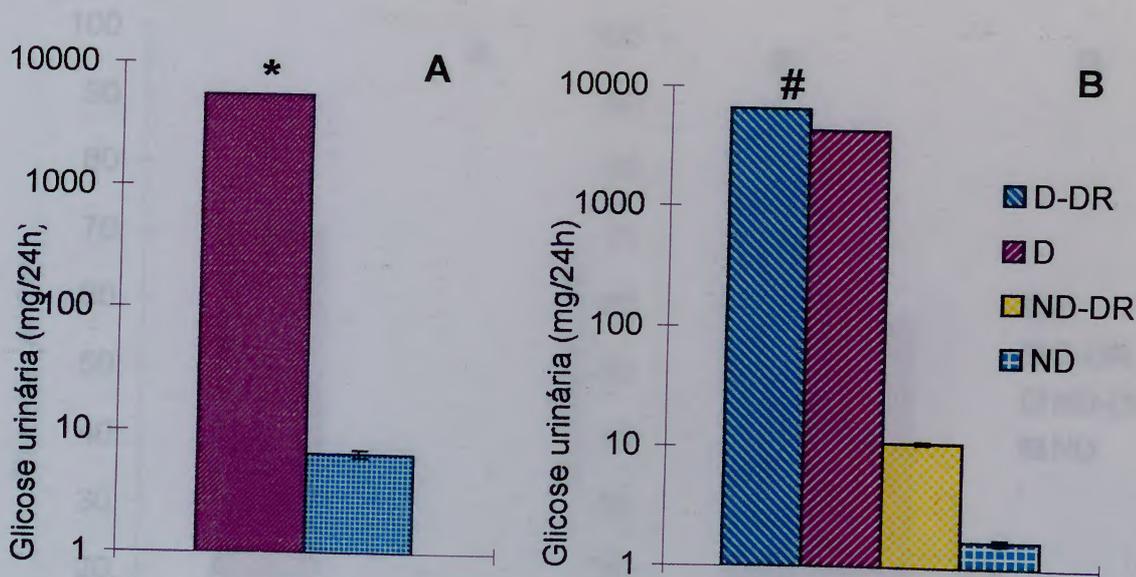


Figura 23: Glicose urinária de 24h (em escala logarítmica) dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) antes (A) e após (B) a desnervação renal (DR) ou cirurgia fictícia. * $p < 0.05$ vs ND; # $p < 0.05$ vs ND, ND-DR e D-DR.

A diurese de 24h, tanto antes, como após a cirurgia foi 2 a 3 vezes maior nos diabéticos versus não diabéticos. Os animais D submetidos à desnervação renal, no entanto, apresentaram valores de diurese superiores aos animais D não desnervados ($p < 0.001$). Não foram observadas diferenças entre os dois grupos ND ($p = 0.46$). Estes resultados podem ser vistos na figura 24.

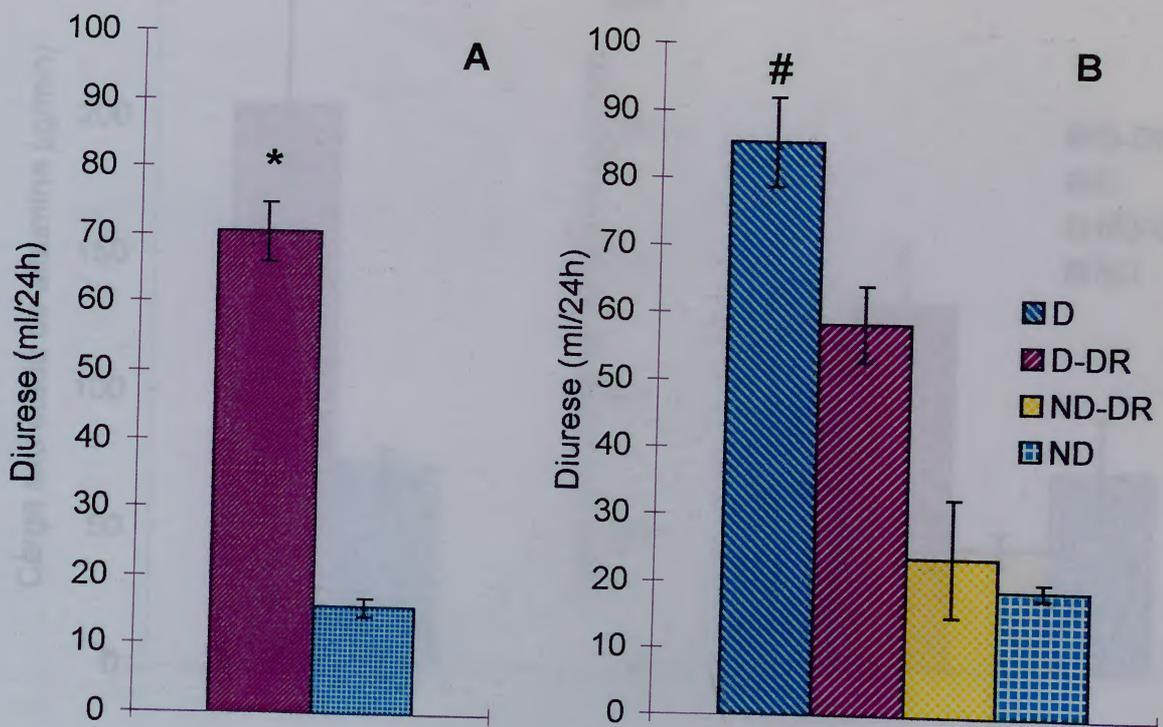


Figura 24: Diurese de 24h dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) antes (A) e após (B) a desnervação renal (DR) ou cirurgia fictícia.
 * $p < 0.05$ vs ND; # $p < 0.05$ vs ND, ND-DR e D-DR.

2. Carga excretada de albumina nos animais estudados:

No modelo experimental avaliado, o Diabetes induziu um aumento da carga excretada de albumina, o que ocorreu aos 30 ($p < 0.001$) e também aos 45 dias ($p < 0.05$) de estudo. Não houve diferença entre a carga excretada de albumina de animais do grupo D-DR quando comparados aos D ($p = 0.73$), assim como entre os dois grupos de ND ($p = 0.32$) (Figura 25).

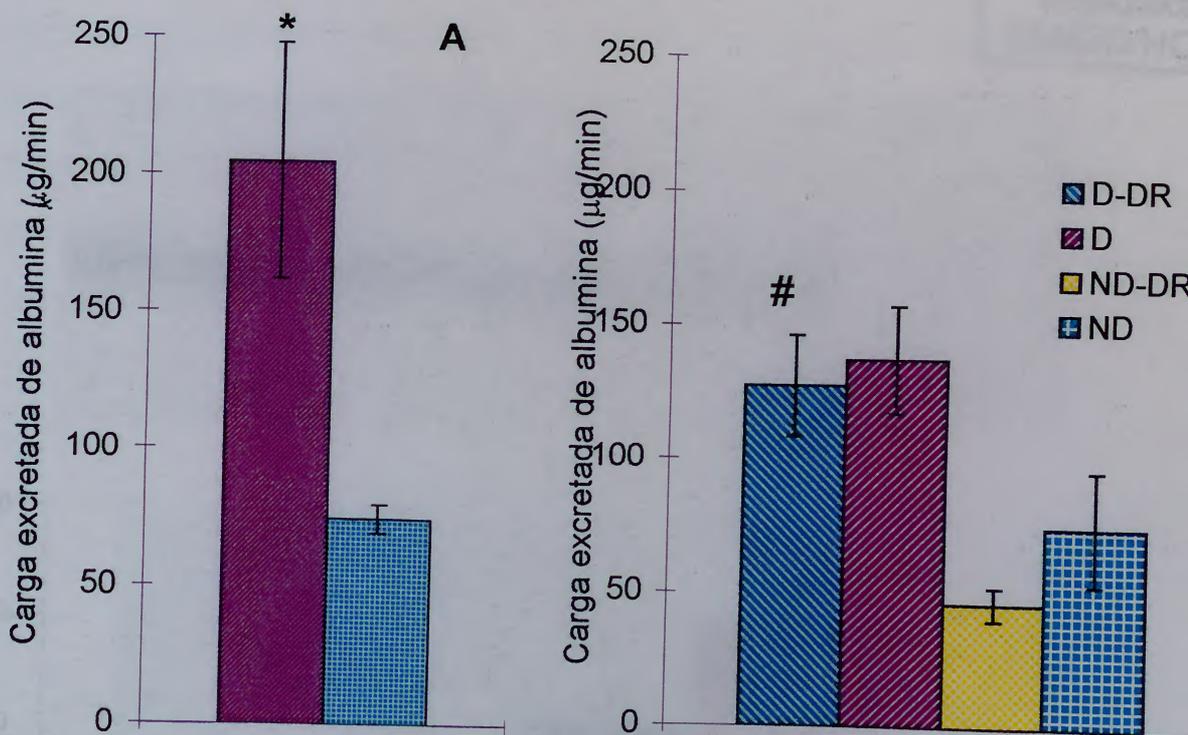


Figura 25: Carga excretada de albumina dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) antes (A) e após (B) a desnervação renal (DR) ou cirurgia fictícia. * $p < 0.05$ vs ND; # $p < 0.05$ vs ND e ND-DR.

4. Níveis dos transportadores de glicose (GLUT 1 e GLUT 2) no córtex renal:

No córtex renal, o Diabetes determinou aumento de 50% da proteína GLUT 2 ($p < 0.05$), enquanto que a desnervação renal provocou 25% de queda na mesma, tanto em animais do grupo ND ($p = 0.02$) como D ($p = 0.04$). A figura 26 representa os dados referentes ao GLUT 2 no córtex renal.

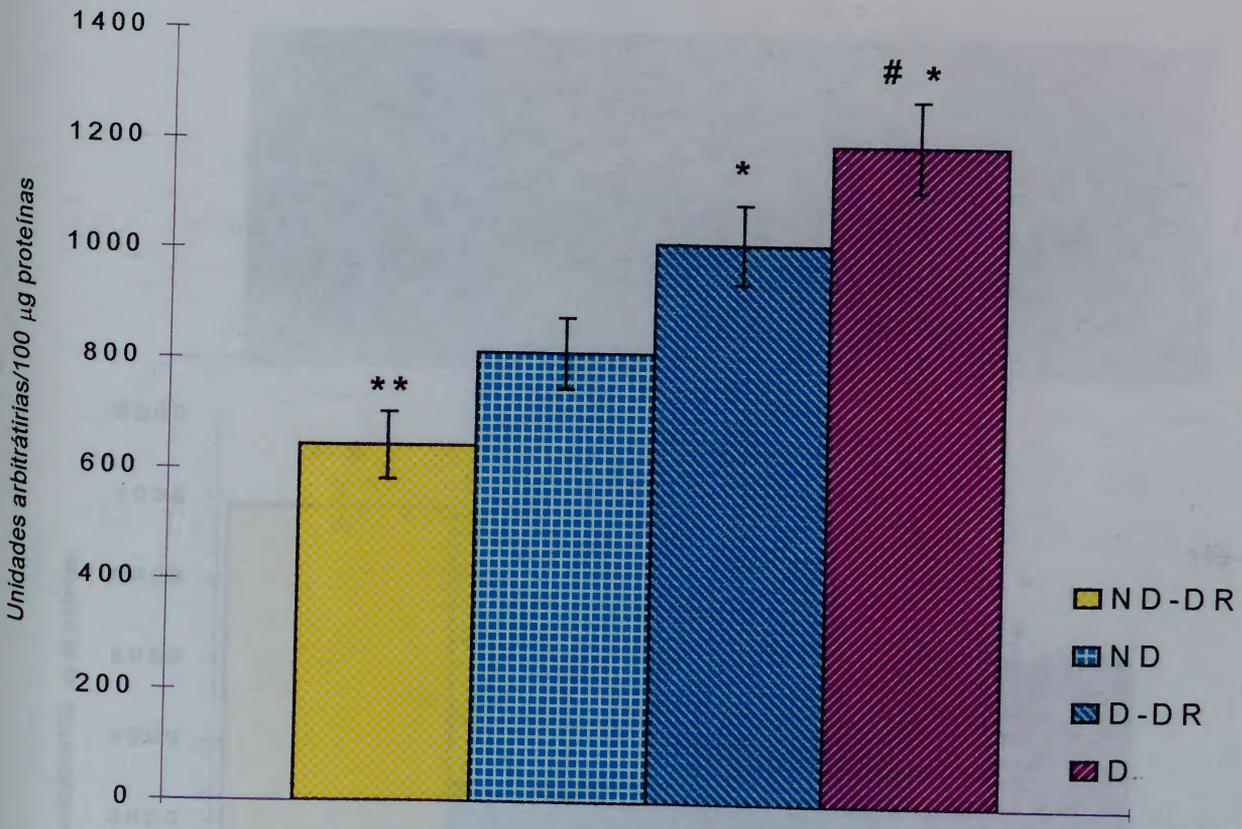
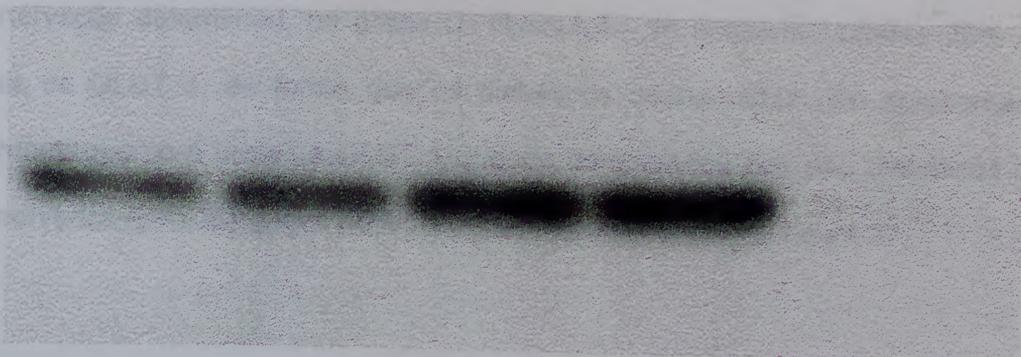


Figura 26: Análise densitométrica em Western Blot de GLUT 2 proteína no córtex renal dos animais estudados, diabéticos (D) e não diabéticos (ND), após desnervação renal (DR) ou cirurgia fictícia.
* $p < 0.05$ vs ND e ND-DR; # $p < 0.05$ vs D-DR; ** $p < 0.05$ vs ND.

Tanto a desnervação renal como o Diabetes determinaram aumento significativo da proteína GLUT 1 no córtex renal ($p=0.02$). Por outro lado, a desnervação determinou, no grupo D, diminuição de aproximadamente 20% dos níveis de GLUT 1, de forma que os diabéticos desnervados não apresentaram diferença quanto à proteína GLUT 1 quando comparados aos não diabéticos não desnervados ($p=0.36$). Estes achados estão representados na figura 27.

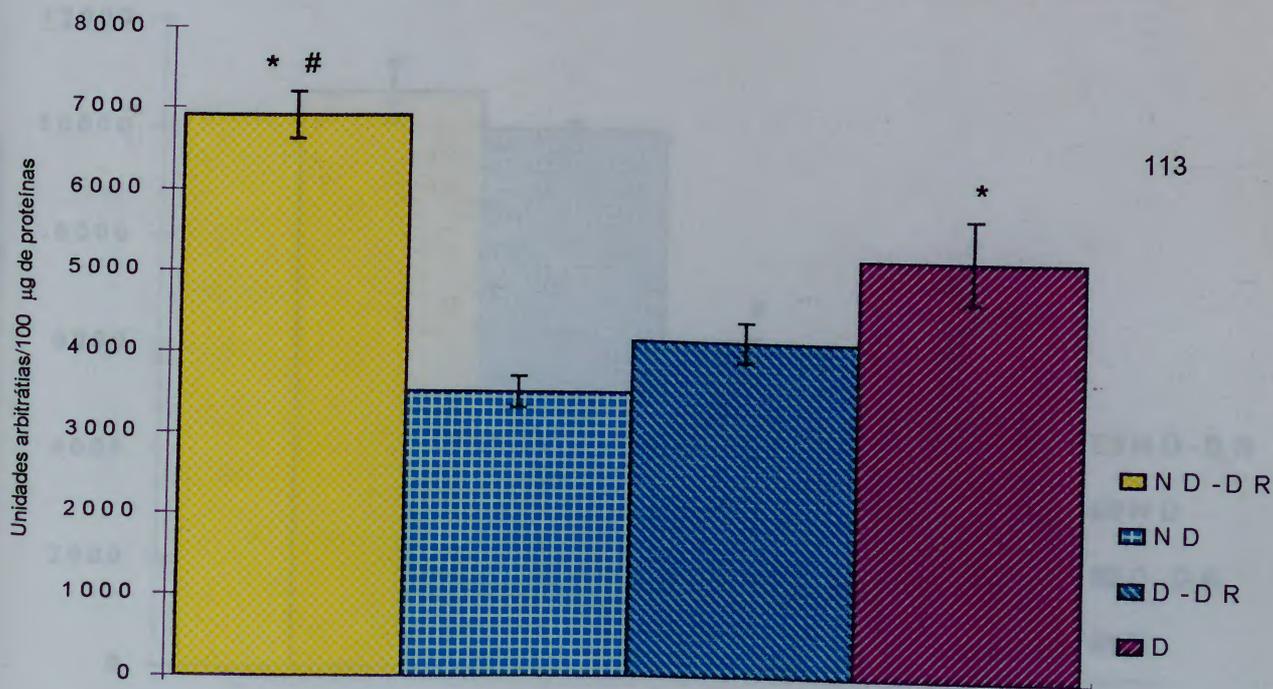
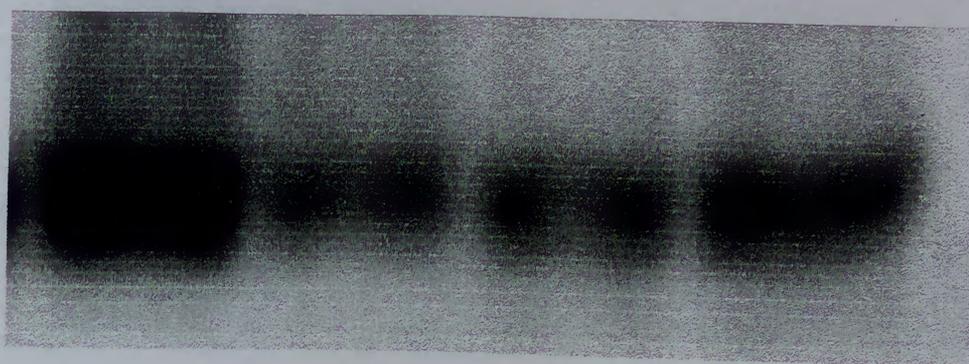


Figura 27: Análise densitométrica de Western Blot de GLUT 1 proteína no córtex renal dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND) após desnervação renal (DR) ou cirurgia fictícia.

* $p < 0.05$ vs ND e D-DR; # $p < 0.05$ vs D.

5. Níveis dos transportadores de glicose (GLUT 1) na medula renal:

Na medula renal, constituída sobretudo por células de túbulos renais, a desnervação não alterou significativamente os níveis de proteína GLUT 1 ($p=0.13$), enquanto que o Diabetes a diminuiu em 50% ($p<0.001$). O efeito do Diabetes, por outro lado, foi parcialmente corrigido pela desnervação, já que os níveis da proteína GLUT 1 na medula renal foram maiores no grupo D-DR em relação ao grupo D ($p<0.001$). Os dados referentes ao GLUT 1 na medula renal podem ser visualizados na figura 28.

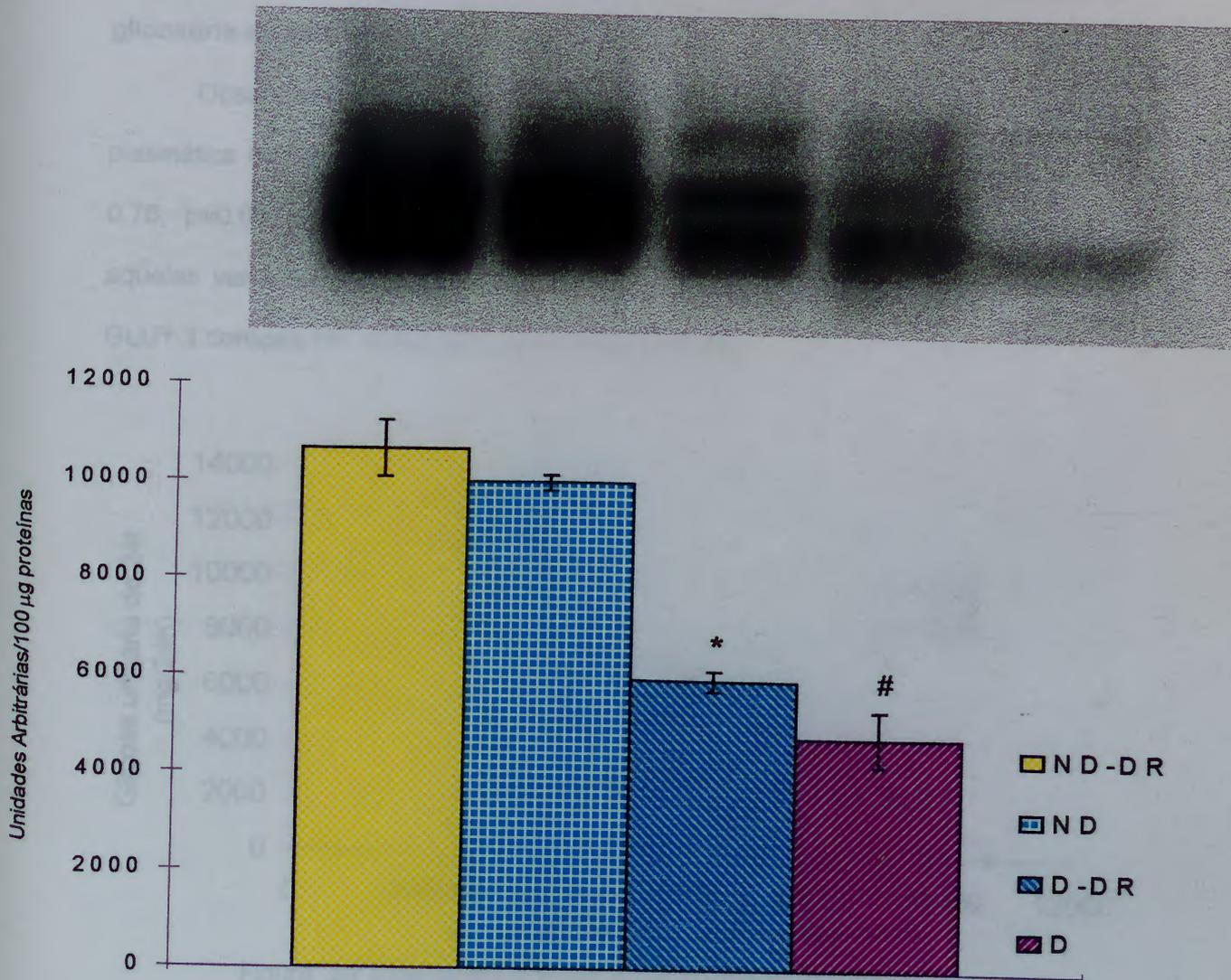


Figura 28: Análise densitométrica de Western Blot de GLUT 1 proteína na medula renal dos animais estudados, diabéticos (D) e não diabéticos (ND) após desnervação renal (DR) ou cirurgia fictícia. * $p < 0.05$ vs ND, ND-DR e D; # $p < 0.05$ vs ND-DR e ND.

Nas figuras 26, 27 e 28, pode-se observar também que existe levíssima detecção de GLUT 1 no córtex e nenhuma de GLUT 2 na medula, o que é uma forma de confirmar que as amostras de ambas as porções renais foram adequadamente separadas, não havendo contaminação de córtex em medula e vice-versa (no rim normal, o GLUT 1 existe em baixas concentrações no córtex e o GLUT 2 não está presente na medula renal).

6. Relação entre transportadores de glicose e glicose plasmática, glicosúria e albuminúria:

Observou-se correlação inversa entre glicose urinária de 24h e glicose plasmática em relação ao conteúdo de GLUT 1 medular ($r = -0.52$, $p = 0.05$ e $r = -0.76$, $p = 0.01$, respectivamente, figuras 29 e 30) e nenhuma correlação entre aquelas variáveis e o conteúdo de GLUT 2 ($r = 0.37$, $p = 0.17$ e $r = 0.37$, $p = 0.27$) e GLUT 1 corticais ($r = -0.05$, $p = 0.84$ e $r = 0.54$, $p = 0.13$).

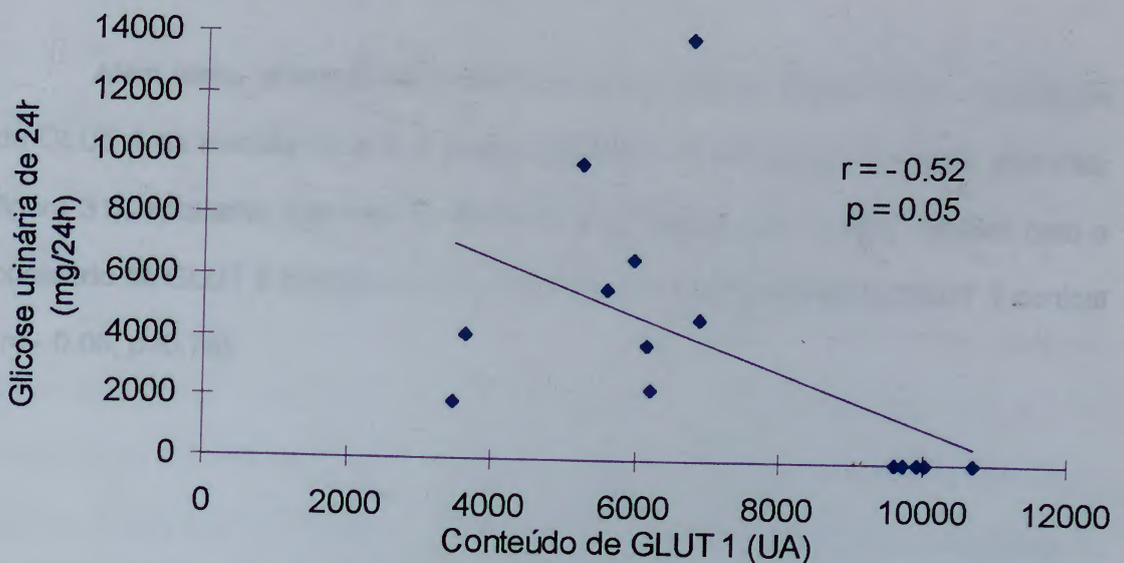


Figura 29: Correlação entre o conteúdo de GLUT 1 na medula renal e glicose urinária de 24h nos animais diabéticos e não diabéticos após desnervação renal ou cirurgia fictícia.

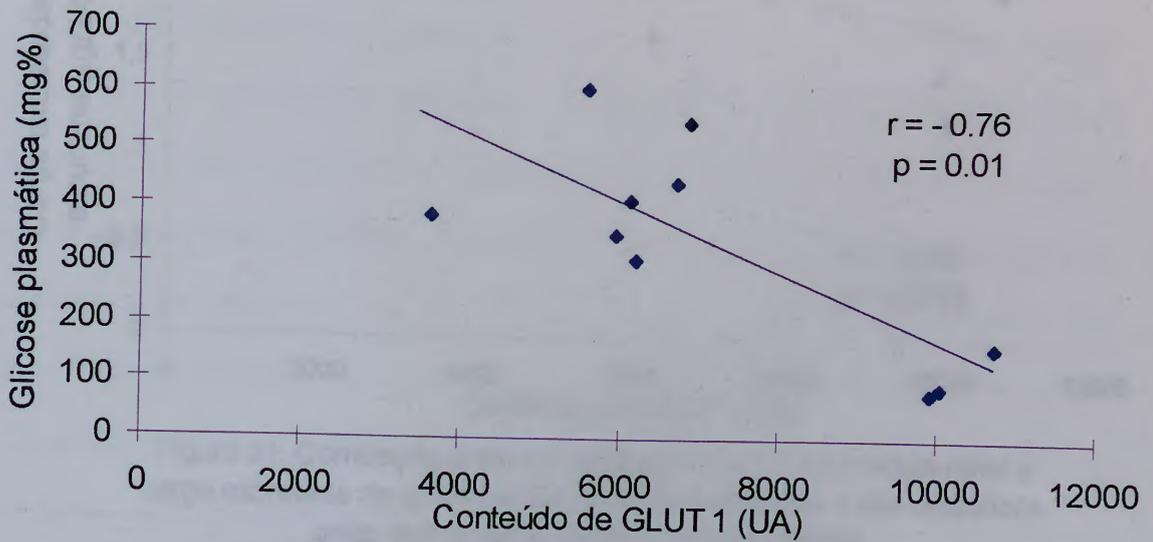


Figura 30: Correlação entre o conteúdo de GLUT 1 na medula renal e a glicose plasmática dos animais diabéticos e não diabéticos após desnervação renal ou cirurgia fictícia.

Além disto, observou-se também uma correlação inversa entre o conteúdo de GLUT 1 na medula renal e a carga excretada de albumina ($r = -0.62$, $p = 0.018$, figura 31), enquanto que não foi observada correlação da mesma variável com o conteúdo de GLUT 2 cortical ($r = 0.21$, $p = 0.47$) e com o conteúdo de GLUT 1 cortical ($r = -0.08$, $p = 0.78$).

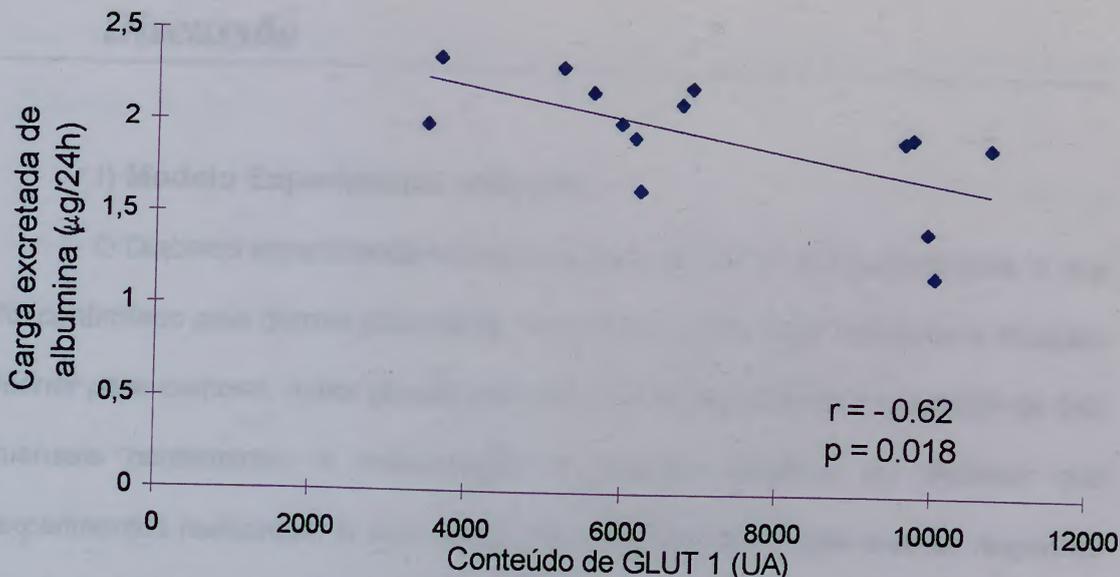


Figura 31: Correlação entre conteúdo de GLUT 1 na medula renal e carga excretada de albumina nos animais diabéticos e não diabéticos após desnervação renal ou cirurgia fictícia.

Em resumo, a desnervação renal determinou aumento, tanto da excreção urinária de glicose, como da proteína GLUT 1 no córtex renal e diminuição da proteína GLUT 2 na mesma região, sem determinar, no entanto, modificações no conteúdo de GLUT 1 medular. O Diabetes determinou diminuição desta proteína e aumento das proteínas GLUTs 2 e 1 no córtex renal, esta última alteração possivelmente favorecendo o acúmulo de maiores quantidades intra-celulares de glicose em células mesangiais, evento chave na patogênese da nefropatia diabética.

No entanto, a desnervação renal em ratos diabéticos determinou aumento da proteína GLUT 1 na medula renal e diminuição das proteínas GLUTs 2 e 1 no córtex renal. Os menores níveis de GLUT 1 no córtex renal dos animais diabéticos desnervados poderiam refletir numa diminuição dos níveis de glicose intra-celulares nas células mesangiais, tendendo a reverter os danos causados pelo Diabetes no glomérulo.

Apenas a proteína GLUT 1 medular correlacionou-se com parâmetros metabólicos como a glicose plasmática e urinária, bem como com a albuminúria.

I) Modelo Experimental utilizado:

O Diabetes experimental foi induzido pela injeção de estreptozotocina, o que foi confirmado pela glicose plasmática maior do que 300 mg% 48h após a indução. Menor peso corporal, maior glicose plasmática, maiores diurese e glicosúria de 24h mensais confirmaram a manutenção do estado diabético no decorrer dos experimentos realizados. A partir dos protocolos descritos, obteve-se as respostas cardiovasculares dos animais estudados com 14, 30 e 120 dias de duração de Diabetes após tratamento com insulina e com 7 e 45 a 90 dias no curso do Diabetes de animais não tratados com insulina.

No grupo tratado com insulina, os pesos não diferiram entre os animais do grupo D versus ND após 30 dias da injeção de estreptozotocina, e houve tendência à diminuição das taxas de glicosúria, bem como diurese de 24h naqueles animais, sem contudo sequer aproximá-las dos valores encontrados nos animais ND, exceto quanto à diurese aos 120 dias de Diabetes, que foi semelhante entre os grupos.

Quando os animais foram avaliados 45 a 90 dias após a injeção de estreptozotocina e não tratados com insulina, os pesos mantiveram-se sempre menores neste grupo versus seus controles, assim como não se observou queda nas altas quantidades de glicose excretada na urina ou no volume urinário no curso dos experimentos, indicando que os animais mantiveram-se em estado de descompensação metabólica por todo o período de estudo.

Não houve efeito da desnervação renal sobre os níveis glicêmicos e peso corporal dos animais, sugerindo que a mesma não tenha determinado modificações na gravidade do Diabetes. Portanto, foi possível avaliar no modelo experimental de

desnervação e Diabetes os efeitos das alterações metabólicas secundárias ao Diabetes.

A efetividade da desnervação renal cirúrgica foi confirmada através da medida dos níveis de noradrenalina no tecido renal de uma amostra de animais não diabéticos, a qual apresentou-se definitivamente diminuída dentre aqueles que sofreram o procedimento. A medida de catecolaminas teciduais tem sido utilizada por outros autores como método na avaliação da desnervação de um determinado órgão ou tecido (Bello-Reuss e cols., 1975, Kline e Mercer, 1980 e Nakashima e cols., 1996).

II) Efeitos cardiovasculares do Diabetes por estreptozotocina neste modelo:

O Diabetes experimental tem sido descrito como determinando anormalidades das respostas da frequência cardíaca e pressão arterial, tanto a estímulos fisiológicos, como farmacológicos (Jackson e Carrier, 1983, Chang e Lund, 1986, Hebden e cols., 1987 e Tomlinson e cols., 1990a). Estas anormalidades se devem a déficits cardiovasculares diretos (por exemplo, alterações cardíacas e vasculares independentes de defeitos neurais) e/ou decorrem de neuropatia autonômica afetando o sistema cardiovascular (Öztürk, Y. e cols., 1996).

1) Sobre a frequência cardíaca:

No presente estudo, observamos que os ratos com 14 a 30 dias de evolução do Diabetes, tratados com insulina apresentavam menor frequência cardíaca basal e após bloqueio simpático e parassimpático. Esta menor frequência cardíaca intrínseca também ocorreu no grupo não tratado com insulina, 45 a 90 dias após a injeção de estreptozotocina.

A persistência de menor frequência cardíaca intrínseca até 90 dias de Diabetes descompensado metabolicamente, mas não aos 120 dias em animais com a doença melhor controlada sugere que ela decorra de alterações no metabolismo do nervo relacionadas à descompensação metabólica, sendo reversível após o tratamento com insulina. Estes achados estão de acordo com os descritos por Hebden, em 1987, Tomlinson, em 1990 (a) e Maeda, em 1995 (b).

Hebden e cols., no mesmo modelo experimental, com 21 dias de duração do Diabetes, também demonstrou menor frequência cardíaca intrínseca, obtida após o uso do bloqueador ganglionar pentolínio, assim como a reversão desta anormalidade no grupo diabético tratado com insulina (Hebden e cols., 1987).

Utilizando ratos Long Evans tornados diabéticos por estreptozotocina 28 dias antes, outros autores também demonstraram menor frequência cardíaca de marca-passo nestes animais, também utilizando pentolínio para avaliá-la (Tomlinson e cols., 1990a).

Além disto, também o Diabetes experimental de curta duração (5 dias) parece estar associado à esta anormalidade, quando a frequência cardíaca foi medida após duplo bloqueio farmacológico com propranolol e atropina (Maeda e cols., 1995b).

A diferença do que foi encontrado por Tomlinson e cols. em relação a nossos resultados aos 30 dias de Diabetes tratado com insulina pode se dever à não obtenção de um bom controle metabólico em nosso experimento neste período, já que utilizamos menor dose de insulina (1 UI diária versus 4 a 17 UI diárias) o que determinou, ainda neste momento, menor peso, maior diurese e glicosúria dos animais do grupo D em relação a seus controles.

Modificações intrínsecas do nó sino-atrial, determinadas por distúrbios metabólicos e/ou elétricos podem contribuir para a menor frequência cardíaca de

marca-passo. Apesar de diferença quanto ao modelo experimental utilizado, o Diabetes por aloxano em coelhos determinou, conforme dados de Senges, em 1980, menor frequência cardíaca, prolongamento no tempo de recuperação pós-estímulo do nó sino-atrial, condução atrial heterogênea e bloqueio atrio-ventricular, alterações eletrofisiológicas que foram associadas a alterações ultra-estruturais.

A menor frequência cardíaca intrínseca provavelmente contribui para a bradicardia de repouso observada nestes animais. Outros autores também demonstraram bradicardia pelo Diabetes experimental de vários tempos de duração em ratos de diferentes raças (Tomlinson e cols., 1990b, Maeda e cols., 1995b, Dall'Ago e cols., 1997 a e b e Van Buren e cols., 1998b) e sua normalização com o uso de insulina (Chang e Lund, 1986, Tomlinson e cols., 1990a e Litwin e cols., 1990)

No presente estudo, 7 dias de Diabetes determinou bradicardia, que provavelmente é decorrência de diminuição da frequência cardíaca intrínseca, já que não foi observada alteração no tônus simpático e parassimpático em condições similares (Maeda e cols., 1995b).

No período de 45 a 90 dias de Diabetes houve permanência da bradicardia descrita. No entanto, nesta fase ela foi associada a ambas, diminuição da frequência cardíaca intrínseca e menor efeito simpático, não se podendo definir qual mecanismo influenciou de forma mais preponderante as alterações descritas. Certamente o tônus vagal diminuído encontrado nesta fase não deve ter papel importante, já que observa-se como efeito final bradicardia.

Existem na literatura várias sugestões de que modificações no tônus simpático e vagal poderiam contribuir para a presença de bradicardia neste modelo experimental (Chang e Lund, 1986, Tomlinson e cols., 1992 e Lund e cols., 1992).

Lund e cols. demonstraram, a partir de 4 semanas da indução de Diabetes por estreptozotocina em ratos, diminuição do conteúdo cardíaco da enzima colina acetil-transferase, cuja atividade é índice de inervação colinérgica cardíaca. No entanto, os mesmos animais não apresentavam modificações histológicas de fibras parassimpáticas do tronco vagal e não foram realizadas avaliações cardiovasculares, a fim de correlacioná-las com os achados bioquímicos citados (Lund e cols., 1992).

Já o estudo de Maeda, em 1995, demonstrou menor tônus e efeito vagal 5 dias após a indução do Diabetes experimental em animais que não foram tratados com insulina, assim como tônus e efeito simpático inalterados nos mesmos animais (Maeda e cols., 1995b). Reforçando este ponto de vista foi observado, no estudo de Van Buren e cols., em 1998, que o uso de agentes com ações neurotróficas e neuroprotetoras sobre o sistema nervoso autônomo não afetou a bradicardia, portanto, sendo sugerido pelos autores que esta alteração dependa de dano neuronal (Van Buren e cols., 1998b).

Alterações na função intrínseca cardíaca poderiam ser decorrentes, no Diabetes, de alterações das próprias fibras miocárdicas. Neste sentido, tem sido descrita a possibilidade de o Diabetes levar à disfunção miocárdica também por distúrbios metabólicos, representados por uma maior utilização de ácidos graxos e/ou diminuição na utilização de glicose pelo músculo cardíaco. Estudo em coração isolado de ratos com Diabetes por estreptozotocina de 6 semanas de evolução demonstrou disfunção cardíaca (bradicardia, menor produto frequência cardíaca-pico de pressão sistólica e menor pressão ventricular esquerda); a função cardíaca foi restaurada à normalidade quando os corações foram perfundidos com ácido dicloroacético, potente estimulante da oxidação da glicose. Portanto, a menor

oxidação da glicose no coração diabético parece ser fator importante na disfunção cardíaca observada neste modelo experimental (Nicholl e cols., 1991).

Além disto, foi demonstrado, em membranas sarcoplasmáticas de corações de ratos que foram injetados com estreptozotocina 8 semanas antes, disfunção na bomba de cálcio do sarcolema dos cardiomiócitos. É possível que estas alterações gerem modificações no transporte de cálcio para estas células, contribuindo para a disfunção miocárdica observada neste modelo experimental (Heyliger e cols., 1987).

A diferença dos pesos dos animais estudados, levantada como possível causa de modificações autonômicas neste modelo experimental (Maeda e cols., 1995b) e em humanos (Hirsh e cols., 1991) não parece afetar os resultados, tendo em vista que outros autores, utilizando como controles ratos desnutridos, e portanto com pesos semelhantes aos diabéticos, demonstraram que aqueles animais apresentavam frequência cardíaca semelhante a dos animais não diabéticos, ou seja, maior do que a dos diabéticos (Chang e Lund, 1986 e Van Buren e cols., 1998b)

A possibilidade da bradicardia se dever a enrijecimento miocárdico sugerida por Chang e Lund, em 1986 foi descartada por Litwin e cols., em 1990, já que neste estudo os animais diabéticos apresentavam bradicardia de repouso sem modificações na rigidez miocárdica.

Menor número e/ou sensibilidade dos β -adrenoceptores miocárdicos (Sundaresan e cols., 1984 e Gotzsche, 1983), modificações das proteínas contráteis secundárias a menores quantidades de hormônio tireoideo (Dillmann, 1982) e maior sensibilidade aos efeitos cronotrópicos de agentes colinérgicos (Vadlamuti e cols., 1983) também são hipóteses sugeridas por outros autores para explicar a bradicardia no Diabetes por estreptozotocina.

2) Sobre a pressão arterial:

Em relação à pressão arterial, nossos resultados demonstraram que a pressão arterial sistólica e média foram menores nos animais diabéticos não tratados com insulina na avaliação realizada 45 a 90 dias após a injeção de estreptozotocina. Outros autores também demonstraram menor pressão arterial sistólica no Diabetes de 1 a 3 meses de duração (Tomlinson e cols., 1990a, Homma e cols., 1993). Menor pressão arterial média foi observada no Diabetes de curta duração (5 a 15 dias) por Maeda e cols., 1995b e Jackson e Carrier, 1983, o mesmo ocorrendo com a pressão arterial diastólica (Dall'Ago e cols., 1997a). Quando a pressão arterial foi avaliada a mais longo prazo (6 e 12 meses) no curso do Diabetes não tratado com insulina, não observou-se redução em relação às medidas dos controles (Chang e Lund, 1986).

No grupo tratado com insulina, todas as medidas de pressão arterial dos animais diabéticos foram semelhantes às de seus controles. Estes resultados estão de acordo com os observados por Chang e Lund em 1986, e sugerem que a hipotensão neste modelo se deva à hipovolemia secundária à diurese osmótica que os animais não tratados com insulina apresentam (Hebden e cols., 1986) ou mesmo à disfunção miocárdica, reversível com a melhora do quadro metabólico (Litwin e cols., 1990).

Outras possibilidades, tais como menores respostas à vasopressina e ou à angiotensina ou mesmo menor reatividade vascular a estes agentes, todas reversíveis com o tratamento dos animais diabéticos com insulina, foram levantadas por Hebden e cols., em 1987. As sugestões de que a hipotensão neste modelo experimental poderia se dever à diminuição de tônus parassimpático, causando vasodilatação e menor resistência vascular periférica, ou menor tônus simpático, provavelmente não procedem, porque na realidade o tônus parassimpático está

diminuído, pelo menos aos 5 (Maeda e cols., 1995b) e 45 a 90 dias de Diabetes não tratado com insulina (presente estudo) e o efeito simpático inalterado (Maeda e cols., 1995b) ou diminuído (presente estudo).

3) Sobre os reflexos pressoreceptores:

A sensibilidade do baroreflexo, índice autonômico fidedigno em animais e humanos (Coleman, 1980 e Bennett e cols., 1978) foi avaliada por nós no Diabetes experimental não tratado com insulina 45 a 90 dias após sua indução. Esta avaliação foi realizada através de índices dividindo a frequência cardíaca após e antes da injeção da droga sobre as diferenças de pressão arterial média após e antes da injeção da droga. O componente parassimpático dos reflexos baroreceptores pôde ser avaliado medindo os mesmos índices após a injeção de propranolol. As respostas dos baroreceptores às drogas injetadas foram semelhantes entre os grupos, e o bloqueio simpático com propranolol não modificou estas respostas.

De acordo com nossos resultados, alguns autores encontraram semelhante resposta bradicárdica à fenilefrina quando comparados ratos diabéticos e seus controles: Maeda e cols., 1995a, em ratos injetados com estreptozotocina 5 dias antes, Tomlinson e cols., 1990 e Dall' Ago e cols., 1997, em ratos injetados com estreptozotocina 30 dias antes e Krizsan-Agbas e Buñag, 1991, em ratos com Diabetes espontâneo de 27 semanas de duração.

Da mesma forma, resposta taquicárdica a diminuições da pressão arterial semelhante entre ratos diabéticos e não diabéticos foi observada por nós e outros autores: Tomlinson e cols., 1990, em ratos injetados com estreptozotocina 28 dias antes e Fazan e cols., 1997, em ratos com Diabetes por estreptozotocina de 12 a 18 semanas de duração.

Hipersensibilidade baroreflexa às injeções de fenilefrina foi observada por Chang e Lund em animais diabéticos e desnutridos, com 12 semanas de Diabetes, alteração que foi corrigida no primeiro grupo através do tratamento com insulina (Chang e Lund, 1986). Por outro lado, outros autores demonstraram menor bradicardia reflexa com o mesmo tempo de Diabetes experimental, a qual não foi completamente restaurada com o uso de agentes neurotróficos, o que pode implicar em causas cardiovasculares intrínsecas não neuronais para as alterações. Estes mesmos autores não obtiveram respostas taquicárdicas às quedas de pressão arterial induzidas por agentes depressores em diabéticos e não diabéticos (Van Buren e cols., 1998a), o que pode decorrer do fato dos experimentos terem sido realizados sob vigência de anestesia com uretano (Stornetta e cols., 1987).

No entanto, menor taquicardia reflexa foi observada por Maeda e cols. (1995b) e Dall'Agó e cols. (1997a e b) quando avaliados animais com Diabetes de 5 a 30 dias de evolução. Já em ratos BB, com Diabetes espontâneo, foi observado aumento na taquicardia reflexa em resposta ao nitroprussiato de sódio com 27 semanas de Diabetes (Krizsan-Agbas e Buñag, 1991).

O estudo da resposta bradicárdica a aumentos de pressão arterial fenilefrina-induzidos após bloqueio simpático com atenolol e parassimpático com atropina em ratos normais demonstrou que existe um forte componente parassimpático controlando estas respostas. Já a resposta taquicárdica a diminuições de pressão arterial nitroprussiato de sódio-induzidas se deve a um balanço entre os dois sistemas, simpático e parassimpático, o primeiro contribuindo de forma preponderante na vigência de maiores respostas da frequência cardíaca (Stornetta e cols., 1987).

Em humanos com Diabetes Mellitus do tipo 1 e 2, com longa duração da doença, o controle baroreflexo da frequência cardíaca foi avaliado, demonstrando-

se menor bradicardia reflexa em resposta a aumentos da pressão arterial induzidos por fenilefrina. Esta menor resposta demonstrou boa correlação com as respostas obtidas com o teste de Valsalva e com medidas da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, utilizados habitualmente no diagnóstico de neuropatia autonômica em diabéticos (Eckberg e cols., 1986 e Bennett e cols., 1976).

Já a taquicardia reflexa parece não estar alterada em humanos diabéticos, apesar dos pacientes estudados apresentarem outras alterações sugestivas de disfunção autonômica, tais como menor variabilidade da frequência cardíaca, menores respostas pressoras à fenilefrina e menor resposta bradicárdica a elevações da pressão arterial (Eckberg e cols., 1986).

4) Sobre a reatividade vascular:

A reatividade vascular, avaliada pelas resposta pressora à fenilefrina e depressora ao nitroprussiato de sódio, não diferiu entre os grupos D e ND em todas as avaliações realizadas, também não se modificando após bloqueio farmacológico com propranolol.

Poucos estudos avaliaram a reatividade vascular neste modelo experimental, observando-se resposta depressora ao nitroprussiato de sódio normal nos ratos diabéticos (semelhante aos nossos achados) e menor resposta pressora em resposta à fenilefrina (Maeda e cols., 1995a) e à norepinefrina e angiotensina (Jackson e Carrier, 1983) no Diabetes de curta duração. A possibilidade destas alterações terem sido revertidas com o curso da doença não pode ser descartada, já que nosso estudo foi realizado com 45 a 90 dias de Diabetes. Um estudo demonstrou menores resposta pressora e depressora em ratos com Diabetes por estreptozotocina em todas as avaliações cardiovasculares realizadas, a partir da primeira, com 2 semanas de duração do Diabetes (Van

Buren e cols., 1998a). No entanto, os animais foram anestesiados, o que traz dúvidas quanto à validade dos resultados apresentados (Stornetta e cols., 1987).

Aparentemente os resultados obtidos na avaliação do controle baroreflexo da frequência cardíaca e reatividade vascular em humanos não são facilmente reproduzíveis em ratos com Diabetes espontâneo ou por estreptozotocina. Baseados em estudo dos baroreflexos antes e após bloqueio simpático com propranolol, em que foi observada menor resposta bradicárdica às injeções de fenilefrina, a qual se deveu a um defeito parassimpático, além de preservação da resposta taquicárdica às injeções de nitroprussiato de sódio, outros autores sugeriram, recentemente, que o coelho com Diabetes por aloxano se assemelharia mais ao Diabetes em humanos no que tange a estas alterações do sistema nervoso autônomo (McDowell e cols., 1994).

5) Sobre as variabilidades da frequência cardíaca e pressão arterial média:

A variabilidade da frequência cardíaca avaliada através do índice no domínio do tempo RRMED foi maior nos animais do grupo D aos 7 dias de evolução, o que não ocorreu quando os animais foram tratados com insulina nos 14, 30 e 120 dias subseqüentes. No entanto, 45 a 90 dias após a indução, os animais D não tratados com insulina apresentaram diminuição da variabilidade da frequência cardíaca quando da avaliação pelos índices no domínio do tempo RRMED e RMSSD, além de terem apresentado uma tendência a menor SDNN. A avaliação obtida através do domínio da frequência, pelos índices derivados do mapa de retorno tri-dimensional, foi realizada somente nos animais com 45 a 90 dias de Diabetes não tratado com insulina, sendo observados resultados semelhantes entre os grupos estudados.

Apesar dos métodos que avaliam a variabilidade da frequência cardíaca serem extensamente utilizados na avaliação da neuropatia autonômica diabética em humanos (Spallone e cols., 1993 e Spallone e Menzinger, 1997), poucos resultados se obtêm da literatura quanto à sua utilização em ratos diabéticos. Em animais não diabéticos alguns estudos foram realizados avaliando índices no domínio do tempo e da frequência como forma de análise da variabilidade da frequência cardíaca, utilizando telemetria como forma de obter as séries de intervalos R-R (Sgoifo e cols. 1997, Mansier e cols. 1996 e Malliani e cols., 1991).

Ratos com Diabetes espontâneo apresentaram menor variabilidade da frequência cardíaca avaliada através de um método estatístico computadorizado para medidas dos intervalos R-R a partir de 8 semanas de evolução da doença, o que o autor atribuiu à neuropatia autonômica neste modelo experimental. As medidas de RRMED e SDNN foram semelhantes entre os animais diabéticos e seus controles até 24 semanas de Diabetes, a partir das quais os autores demonstraram também menor variabilidade da frequência cardíaca por este tipo de avaliação (McEwen e Sima, 1987). No estudo citado, a inovação na metodologia empregada na análise da variabilidade da frequência cardíaca pode ser a responsável pela detecção de um índice alterado mais precocemente que os demais.

No entanto, avaliando o mesmo modelo experimental que o por nós utilizado, Fazan e cols., em 1997, observaram menor SDNN dentre ratos diabéticos 12 a 18 semanas após a injeção de estreptozotocina. Em conjunto, os dados sugerem que o Diabetes experimental, espontâneo ou induzido por estreptozotocina, leva à menor variabilidade da frequência cardíaca, possivelmente por disfunção autonômica incipiente. Se considerarmos que estas alterações são decorrentes de neuropatia autonômica, que são precoces, e que necessitam de um

determinado período de Diabetes para que ocorram, provavelmente não se deva atribuir à ela a bradicardia, hipotensão arterial e menor frequência cardíaca intrínseca apresentadas por estes animais mais precocemente (desde os 5 dias da indução) no curso do Diabetes.

Quando a variabilidade da pressão arterial média, avaliada pelos índices do mapa de retorno tri-dimensional, foi comparada entre animais D e ND, ela foi menor nos grupos diabéticos sem uso de insulina aos 7 dias (menores P_1 , P_2 e MN) e aos 45 a 90 dias (menores P_2 , P_3 , MN e média dos desvios padrões da pressão arterial média) após o início do Diabetes, o que não foi observado nos animais tratados com insulina.

Conforme já descrito em material e métodos, a regulação da pressão arterial depende, diferentemente da frequência cardíaca, do sistema nervoso autônomo mas também de outros fatores, que são a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, óxido nítrico, efeitos mecânicos da respiração e vasopressina. A simpatectomia química por 6-hidroxidopamina e guanetidina e também o bloqueio farmacológico dos sistemas simpático e parassimpático em ratos não abolem completamente a variabilidade da pressão arterial. Portanto, alterações da variabilidade da pressão arterial não podem ser consideradas diagnósticas de disfunção autonômica. (Japundzic-Zigon, 1998).

Como a privação de água em ratos normais é um dos fatores que influenciam a variabilidade da pressão arterial média, no caso, causando sua diminuição (Japundzic Zigon e cols., 1997), não se exclui que a desidratação seja uma das causas dos resultados por nós encontrados, especialmente porque eles ocorreram nos períodos de avaliação de maior descompensação metabólica (7, 45 e 90 dias de Diabetes não tratado).

O fato de ratos com Diabetes por estreptozotocina apresentarem menor retenção de ^{11}C -HE em porções distais do ventrículo esquerdo (locais em que foi observado menor conteúdo de fator de crescimento do nervo) apenas após 6 a 9 meses da injeção da droga (Schmid e cols., 1999), bem como achados anátomo-patológicos que demonstraram lesões definitivas em nervos do sistema nervoso autônomo 6 meses após a injeção de estreptozotocina (Schmidt e Sharp, 1982) ou com 6 a 8 meses de Diabetes espontâneo (Yagiashi e cols., 1985 e 1986) sugerem que alterações autonômicas anatômicas só ocorrem tardiamente. Alterações funcionais, como as encontradas no presente estudo, reversíveis pelo tratamento com insulina, poderiam estar presentes em fases mais precoces.

Esta situação seria semelhante à que ocorre na neuropatia diabética somática, em que menores velocidades de condução nervosa e menores potenciais evocados musculares relacionam-se a anormalidades metabólicas antes da demonstração de defeitos estruturais (Greene e cols., 1984 e Sima, 1985).

III) Correlação entre as variáveis cardiovasculares e índices de controle metabólico:

A presença de correlação inversa entre glicose urinária de 24h e frequência cardíaca, índices de variabilidade de pressão arterial média P_2 e MN aos 7 dias de Diabetes reforça mais nossa hipótese de que as modificações cardiovasculares encontradas relacionam-se diretamente ao grau de descontrole metabólico apresentado por estes animais, especialmente porque este momento de avaliação foi aquele em que maiores valores de glicosúria foram observados. Apesar de outros autores não terem correlacionado as variáveis metabólicas às cardiovasculares, o fato de observarem normalização de alguns parâmetros cardiovasculares com a melhora da glicemia através do uso de insulina neste

modelo experimental está de acordo com os resultados por nós encontrados (Chang e Lund, 1986 e Tomlinson e cols., 1990).

IV) Efeitos do Diabetes experimental sobre a excreção urinária de albumina:

Maior carga excretada de albumina foi observada nos grupo D versus ND nos animais tratados com insulina aos 30 e 120 dias de evolução. No grupo não tratado com insulina, a intensidade da microalbuminúria foi maior no grupo diabético, ocorrendo aos 7 dias e dos 30 até 90 dias. Os resultados em animais tratados com insulina estão de acordo com os encontrados por Bertoluci e cols., os quais observaram, utilizando o mesmo tipo de ensaio, microalbuminúria desenvolvendo-se persistentemente a partir de 16 semanas do uso de estreptozotocina. A possibilidade de glomeruloesclerose difusa ao estudo morfológico dos rins destes animais foi avaliada a partir de 24 semanas de Diabetes, estando inequivocamente presente (Bertoluci e cols., 1996).

Por outro lado, outros autores demonstraram início e persistência de microalbuminúria neste modelo experimental somente a partir de 5 (Zatz e cols., 1986) e 7 meses da indução do Diabetes (Daniels e Hostetter, 1989), talvez por terem obtido melhor controle metabólico dos animais no decorrer dos estudos, o que estaria retardando a progressão da doença renal nestes animais. Outros autores demonstraram aumento da excreção urinária de albumina precocemente no curso do Diabetes experimental (2 a 4 semanas) e sua equiparação aos valores encontrados nos animais não diabéticos através do uso de insulina (Ellis e cols., 1984, Kaneda e cols., 1992 e Ha e cols., 1994).

Para estas elevações tão precoces da excreção urinária de albumina observada por nós e por estes autores neste modelo experimental poderiam estar

contribuindo tanto lesão glomerular como tubular induzidas pelo Diabetes, bem como efeito tóxico da estreptozotocina. Os resultados da avaliação histológica e imunolocalização para TGF β 1 dos ratos diabéticos no estudo de Bertoluci e cols. sugerem que o modelo do rato com Diabetes por estreptozotocina apresenta lesões glomerulares progressivas que cursam com aumento da excreção urinária de albumina e certamente poderiam ocorrer mais precocemente na ausência de tratamento com insulina (Bertoluci e cols., 1996).

Por outro lado, parte da excreção urinária de albumina relacionada ao Diabetes Mellitus no rato pode ser decorrente de lesão tubular relacionada ao Diabetes (Tucker e cols., 1993), podendo ser revertida pelo tratamento com insulina (Ha e cols., 1994).

V) Efeitos da desnervação renal bilateral sobre a excreção urinária de albumina e expressão dos transportadores de glicose no rim de ratos normais e com Diabetes experimental:

O objetivo principal do presente estudo consistia na investigação da influência de alterações autonômicas sobre o desenvolvimento de nefropatia neste modelo experimental. Como a neuropatia autonômica em ratos com Diabetes por estreptozotocina desenvolve-se a partir de vários meses (6 a 13) da injeção da droga (Schmidt e Sharp, 1982, Kniel e cols., 1986 e Schmid e cols., 1999), a manutenção destes animais a longo prazo é difícil, e a inervação renal neste modelo não está bem definida (hiperinervação/desnervação?) idealizou-se um modelo em que seria induzida experimentalmente desnervação.

A idéia da desnervação renal cirúrgica surgiu de várias descrições favoráveis da literatura (Bello-Reuss e cols., 1975 e Piryova e cols., 1980), além de ampla experiência com este procedimento em nosso laboratório (Lacchini, 1996).

Tomoda e cols. estudaram o efeito da desnervação renal em ratos com hipertensão espontânea após 4 semanas do procedimento cirúrgico, demonstrando que o conteúdo de noradrenalina renal era 5% do observado nos rins dos animais não desnervados neste período (Tomoda e cols., 1997). Outros autores, avaliando ratos normais, submetidos à desnervação renal cirúrgica seguida da aplicação de álcool absoluto no hilo renal, e avaliando modificações na pressão de perfusão durante estímulo elétrico (1-10Hz) e químico (administração de norepinefrina 1-50 ng intra-arterial) relataram reinervação definitiva 8 semanas após o procedimento. Descreveram, no entanto, que este processo começa a ocorrer a partir de 14 a 24 dias de desnervação. Quando do processo de reinervação a resposta de vasoconstricção renal ao estímulo dos nervos renais retorna ao normal antes da normalização do conteúdo tecidual de noradrenalina, portanto, a reinervação funcional precede e não é refletida adequadamente pelas medidas bioquímicas de conteúdo tecidual renal de catecolaminas (Kline e Mercer, 1980). Por este motivo, escolhemos por estudar os animais após 2 semanas de desnervação.

No rim, a glicose é livremente filtrada nos glomérulos e depois quase completamente extraída da urina pelas células dos túbulos proximais, retornando ao sangue. Aproximadamente 90% da glicose é reabsorvida nas células do segmento S1 ou porção contorcida do túbulo proximal. A pequena fração restante é então completamente reabsorvida no segmento S3, ou porção reta do túbulo proximal. O transporte de glicose através do bordo em escova das células epiteliais renais é um processo ativo que requer a presença de um gradiente de Na entre o exterior e o interior das células. A baixa concentração intra-celular de sódio é mantida pela extrusão constante deste íon determinada por uma enzima, a Na-K-adenosina-trifosfatase, localizada na membrana baso-lateral destas células. Através da ação de co-transportadores Na-glicose (SGLTs), presentes no bordo em

escova das células tubulares, ocorre então transporte de glicose para dentro da célula contra seu gradiente de concentração, a favor do gradiente eletroquímico do íon Na. Segue-se então difusão facilitada da glicose, por ação dos transportadores de glicose GLUTs 1 e 2, que libera glicose através da membrana baso-lateral destas células no interstício, próximo dos capilares sanguíneos (Hediger e Rhoads, 1994).

As células que expressam a proteína GLUT 2 são sobretudo as células tubulares proximais do segmento S1, presentes no córtex renal (Dominguez e cols., 1992), envolvidas na reabsorção tubular de glicose. Este transportador é de baixa afinidade e alto K_m , o que permite alta capacidade de transporte, necessária sob condições fisiológicas na região onde este transportador se expressa no rim (Thorens, 1996 e Gould e Holman, 1993).

Já o GLUT 1 se expressa nas células tubulares do segmento S1 e S3, localizados em córtex e na medula renal (Dominguez e cols., 1992), este último segmento envolvido com a reabsorção de baixas concentrações tubulares de glicose, e portanto suas características de maior K_m para efluxo do que influxo de glicose são adequadas nesta região (Thorens, 1996 e Gould e Holman, 1993).

O Diabetes afeta a expressão gênica de GLUT 1 e 2 de forma tecido-específica. Os mecanismos celulares que conferem esta especificidade não são conhecidos (Dominguez e cols., 1994). A supressão da expressão de GLUT 1 não é generalizada no Diabetes, o que é indicado pelo aumento de GLUT 1 proteína em hepatócitos de ratos diabéticos por estreptozotocina (Tal e cols., 1991). Da mesma forma, a expressão de GLUT 2 no pâncreas é modificada pelo Diabetes experimental de forma diferente do que ocorre nos túbulos renais, isto é, ele é suprimido (Thorens e cols., 1990).

Nossos resultados demonstraram que o Diabetes experimental determinou aumento de GLUT 2 proteína no córtex renal e diminuição de GLUT 1 proteína na medula, o que vai ao encontro do observado por Dominguez e cols. em 1994, Asada e cols. em 1997 e Kamram e cols. em 1997. A grande quantidade de glicose que se apresenta ao túbulo proximal no Diabetes requer aumento correspondente de seu efluxo, para manter o fluxo de glicose trans-tubular estável. A superexpressão de GLUT 2 nos segmentos iniciais do túbulo proximal pode produzir efluxo de glicose de baixa afinidade e alta capacidade, o que não é saturado mesmo em altas concentrações de glicose. Portanto, as modificações induzidas pelo Diabetes constituiriam adaptação para a manutenção de alto fluxo trans-tubular de glicose, já que o gradiente de glicose túbulo-interstício está diminuído em decorrência da hiperglicemia. Os níveis destas proteínas transportadoras e de transporte de glicose pelas células tubulares renais são restaurados pelo tratamento com insulina e IGF-1 (Dominguez e cols., 1994 e Asada e cols., 1997), provavelmente devido à correção da hiperglicemia nestas circunstâncias.

A desnervação renal determinou significativo aumento da excreção urinária de glicose nos animais D-DR, sem que ocorressem modificações na glicose plasmática. Também observou-se maior diurese dentre os animais do grupo D-DR, o que não ocorreu dentre os animais do grupo ND-DR.

Pelos motivos que descreveremos a seguir, estes resultados sugerem que a desnervação determinou diminuição da reabsorção tubular de glicose. Eles estão de acordo com Piryoova e cols., que em 1980, avaliando ratos Wistar não diabéticos submetidos à desnervação renal cirúrgica e química (uso de formol no local) observou que ela determinou a taxa de reabsorção tubular de glicose pelo cálculo diferencial de sua depuração em relação à da inulina. Nos animais desnervados os

valores foram de 20 a 25% inferiores, coincidindo com maior excreção urinária de glicose. As alterações induzidas pelo menor tônus simpático renal podem se dever a influências específicas sobre o transporte de glicose ou serem consequência da menor reabsorção de sódio, com natriurese decorrente, alterações previamente descritas quando de desnervação renal no mesmo modelo experimental e em cães (Bello-Reuss e cols., 1977 e Szalay e cols., 1977). Como a desnervação não causou modificações na taxa de filtração glomerular, neste e em outros estudos (Bello-Reuss e cols., 1977 e Szalay e cols., 1977), não têm sido atribuídas à ela as modificações no transporte da glicose descritas (Piryova e cols., 1980). O fenômeno de maior diurese pela desnervação foi observado por outros autores em ratos normais, iniciando-se imediatamente após o procedimento e prolongando-se por algumas semanas (Bencsath e cols., 1979, Wilson e cols., 1979 e Thorup e cols., 1996).

Quando foi determinada a quantidade de proteína GLUT 2 no córtex renal, o Diabetes determinou seu aumento em 50%, enquanto que a desnervação renal provocou sua diminuição em 25%, tanto em animais não diabéticos como diabéticos. Já a determinação de GLUT 1 na medula renal demonstrou que a desnervação não alterou significativamente os níveis desta proteína, enquanto o Diabetes diminuiu em 50% a expressão da mesma, efeito parcialmente corrigido pela desnervação.

Estes resultados sugerem que as modificações de excreção urinária de glicose decorrentes da desnervação renal encontradas em nosso e outros estudos sejam secundárias às modificações que o Diabetes e a diminuição do tônus simpático renal provocaram nas proteínas transportadoras GLUT 2 e 1 no córtex e medula renais, respectivamente. Concomitantemente ao aumento da glicosúria há provavelmente diminuição da glicose reabsorvida, ou seja, efeito oposto ao

provocado pelo Diabetes. No entanto, devido às lesões características da nefropatia diabética serem de origem primariamente glomerular, não nos parece razoável que as alterações descritas tenham alguma influência sobre a gênese da nefropatia diabética, mas que simplesmente reflitam uma adaptação à grande quantidade de glicose presente nos túbulos proximais destes animais, conforme já comentado.

Considerando apenas o córtex renal e quantidade de GLUT 1 proteína nesta região, transportador identificado nas células glomerulares e mesangiais (Heilig e cols., 1995a e b), e portanto, potencialmente ligado à patogênese da nefropatia diabética, observamos que, tanto o Diabetes, como a desnervação renal isoladamente determinaram aumento significativo desta proteína. Em consequência destas modificações deve associar-se aumento no transporte de glicose para o interior da célula mesangial. A maior quantidade de glicose intracelular poderia causar aumento da proteína quinase C, expressão de TGF β , aumento de matriz extracelular e albuminúria. Através deste mecanismo certamente uma desnervação poderia determinar uma aceleração na velocidade de progressão da nefropatia diabética. Além disto, foi demonstrado aumento na quantidade de GLUT 1 proteína na retina de indivíduos diabéticos com distribuição irregular, o que sugere que aumentos focais na expressão desta proteína determinem as lesões histopatológicas focais características da retinopatia diabética (Kumagai e cols., 1996).

No entanto, nossos achados quando da associação do estado diabético à diminuição do tônus simpático renal foram paradoxais: observou-se diminuição da proteína GLUT 1 em córtex renal nesta situação, a ponto destes valores assemelharem-se aos encontrados nos animais do grupo ND. Para explicar este fenômeno, consideramos os achados de outros experimentos. Em células

mesangiais e endoteliais da retina cultivadas em meio com excesso de glicose (15 a 20 mmol/L), outros autores observaram aumento na expressão de mRNA e proteína GLUT 1, mas aumento significativamente menor da mesma quando a quantidade de glicose utilizada no meio foi muito alta (25 a 30 mmol/L). No estudo com células mesangiais não houve normalização do GLUT 1 quando as células foram cultivadas com altas concentrações de glicose no meio (Wakisaka e cols., 1995, Heilig e cols., 1997c), mas no estudo com células endoteliais a expressão de GLUT 1 não aumentou quando o meio de cultura continha 25 mmol/L de glicose (Knott e cols., 1996).

A possibilidade de “downregulation” na expressão dos transportadores de glicose quando de estímulo excessivo (no caso aumento de glicose no meio de cultura) pode ser levantada, assim como dano celular pelos distúrbios metabólicos ou osmóticos decorrentes das altas concentrações intra e extra-celulares de glicose. Mesmo que ocorra realmente “downregulation” dos transportadores de glicose em condições de hiperglicemia grave, os efeitos a longo prazo de hiperglicemia moderada prévia podem já ter determinado alterações celulares definitivas relacionadas às complicações do Diabetes, de forma que seu efeito protetor pode ser insuficiente nestas circunstâncias.

É possível que a associação dos efeitos determinados pelo estado diabético e diminuição do tônus simpático esgote a possibilidade de aumento de síntese da proteína GLUT 1 por mecanismo semelhante ao encontrado por aqueles autores, causando, ao final, sua redução a valores normais, como foi encontrado por Knott e cols. em células endoteliais da retina. O efeito da hiperglicemia em aumentar a proteína GLUT 1 é semelhante ao encontrado por outros autores em células em cultura, mas o mecanismo exato que determinou este aumento quando da desnervação renal no animal não diabético não é conhecido.

Se considerarmos que há necessidade de maior transporte de glicose para dentro da célula mesangial para que sejam desencadeadas as alterações características da gênese da nefropatia diabética, podemos concluir que isto provavelmente não ocorre no momento em que este modelo experimental foi avaliado, isto é, a desnervação renal simpática não está contribuindo para a aceleração da progressão da nefropatia diabética em ratos com Diabetes por estreptozotocina que sofreram desnervação renal cirúrgica 14 dias antes. Isto ainda é reforçado pela ausência de diferenças entre a carga excretada de albumina de animais desnervados e não desnervados, tanto diabéticos como não diabéticos, observada neste estudo, apesar de a albuminúria, relacionada a alterações da matriz mesangial, provavelmente ser uma alteração mais tardia do que os eventos intra-celulares citados.

Mesmo assim não consideramos descartada a hipótese inicial de influências negativas de alterações autonômicas sobre a função renal no Diabetes, tendo em vista que não conhecemos o efeito do Diabetes sobre a inervação renal em humanos ou modelos animais. É possível que a desnervação renal ocorra de forma assimétrica ou simplesmente não ocorra, de forma que poderiam estar presentes na neuropatia diabética, em humanos, além de tônus simpático renal diminuído, tônus simpático aumentado ou normal, e o modelo experimental utilizado então não representaria a condição descrita em humanos. No coração, por exemplo, tanto em modelos animais como em humanos, a desnervação determinada pelo Diabetes ocorre no miocárdio distal, poupando sua porções proximais. Além disto, áreas de hiperinervação simpática proximal foram descritas, reforçando a idéia de que o acometimento do sistema nervoso autônomo é diferente de acordo com o órgão ou tecido avaliado (Stevens, M.J. e cols., 1998 e Schmid e cols., 1999). Nossos resultados caracterizam o efeito da desnervação renal total, não sendo possível, no

momento, considerando os dados da literatura, definir a presença de desnervação equivalente como decorrência do Diabetes experimental em humanos.

Os resultados encontrados por Matsuoka em 1993, utilizando o mesmo modelo experimental (Diabetes por estreptozotocina associado à desnervação renal cirúrgica) são semelhantes aos por nós encontrados quando da avaliação da excreção urinária de albumina 14 dias após o procedimento cirúrgico. No entanto, nas avaliações realizadas 3, 4, 5 e 6 semanas após a desnervação renal, foi observada microalbuminúria significativamente maior nos diabéticos com desnervação renal comparados aos outros grupos. O autor não avaliou a efetividade da simpatectomia cirúrgica através de nenhum método. Como é sabido que a partir de 2 semanas deste procedimento inicia-se reinervação, pelo menos funcional (Kline e Mercer, 1980), seria possível que as alterações encontradas na excreção urinária de albumina se devessem, no estudo de Matsuoka, não à desnervação, como sugerido pelo autor, mas sim ao início da reinervação e aumento do tônus simpático.

Em acordo com esta hipótese estão as recentes observações realizadas em humanos, de que pacientes diabéticos que não apresentam descenso noturno da pressão arterial diastólica (não mergulhadores), provavelmente com tônus simpático aumentado (Spallone e cols., 1993), apresentam maior excreção urinária de albumina em relação a indivíduos que apresentam descenso noturno da pressão arterial (Monteagudo e cols., 1996).

Deste modo, embora uma sugestão prévia encontrada na literatura seja a de que a desnervação renal determine progressão da nefropatia diabética, o presente estudo fornece evidências que sugerem a inexistência deste efeito. Por outro lado, os resultados poderiam sugerir que efeitos deletérios sobre o rim poderiam ser determinados por aumento do tônus simpático renal, o qual, se

determinar efeitos opostos à desnervação, poderia aumentar a expressão de GLUT 1 em células mesangiais, com conseqüente aumento da produção de TGF β 1 e progressão das lesões glomerulares.

Os resultados do estudo III permitem concluir:

1) A desnervação renal determina significativo aumento da excreção urinária de glicose, sem alterar significativamente os níveis glicêmicos e peso corporal dos animais;

2) O Diabetes determina aumento significativo da proteína GLUT 2 no córtex renal, alteração que facilita um aumento do fluxo de glicose trans-tubular, favorecendo a reabsorção proximal da glicose;

3) A desnervação renal determina significativa diminuição da proteína GLUT 2 no córtex renal, alterações que facilitam um menor fluxo de glicose trans-tubular, favorecendo uma menor reabsorção tubular de glicose e maior glicosúria;

4) Tanto a desnervação renal, como o Diabetes determinam aumento da proteína GLUT 1 no córtex renal, os quais poderiam favorecer um aumento da entrada e metabolismo da glicose intra-celular, o que poderia levar a aumento da proteína quinase C, maior expressão de TGF β 1, aumento da matriz extra-celular e albuminúria;

5) A desnervação simpática renal de ratos diabéticos, no entanto, determina diminuição da proteína GLUT 1 no córtex renal, o que tenderia a reverter os efeitos deletérios do Diabetes sobre o glomérulo.

Conclusões

Em conjunto, resumidamente, os resultados apresentados nesta tese permitem concluir:

- 1) Uma maior carga excretada de albumina é observada no Diabetes por estreptozotocina logo nos primeiros dias após a indução, aumentando significativamente durante a evolução;
 - 2) Evidências de disfunção autonômica, tanto parassimpática como simpática, podem ser observadas com 45 a 90 dias de Diabetes induzido por estreptozotocina;
 - 3) O tratamento com insulina previne a deterioração da função autonômica no Diabetes experimental;
 - 4) Embora a desnervação simpática renal e o Diabetes independentemente determinem aumento da proteína GLUT 1 no córtex renal, o efeito da desnervação renal no Diabetes é de reduzir a proteína GLUT 1 nesta região, não havendo efeitos da menor estimulação simpática sobre a excreção urinária de albumina;
- Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que uma diminuição do tônus simpático renal não determina progressão da disfunção renal no Diabetes.

Referências Bibliográficas

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY: Consensus statement: report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, 11:592-7, 1988.

ASADA, T.; OGAWA, T.; IWAI, M.; SHIMOMURA, K. & KOBAYASHI, M.: Recombinant insulin-like growth factor I normalizes expression of renal glucose transporters in diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, 42:F27-F37, 1997.

AYO, S.H.; RADNIK, R.A.; GARONI, J.A.; TROYER, D.A. & KREISBERG, J.I.: High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures. *Am. J. Physiol.*, 261:F571-F577, 1991a.

AYO, S.H.; RADNIK, R.A.; GLASS, W.F.; GARONI, J.A.; RAMPT, E.R.; APPLING, D.R. & KREISBERG, J.I.: Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am. J. Physiol.*, 260:F185-F191, 1991b.

BARAJAS, L.: Innervation of the renal cortex. *Federation Proc.* 36:1192-1201, 1978.

BELAI, A.; LINCOLN, J.; MILNER, P. & BURNSTOCK, G.: Progressive changes in adrenergic, serotonergic and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology*, 95:1234-1241, 1988.

BELLAVERE, F.; BALZANI, I.; DE MASI, G.; CARRARO, M.; CARENZA, P.; COBELLI, C. & THOMASETH, K.: Power spectral analysis of heart-rate variations improves assessment of diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, 41:633-640, 1992.

BELLO-REUSS, E.; COLINDRES, R.E.; PASTORIZA MUNOS E.; MEULLER, R.A. & GOTTSCHALK, C.W.: Effects of acute unilateral renal denervation in the rat. *J. Clin. Invest.* 56:208-217, 1975.

BELLO-REUSS, E.; PASTORIZA MUNOS E.; COLINDRES, R.E: Acute unilateral renal denervation in rats with extracellular volume expansion.: *Am. J. Physiol.*, Jan, 232:1, F26-32, 1977.

BENCSPATH, P.; ASZTALOS, B.; SZALAY, L. & TAKÁCS, L.: Renal handling of sodium after chronic renal sympathectomy in anesthetized rat. *Am. J. Physiol.*, 236:F26-F32, 1979.

BENNETT, T.; HOSKING, D.J. & HAMTON, J.R.: Baroreflex sensitivity and responses to the Valsalva manoeuvre in subjects with diabetes mellitus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 39:178-183, 1976.

BENNETT, T.; FARQUHAR, I.K.; HOSKING, D.J. & HAMTON, J.R.: Assessment of methods for estimating autonomic nervous control of the heart in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*, 27:1167-1174, 1978.

BERTOLUCI, M.C.; SCHMID, H.; LACHAT, J.J. & COIMBRA, T.M.: Transforming growth factor-beta in the development of rat diabetic nephropathy. *Nephron*, 74:189-196, 1996.

BLOCK, N.E.; MENICK, D.R.; ROBINSON, K.A. & BUSE, M.G.: Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J. Clin. Invest.*, 88:1546-1552, 1991.

BORCH-JOHNSEN, K.; ANDERSEN, P.K.; DECKERT, T.: The effect of proteinuria on relative mortality in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 28:590-596, 1985.

BRAVENBOER, B.; KAPELLE, A.C.; HAMERS, E.P.T.; VAN BUREN, T.; ERKELENS, D.W.; GISPEN, W.H.: Potential use of glutathioné for the prevention and treatment of diabetic neuropathy in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetologia*, 35:813-817, 1992.

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

BUCK, A.C., REED, P.I.; SIDDIQ, Y.K.; CHRISHOLM, G.D. & FRASER, T.R.: Bladder dysfunction and neuropathy in diabetes. *Diabetologia*, 12:251-258, 1976.

CAMPBELL, I.W.; HEADING, R.C.; TOTHILL, P.; BUIST, T.A.S. & EWING, D.J.: Gastric emptying in diabetic autonomic neuropathy. *Gut*, 18:462-467, 1977.

CAMPBELL, L.V.; KRAGEN, E.W. & LAZARUS, L.: Defective blood glucose counterregulation in diabetics is a selective form of autonomic neuropathy. *Br. Med. J.*, 2:1527-1530, 1977.

CAMPESE, V.M.; KOGOSOV, E. & KOSS, M.: Renal afferent denervation prevents the progression of renal disease in the renal ablation model of chronic renal failure in the rat. *Am. J. Kid. Dis.*, 26(5):861-865, 1995.

CATTERALL, J.R.; CALVERLEY, P.M.A.; EWING, D.J.; SHAPIRO, C.M.; CLARKE, B.F. & DOUGLAS, N.J.: Breathing, sleep, and diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, 33:1025-1027, 1984.

CHANG, K.S.K. & LUND, D.D.: Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18:617-624, 1986.

CHANG, E.B.; BERGENSTAL, R.M. & FIELD, M.: Diarrhea in streptozotocin-treated rats. *J. Clin. Invest.*, 75:1666-1670, 1985.

CHOPRA, J.S. & FANNIN, T.: Pathology of diabetic neuropathy. *J. Pathol.* 104:175-84, 1971.

COLEMAN, T.G.: Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. *Am. J. Physiol.*, 238 (Heart Circ. Physiol. 7):H515-H520, 1980

CROWE, R.; MILNER, P.; LINCOLN, J. & BURNSTOCK, G.: Histochemical and biochemical investigation of adrenergic, cholinergic, and peptidergic innervation of the rat ventral prostate 8 weeks after streptozotocin-induced diabetes. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 20:103-112, 1987.

CRYER, P.E.: Glucose counterregulation in man. *Diabetes*, 30:261-264, 1981.

DAFFONCHIO, A.; FRANZELLI, C.; RADAELLI, A.; CASTIGLIONI, P.; DI RIENZO, M.; MANCIA, G. & FERRARI, A.U.: Sympathectomy and cardiovascular spectral components in conscious normotensive rats. *Hypertension*, 25:1287-1293, 1995.

DALL'AGO, P.; FERNANDES, T.G.; MACHADO, U.F.; BELLÓ, A.A. & IRIGOYEN, M.C.: Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30(1):119-124, 1997a.

DALL'AGO, P.; SCHAAN, B.D.; FERNANDES, T.G.; & IRIGOYEN, M.C.: Abnormal function of baroreceptor and chemoreceptor after experimental diabetes in rats. *Annals of the Eighth European Meeting on Hypertension*, 1997b.

DANIELS, B.S. & HOSTETTER, T.H.: Aldose reductase inhibition and glomerular abnormalities in diabetic rats. *Diabetes*, 38:981-986, 1989.

DIBONA, G.F. & KOPP, U.C.: Neural control of renal function. *Physiol. Rev.*, 77(1):75-197, 1997.

DICK, P.J.; LAIS, A.; KARNES, J.L.; O'BRIEN, P. & RIZZA, L.: Fiber loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. *Ann. Neurol.*, 19:425-439, 1986.

DILLMANN, W.H.: Influence of thyroid hormone administration on myosin ATPase activity and myosin isoenzyme distribution in the heart of diabetic rats. *Metabolism*, 31(3):199-204, 1982.

DOMINGUEZ, J.H.; CAMP, K.; MAIANU, L. & GARVEY, T.: Glucose transporters of rat proximal tubule: differential expression and subcellular distribution. *Am. J. Physiol.*, 262:F807-F812, 1992.

DOMINGUEZ, J.H.; CAMP, K.; MAIANU, L.; FEISTER, H. & GARVEY, T.: Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, 266:F282-F290, 1994.

DYRBERG, T.; BENN, J.; SANDAHL CHRISTIANSEN, J.; HILSTED, J.; NERUP, J.: Prevalence of diabetic autonomic neuropathy measured by simple bedside tests. *Diabetologia*, 20:190-194, 1981.

ECKBERG, D.L.; HARKINS, S.W.; FRITSCH, J.M.; MUSGRAVE, G.E. & GARDNER, D.F.: Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart period in healthy subjects and diabetic patients. *J. Clin. Invest.*, 78(2):366-374, 1986.

EDMONDS, M.E. & WATKINS, P.J.: Plantar neuropathic ulcer and charcot joints: Risk factors, presentation and management. In: *Diabetic Neuropathy*, ed. by Dyck, P.J. e Thomas, P.K., pp 398-406, 2nd Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998.

ELIASSON, S.G.: Nerve conduction changes in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.*, 43:2353-2358, 1964.

ELLIS, E.N.; BROUHARD, B.H. & LAGRONE, L.: Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Med.*, 31(3):303-310, 1984.

EWING, D.J., CAMPBELL, I.W.; BURT, A.A. & CLARKE, B.F.: Vascular reflexes in diabetic autonomic neuropathy. *Lancet*, 2:1354-1356, 1973.1973

EWING, D.J., CAMPBELL, W.; CLARKE, B.F.: The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q. J. Med.*, 193:95-108, 1980.

EWING, D.J. & CLARKE, B.F.: Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *Br. Med. J.*, 295:916-918, 1982.

EWING, D.J., BORSEY, D.Q.; TRAVIS, P.; BELLAVERE, F.; NEILSON, J.M.M. & CLARKE, B.F.: Abnormalities of ambulatory 24-h heart rate in diabetes mellitus. *Diabetes*, 32:101-105, 1983.

EWING, D.J.; NEILSON, J.M.M. & TRAVIS, P.: New method for assessing cardiac parasympathetic activity using 24 hour electrocardiograms. *Br Heart J*, 52:396-402, 1984.

EWING, D.J., CHRISTOPHER, N.; MARTYN, M.B.; YOUNG, R.J. & CLARKE, B.F.: The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care*, 8(5):491-498, 1985.

EWING, D.J. & CLARKE, B.F.: Autonomic neuropathy: its diagnosis and prognosis. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 15(4):855-888, 1986.

FAERMAN, I.; FACCIO, E. & CALB, I.: Autonomic neuropathy in the skin: a histological study of the sympathetic nerve fibers in diabetic anhidrosis. *Diabetologia*, 22:96-99, 1982.

FAGERBERG, S.E.: Diabetic neuropathy, a clinical and histological study on the significance of vascular affections. *Acta Med. Scand.*, 345:1-97, 1959.

FAZAN, R.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C. O.; MORAES, M. F. D. & SALGADO, H.C.: Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension*, 30[part 2]:632-635, 1997.

FEALEY, R.D.; LOW, P.A. & TOMAS, J.E.: Thermoregulatory sweating abnormalities in diabetes mellitus. *Mayo Clin. Proc.*, 64:617-628, 1989.

FELDMAN, E.; STEVENS, M.J. & GREENE, D.A.: Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin. Neurosci.*, 4:365-370, 1997.

FELTEN, S.Y.; PETERSON, R.G.; SHEA, P.A.; BESCH, H.R. & FELTEN, D.L.: Effects of streptozotocin diabetes on the noradrenergic innervation of the rat heart: A longitudinal histofluorescence and neurochemical study. *Brain Res. Bulletin*, 8:593-607, 1982.

FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y. & MELMAN, A.: Noradrenergic innervation of the penis in control and streptozotocin-diabetic rats: evidence of autonomic neuropathy. *Anat. Res.*, 206(1):49-59, 1983.

FERRER, M.T.; KENNEDY, W.R. & SAHINEN, F.: Baroreflexes in patients with diabetes mellitus. *Neurology*, 41:1462-1466, 1991.

FICKER, J.H.; DERTINGER, S.H.; SIEGFRIED, W.; KÖNIG, H.J.; PENTZ, M.; SAILER, D.; KATALINIC, A. & HAHN, E.G.: Obstructive sleep apnoea and diabetes mellitus: the role of cardiovascular autonomic neuropathy. *Eur. Respir. J.*, 11(10):14-19, 1998.

FUSHIMI, H.; INOUE, T.; NAMIKAWA, H.; KISHINO, B.; NISHIKAWA, B.; TOCHINO, Y. & FUNAKAWA, S.: Increased norepinephrine content in diabetic rat heart. *J. Biochem. (Tokyo)*, 91(5):1805-1807, 1982.

FUSHIMI, H.; INOUE, T.; KISHINO, B.; NISHIKAWA, B.; TOCHINO, Y.; FUNAKAWA, S.; YAMATODANI, A. & WADA, H.: Abnormalities in plasma catecholamine response and tissue catecholamine accumulation in streptozotocin diabetic rats: a possible role for diabetic autonomic neuropathy. *Life Sci.*, 35(10):1077-1081, 1984.

GANGULY, P.K.; BEAMISH, R.E.; DHALLA, K.S.; INNES, I.R. & DHALLA, N.S.: Norepinephrine storage, distribution, and release in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.*, 252:E734-E739, 1987.

GARFIN, D.E.: One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, 182:425-441, 1990.

GARTNER, J. & FISCHER, F.: Experimental autonomic neuropathy in the choroid of streptozotocin-diabetic rats. Electron microscopic observations. *Retina*, 9(1):49-58, 1989.

GLOWNIAK, J.V.: Cardiac studies with metaiodobenzylguanidine: A critique of methods and interpretation of results. *J. Nucl. Med.*, 36:2133-2137, 1995.

GOTZSCHE, O.: The adrenergic β -receptor adenylate cyclase system in heart and lymphocytes from streptozotocin-diabetic rats. In vivo and in vitro evidence for a desensitized myocardial β -receptor. *Diabetes*, 32:1110-1116, 1983.

GOULD, G.W. & HOLMAN, G.D.: The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.*, 295:329-341, 1993.

GREENBERG, O. & OSBORN, J.L.: Relationship between sodium balance and renal innervation during hypertension development in the spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.*, 12:1359-1364, 1994.

GREENE, D.A. & LATTIMER, S.A.: Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozotocin diabetes and its correction by dietary myo-inositol supplementation. *J. Clin. Invest.*, 72:1058-1063, 1983.

GREENE, D.A.; YAGIHASHI, S.; LATTIMER, S.A.; SIMA, A.A.: Nerve Na⁺-K⁺-ATPase, conduction, and myo-inositol in the insulin-deficient BB rat. *Am. J. Physiol.*, 247:4 Pt 1, E534-9, 1984.

GREENE, D.A. & MACKAY, A.M. : Decreased myo-inositol content and Na-K-ATPase activity in superior cervical ganglion of STZ-diabetic rat and prevention by aldose-reductase inhibition. *Diabetes*, 35:1106-1108, 1986.

GREENE, D.A.; LATTIMER, S.A. & SIMA, A.A.F.: Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetes complications. *N. Engl. J. Med.*, 316:599-606, 1987.

GREENE, D.A.; SIMA, A.A.F.; STEVENS, M.J.; FELDMAN., E.L.; KILLEN, P.D.; HENRY, D.N.; THOMAS, T.; DANANBERG, J. & LATTIMER, S.A.: Aldose reductase inhibitors: An approach to the treatment of diabetic nerve damage. *Diabetes/Metab. Rev.*, 9:189-217, 1993.

HA, H.; KIM, C.; SON, Y.; CHUNG, M.H. & KIM, K.H.: DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria. *Free Radic. Biol. Med.*, 16(2):271-274, 1994.

HANSEN, H.P.; ROSSING, P.; TARNOW, F.S.; JENSEN, B.R. & PARVING, H-H.: Circadian rhythm of arterial blood pressure and albuminuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, 50:579-585, 1996.

HAYANO, J.; SAKAKIBARA, Y.; YAMADA, A.; YAMADA, M.; MUKAI, S.; FUJINAMI, T.; YOKOYAMA, K.; WATANABE, Y. & TAKATA, K.: Accuracy of assessment of cardiac vagal tone by heart rate variability in normal subjects. *Am. J. Cardiol.*, 67:199-204, 1991.

HEAD, R.J. & BERKOWITZ, B.A.: Vascular and circulating catecholamines in diabetes and hypertension. In *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers*, ed. By E. Usdin, I.J. Kopin, and J. Barchas, pp. 1518-1520, Pergamon Press, Oxford, New York, 1979.

HEBDEN, R.A.; GARDINER, S.M.; BENNETT, T. & MAC DONALD, I.A.: The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin. Sci.*, 70(1):111-117, 1986.

HEBDEN, R.A.; BENNETT, T. & GARDINER, S.M.: Abnormal blood pressure recovery during ganglion blockade in diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, 252:R102-R108, 1987.

HEDIGER, M.A. & RHOADS, D.B.: Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol. Rev.*, 74(4):993-1026, 1994.

HEILIG, C.W.; CONCEPCION, L.A.; RISER, B.L.; FREYTAG, S.O.; ZHU, M. & CORTES, P.: Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J. Clin. Invest.*, 96:1802-1814, 1995a.

HEILIG, C.W.; ZALOGA, C.; LEE, M.; ZHAO, X.; RISER, B.; BROSIUS, F. & CORTES, P.: Immunogold localization of high-affinity glucose transporter isoforms in normal rat kidney. *Lab. Invest.*, 73 (5):674-684, 1995b.

HEILIG, C.W.; BROSIUS III, F.C. & HENRY, D.N.: Glucose transporters of the glomerulus and the implications for diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, 52 (Suppl. 60), S-91-S-99, 1997a.

HEILIG, C.W.; LIU, Y.; ENGLAND, R.L.; FREYTAG, S.O; GLIBERT, J.D.; HEILIG, K.O; ZHU, M.; CONCEPCION, L.A. & BROSIUS III, F.C.: D-glucose stimulates mesangial cell Glut1 expression and basal and IGF-I-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *Diabetes*,46:1030-1039,1997b.

HEILIG, C.W.; LIU, Y.; ENGLAND, R.L.; FREYTAG, S.O; GILBERT, J.D.; HEILIG, K.O; ZHU, M.; CONCEPCION, L.A. & BROSIUS III, F.C.: D-glucose stimulates mesangial cell Glut1 expression and basal and IGF-I-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *Diabetes*,46:1030-1039,1997c.

HELLWEG, R. & HARTUNG, H.D.: Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J. Neurosci. Res.*, 26:258-267, 1990.

HENRIKSEN, E.J.; RODNIK, K.J.; MONDON, C.E.; JAMES, D. & HOLLOSZY, J.O.: Effect of denervation or unweighting on GLUT-4 protein in rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 70(5):2322-2327, 1991.

HERMAN, L.M.; DAI, S.; HARTMAN, N.G. & McNEILL, J.H.: Meta-iodobenzylguanidine uptake in the hypertensive diabetic rat heart: a marker for myocardial dysfunction? *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 72:1162-1167, 1994.

HEYLIGER, C.E.; PRAKASH, A.; McNEILL, J.H.: Alterations in cardiac sarcolemmal Ca²⁺ pump activity during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.*, 252(3):H540-H544, 1987.

HIRSCH, J.; LEIBEL, R.L.; MACKINTOSH, R. & AGUIRRE, A.: Heart rate variability as a measure of autonomic function during weight change in humans. *Am. J. Physiol.*, 261(6):R418-R423, 1991.

HOMMA, S.; YAMAZAKI, Y. & KARAKIDA, T.: Blood pressure and heart rate relationships during cervical sympathetic and vagus nerve stimulation in streptozotocin diabetic rats. *Brain Res.*, 629:342-344, 1993.

IRIGOYEN, M.C.; CESTARI, L.A.; MOREIRA, E.D.; OSHIRO, M.S. & KRIEGER, E.M.: Measurements of renal sympathetic nerve activity in conscious sinoaortic denervated rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21: 869-871, 1988.

ISHII, H.; TADA, H. & ISOGAI, S.: An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor- β and protein kinase C activity in cultured human mesangial cells. *Diabetologia* 41:362-364, 1998.

JACKSON, C.V. & CARRIER, G.O.: Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 5:260-265, 1983.

JAKOBSEN, J.: Early and preventable changes of peripheral nerve structure and function in insulin-deficient diabetic rats. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 42:509-518, 1979.

JAPUNDZIC-ZIGON, N.; BAJCETIC, M. & SAMARDZIC, R.: Blood pressure and heart rate variability in dehydrated conscious rats. *Clin. Auton. Res.*, 1997(7):113, 1997.

JAPUNDZIC-ZIGON, N.: Physiological mechanisms in regulation of blood pressure fast frequency variations. *Clin. Exp. Hypertens.*, 20(4):359-388, 1998.

- JENSEN, P.K.; SANDAHL CHRISTIANSEN, J.; STEVEN, K.; PARVING, H.-H.: Renal function in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 21:409-414, 1981.
- JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W. & RENOLD, A.E.: Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.*, 48:2129-2139, 1969.
- KAHN, B.B.: Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J. Clin. Invest.*, 89:1367-1374, 1992.
- KAMRAN, M.; PETERSON, R.G.; DOMINGUEZ, J.H.: Overexpression of GLUT2 gene in renal proximal tubules of diabetic Zucker rats.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 8:6, 943-948, 1997.
- KANEDA, K.; IWAO, J.; SAKATA, N. & TAKEBAYASHI, S.: Correlation between mitochondrial enlargement in renal proximal tubules and microalbuminuria in rats with early streptozotocin-induced diabetes. *Acta Pathol. Jpn.*, 42(12):855-860, 1992.
- KAPPAGODA, C.T.; KARIN, F. & KAUFMAN, S.: A decrease in renal vascular resistance from stimulation of the right atrial receptors in the dogs. *J. Physiol.*, 318:51-52P, 1981.
- KARLSSON, J.; CUMMINS, P.; SMITH, H.J.; BERGGREN, P.-O. & SAARTOK, T.: Effects of chronic sympathectomy on muscle fibre composition ISSO-myosin patterns, protein synthesis and calcium content in canine gracili muscle. *Clin. Physiol.*, 8:181-191, 1988.
- KLINE, R.L. & MERCER, P.F.: Functional reinnervation and development of supersensitivity to NE after renal denervation in rats. *Am. J. Physiol.*, 238(5):R353-358, 1980.
- KNIEL, P.C.; JUNKER, U.; PERRIN, I.V.; BESTETTI, G.E. & ROSSI, G.L.: Varied effects of experimental diabetes on the autonomic nervous system of the rat. *Lab. Invest.*, 54(5):523-530, 1986.

- KNOTT, R.M.; ROBERTSON, M.; MUCKERSIE, E. & FORRESTER, J.V.: Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells. *Biochem. J.*, 318:313-317, 1996.
- KOLTA, M.G.; WALLACE, L.J. & GERALD, M.C.: Streptozotocin-induced diabetes affects rat urinary bladder response to autonomic agents. *Diabetes*, 34:917-921, 1985.
- KREISBERG, J.I. & AYO, S.H.: The glomerular mesangium in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 43:109-113, 1993.
- KROLEWSKI, A.S; WARRAM, J.H.; CHRISTLIEB, A.R.: Onset, course, complications, and prognosis of diabetes mellitus. In: Marble A., Krall L.P., Bradley R.F., Christlieb A.R., Soeldner, J.S. eds. *Joslin's diabetes mellitus*, 12th ed. Philadelphia: Lea & Febiger:251-277, 1985.
- KROLEWSKI, A.S.; BARZILAY, J.; WARRAM, J.H.; MARTIN, B.C.; PFEIFER, M.; RAND, L.: Risk of early-onset proliferative retinopathy in IDDM is closely related to cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes*, 41:430-437, 1992.
- KRIZSAN-AGBAS, D. & BUÑAG, R.D.: Normotensive diabetic BB/W rats show enhanced reflex tachycardia. *Diabetes*, 40:1504-1510, 1991.
- KUMAGAI, A.K.; VINOES, S.A. & PARDRIDGE, W.M.: Pathological upregulation of inner blood-retinal barrier GLUT1 glucose transporter expression in diabetes mellitus. *Brain Res.* 706:313-317, 1996.
- KURATA, C.; OKAYAMA, K.; WAKABAYASHI, Y.; SHOUDA, S.; MIKAMI, T.; TAWARAHARA, K. & SUGIYAMA, T.: Cardiac sympathetic neuropathy and effects of aldose reductase inhibitor in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nucl. Med.*, 38: 1677-1680, 1997.
- KUSAKA, M.; KISHI, K. & SOKABE, H.: Does so-called streptozotocin (STZ) hypertension exist in rats? *Hypertension*, 10:517-521, 1987.

LACCHINI, S.: Regulação da pressão arterial na normotensão: papel dos nervos renais e sódio. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-ênfase em Fisiologia da UFRGS, sob orientação da Profª Dra Maria Cláudia Costa Irigoyen. Porto Alegre, 1996.

LANGER, A.; FREEMAN, M.R.; JOSSE, R.G. & ARMSTRONG, P.W.: Metaiodobenzylguanidine imaging in diabetes mellitus: assessment of cardiac sympathetic denervation and its relation to autonomic dysfunction and silent myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 25:610-618, 1995.

LINCOLN, J.; BOKOR, J.T.; CROWE, R.; GRIFFITH, S.G.; HAVEN, A.J. & BURNSTOCK, G.: Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology*, 86(4):654-661, 1984.

LITWIN, S.E.; RAYA, T.E.; ANDERSON, P.G.; DAUGHERTY, S. & GOLDMAN, S.: Abnormal cardiac function in the streptozotocin-diabetic rat. *J. Clin. Invest.*, 86:481-488, 1990.

LUND, D.D.; SUBIETA, A.R.; PARDINI, B.J. & CHANG, K.S.K.: Alterations in cardiac parasympathetic indices in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes*, 41:160-166, 1992.

MACHADO, U.F.; SHIMIZU, Y. & SAITO, M.: Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT4) in white adipose tissue of obese mice. *Physiol. Behav.*, 55_621-625, 1994.

MACLEAN, D.B.: Substance P and somatostatin content and transport in vagus and sciatic nerves of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes*, 36:390-395, 1987.

MAEDA, C.Y.; FERNANDES, T.G.; LULHIER, F. & IRIGOYEN, M.C.: Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 497-501, 1995a.

MAEDA, C.Y.; FERNANDES, T.G.; TIMM, H.B. & IRIGOYEN, M.C.: Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension*, 26(6):1100-1104, 1995b.

MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F. & CERUTTI, S.: Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, 84(2): 482-492, 1991.

MALPAS, S.C. & MALING, T.J.: Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. *Diabetes*, 39:1177-1181, 1990.

MANCIA, G. & ZANCHETTI, A.: Blood pressure variability. *Handbook of Hypertension*, vol 7: Pathophysiology of Hypertension: Cardiovascular Aspects. Chapter 8: Blood Pressure Variability, pp 125-152, Elsevier Science Publishers B. V., 1986.

MANCIA, G.; PALEARI, F. & PARATI, G.: Early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy: present and future approaches. *Diabetologia*, 40:482-484, 1997.

MANSIER, P.; MÉDIGUE, C.; CHARLOTTE, N.; VERMEIREN, C.; CORABOEUF, E.; DEROUBAI, E.; RATNER, E.; CHEVALIER, B.; CLAIRAMBAULT, J.; CARRÉ, F.; DAHKILI, T.; BERTIN, B.; BRIAND, P., STROSBERG, D. & SWYNGHEDAUF, B.: Decreased heart rate variability in transgenic mice overexpressing atrial beta 1-adrenoceptors. *Am. J. Physiol.*, 271(4):H1465-H1472, 1996.

MANTYSAARI, M.; KUIKKA, J.; MUSTONEN, J.; TAHVANAINEN, K.; VANNINEN, E.; LANSIMIES, E. & UUSITUPA, M.: Noninvasive detection of cardiac sympathetic nervous dysfunction in diabetic patients using [¹²³I] metaiodobenzilguanidine. *Diabetes*, 41:1069-1075, 1992.

MARTYN, C.N. & EWING, D.J.: Pupil cycle time - a simple way of measuring an autonomic reflex. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 49:771-774, 1986.

- MASER, R.E.; PFEIFER, M.A.; DORMAN, J.S.; KULLER, L.H.; BECKER, D.J. & ORCHARD, T.J.: Diabetic autonomic neuropathy and cardiovascular risk. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study III. Arch. Int. Med., 150:1218-1222, 1990.
- MATSUOKA, H.: Protective role of renal nerves in the development of diabetic nephropathy. Diabetes Res., 23: 19-29, 1993.
- McEWEN, T.A. & SIMA, A.A.: Autonomic neuropathy in BB rat. Assessment by improved method for measuring heart-rate. Diabetes, 36(3):251-255, 1987.
- McDOWELL, T.S.; CHAPLEAU, M.W.; HAJDUCZOK, G. & ABBOUD, F. M.: Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus. I. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate. Am. J. Physiol, 266 (Heart Circ. Physiol. 35): H235-H243, 1994.
- MEGENEY, L.A.; PRASAD, M.A.; TAN, M.H. & BONEN, A.: Expression of the insulin-regulatable transporter GLUT-4 in muscle is influenced by neurogenic factors. Am. J. Physiol., 266:E813-E816, 1994.
- MØLGAARD, H.; CHRISTENSEN, P.D.; SORENSEN, K.E.; CHRISTENSEN, C.K.; MOGENSEN, C.E.: Association of 24-h cardiac parasympathetic activity and degree of nephropathy in IDDM patients. Diabetes, 41:812-817, 1992.
- MONCKTON, G. & PEHOWICH, E.: Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. Can. J. Neurol. Sci., 7:135-142, 1980.
- MONTEAGUDO, P.T.; NÓBREGA, J.C.; CEZARINI, P.R.; FERREIRA, S.R.G.; KOHLMANN Jr., O.; RIBEIRO, A.B. & ZANELLA, M.T.: Altered blood pressure profile, autonomic neuropathy and nephropathy in insulin-dependent diabetic patients. European J. Endocrinol., 135:683-688, 1996.
- MORAES, R.; FERLIN, E.; POLANCZIK, C.; WAINSTEIN, M.; ZASLAWSKI, L. & RIBEIRO, J. P.: Three dimension return map: a method for quantification of heart rate variability. J. Am. Col. Cardiol., 21 (Suppl 2): 156A, 1993.

- MORAES, R.; FERLIN, E.; TIMM, H.; MOREIRA, E.; KRIEGER, E.; IRIGOYEN, M.C. & RIBEIRO, J.P.: Blood pressure variability in sinoaortic denervated rats with the 3-dimensional return map. *Annals of Non-invasive Electrocardiology*, 1(2), part 2, 1996.
- MUECKLER, M.: Facilitative glucose transporters.: *Eur. J. Biochem.*, 219:713-725, 1994.
- MUNOZ, A.; SERRANO, C.; GARCIA-ESTAN, J.; QUESADA, T. & PORTUGAL, M.: Effect of diabetic hyperglycemia and other sugars on plasma-dopamine- β -hydroxylase activity. *Diabetes*, 33:1127-1132, 1984.
- MURATA, K.; SUMIDA, S.; MURASHIMA, S.; MATSUMURA, K.; TAKEDA, H.; NAKAGAWA, T. & SHIMA, T.: A novel method for the assessment of autonomic neuropathy in type 2 diabetic patients: a comparative evaluation of ^{123}I -MIBG myocardial scintigraphy and power spectral analysis of heart rate variability. *Diabet. Med.*, 13:266-272, 1996.
- NAKAMURA, J.; DEL MONTE, M.A.; SHEWACH, D.; LATTIMER, S.A. & GREENE, D.A.: Inhibition of phosphatidylinositol synthase by glucose in human retinal pigment epithelial cells. *Am. J. Physiol (Endocrinol. Metab.)*, 262:E417-E426, 1992.
- NAKASHIMA, A.; MATSUOKA, H.; YASUKAWA, H.; KOHNO, K.; NISHIDA, H.; NOMURA, G.; IMAIZUMI, T. & MORIMATSU, M.: Renal denervation prevents intra-glomerular platelet aggregation and glomerular injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Nephron*, 73:34-40, 1996.
- NAWAR, N.N.; SABA, J.A. & KAMEL, I.: Autonomic neuropathy of the adrenal gland of rats after alloxan diabetes. *J. Med.*, 6(1):89-96, 1975.
- NEGRÃO, C.E.; MOREIRA, E.D.; SANTOS, M.C.L.M.; FARAH, V.M.A. & KRIEGER, E.M.: Vagal function impairment after exercise training. *J. Appl. Physiol.*, 72:1749-1753, 1992.

- NETTEN, P.M.; BOOTS, J.M.M.; BREDIE, S.J.H.; DEN AREND, J.A.C.J.; MOL, M.J.T.M.; THIEN, T.; HOEFNAGELS, W.H.L. & LUTTERMAN, J.A.: An automated computerized method using Finapres for measuring cardiovascular reflexes. *Clin. Sci.*, 83:157-163, 1992.
- NEUMANN, C.; MARTINEZ, D. & SCHMID, H.: Nocturnal oxygen desturation in diabetic patients with severe autonomic neuropathy. *Diab. Res. Clin. Prac.*, 28:97-102, 1995.
- NEUMANN, C. & SCHMID, H.: Relationship between the degree of cardiovascular autonomic dysfunction and symptoms of neuropathy and other complications of diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28:751-757, 1995.
- NICHOLL, T.A.; LOPASCHUK, G.D. & MACNEILL, J.H.: Effects of free fatty acids and dichloroacetate on isolated working diabetic rat heart. *Am. J. Physiol.*, 261: H1053-H1059, 1991.
- NICKANDER, K.K.; SCHMELZER, J.D.; ROHWER, D.A. & LOW, P.A.: Effect of α -tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve. *J. Neurol. Sci.*, 126:6-14, 1994.
- OLIVEIRA, V.L.L.; IRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; STRUNZ, C. & KRIEGER, E.M.: Renal denervation normalizes pressure and baroreceptor reflex in high renin hypertension in conscious rats. *Hypertension*, 19 (Suppl II):II-17-II-21, 1992.
- ÖZTÜRK, Y.; ALTAN, V.M. & YILDIZOGLU-ARI, N.: Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.*, 48(1):69-112, 1996.
- PARATI, G.; SAUL, J.P.; DI RIENZO, M. & MANCIA, G.: Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation: A critical appraisal. *Hypertension*, 25: 1276-1286, 1995.

- PARVING, H-H.; SMIDT, U.M.; FRIISBERG, B.; BONNEVIE-NIELSEN, V.; ANDERSEN, A.R.: A prospective study of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in insulin-dependent diabetics with diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 20:457-461, 1981.
- PFEIFER, M.A.; JUNG, S.; CRAIN, G. & SCHUMER, M.: Autonomic neuropathy. *Diabetic Med.* 10 (Suppl2):70S-73S, 1993.
- PIRYOVA, B.; NATCHEFF, N.B & KIRKOVA, N.L.: Effect of renal denervation on glucose transport. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.*, 6(1):3-8, 1980.
- POULSEN, P.L.; EBBEHØJ, E.; HANSEM, K.W. & MOGENSEN, C.E.: 24-h blood pressure and autonomic function is related to albumin excretion within the normoalbuminuric range in IDDM patients. *Diabetologia* 40:718-725, 1997.
- RHIND, G.R.; GOULD, G.A.; EWING, D.J.; CLARKE, B.F. & DOUGLAS, N.J.: Increased bronchial reactivity to histamine in diabetic autonomic neuropathy. *Clin. Sci.*, 73:401-405, 1987.
- ROCCO, M.; CHEN, Y.; GOLDFARB, S. & ZIYADEH, F.N.: Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int.* 41:107-114, 1992.
- ROSENSPIRE, K.C.; HAKA, M.S.; VAN DORT, M.E.; JEWETT, D.M.; GILDERSLEEVE, D.L.; SCHWAIGER, M. & WIELAND, D.M.: Synthesis and preliminary evaluation of carbon-11-meta-hydroxyephedrine: A false transmitter agent for heart neuronal imaging. *J. Nucl. Med.*, 31:1328-1334, 1990.
- RUBINI, R.; PORTA, A.; BASELLI, G.; CERUTTI, S. & PARO, M.: Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 45(3):181-190, 1993.
- SAID, G.; SLAMA, G. & SELVA, J.: Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy. *Brain*, 106:791-807, 1983.

SCHMID, H.; BERTOLUCI, M.C.; COIMBRA, T.M.: Determinação da excreção urinária de albumina por eletroimunoensaio (EIE). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 33(4):73-75, 1989.

SCHMID, H.; SCHAAN, B.D.; CECCONELLO, F.; MAESTRI, T. & NEUMANN, C.: Proliferative diabetic retinopathy is related to cardiovascular autonomic neuropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res. and Clin. Pract.* 29:163-168, 1995.

SCHMID, H.; FORMAN, L.A.; CAO, X.; SHERMAN, P.S. & STEVENS, M.: Heterogeneous cardiac denervation and decreased myocardial nerve growth factor in streptozotocin diabetic rats: Implications for cardiac sympathetic dysinnervation complicating diabetes. *Diabetes*, aceito para publicação, 1999.

SCHMIDT, R.E. & SHARP, D.W.: Axonal dystrophy in experimental diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, 31:761-770, 1982.

SCHMIDT, R.E.; PLURAD, S.B. & MODERT, C.W.: Experimental diabetic autonomic neuropathy characterization in streptozotocin-diabetic sprague-dawley rats. *Lab. Inves.*, 49(5):538-552, 1983.

SCHMIDT, R.E. & PLURAD, S.B.: Ultrastructural and biochemical characterization of autonomic neuropathy in rats with chronic streptozotocin diabetes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 45:525-544, 1986.

SCHMIDT, R.E.; PLURAD, S.B.; SHERMAN, W.R.; WILLIAMSON, J.R. & TILTON, R.G.: Effects of aldose-reductase on neuroaxonal dystrophy and levels of myo-inositol and sorbitol in sympathetic autonomic ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 38: 569-579, 1989.

SCHMIDT, R.E.; PLURAD, S.B.; COLEMAN, B.D.; WILLIAMSON, J.R. & TILTON, R.G.: Effects of sorbinil, dietary myo-inositol supplementation, and insulin on resolution of neuroaxonal dystrophy in mesenteric nerves of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 40:574-582, 1991.

SEAQUIST, E.R.; GOETZ, F.C.; RICH, S.; BARBOSA, J.: Familial clustering of diabetic kidney disease. *N. Engl. J. Med.*, 320(18):1161-1165, 1989.

SENGES, J.; BRACHMANN, J.; PELZER, D.; HASSLACHER, C.; WEIHE, E. & KÜBLER, W.: Altered cardiac automaticity and conduction in experimental diabetes mellitus. *J. Mol. Cell. Card.*, 12:1341-1351, 1980.

SGOIFO, A.; de BOER, S.F.; WESTENBROECK, C.; MAES, F.W.; BELDHUIS, H.; SUZUKI, T. & KOOHAAS, J.M.: Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild-type rats exposed to social stress. *Am. J. Physiol.*, 273(4):H1754-H1760, 1997.

SHAHANI, B.; HALPERIN, J.J.; BOULU, P. & COHEN, J.: Sympathetic skin response-a method of assessing unmyelinated axon dysfunction in peripheral neuropathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 47:536-542, 1984.

SIMA, A.A.F. & HAY, K.: Functional aspects and pathogenetic considerations of the neuropathy in the spontaneously diabetic BB-Wistar rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 7:341-350, 1981.

SIMA, A.A.F.: The development and structural characterization of the neuropathies in the spontaneously diabetic BB Wistar rat. *Metabolism*, suppl 1 32(7):106-111, 1983.

SIMA, A.A.: Can the BB-rat help to unravel diabetic neuropathy? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 11:4, 253-64, 1985.

SIMA, A.A.F.; NATHANIEL, V.; BRIL, V.; McEWEN, T.A.; GREENE, D.A.: Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axoglial dysjunction in human diabetic neuropathy. *J. Clin. Invest.*, 81:349-64, 1988.

SMITH, S.E.; SMITH, S.A. & BROWN, P.M.: Cardiac autonomic dysfunction in patients with diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 21:525-528, 1981.

SOLER, N.G. & EAGLETON, L.E.: Autonomic neuropathy and the ventilatory responses of diabetics to progressive hypoxemia and hypercapnia. *Diabetes*, 31:609-614, 1982.

SPALLONE, V.; GAMBARDELLA, S.; MAIELLO, M.R.; FRONTONI, S. & MENZINGER, G.: Altered 24h blood pressure profile in type 1 diabetes is associated with autonomic neuropathy and not with microalbuminuria. *Diabetologia*, 36 (Suppl 1):A26, 1993a.

SPALLONE, V.; BERNARDI, L.; RICORDI, L.; SOLDÀ, P.; MAIELLO, M.R.; CALCIATI, A.; GAMBARDELLA, S.; FRATINO, P. & MENZINGER, G.: Relationship between the circadian rhythms of blood pressure and sympathovagal balance in diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, 42:1745-1752, 1993b.

SPALLONE, V.; GAMBARDELLA, S.; MAIELLO, M.R.; BARINI, A.; FRONTONI, S. & MENZINGER, G.: Relationship between autonomic neuropathy, 24-h blood pressure profile, and nephropathy in normotensive IDDM patients. *Diabetes Care* 17(6):578-584, 1994.

SPALLONE, V. & MENZINGER, G.: Diagnosis of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes. *Diabetes*, 46(Suppl 2):S67-S76, 1997.

STEVENS, M.J.; FELDMAN, E.L. & GREENE, D.A.: The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabet. Med.*, 12(7):566-579, 1995.

STEVENS, M.J.; RAFFEL, D.M.; ALLMAN, K.C.; DAYANIKLI, F.; FICARO, E.; SANDFORD, T.; WIELAND, D.M.; PFEIFER, M.A. & SCHWAIGER, M.: Cardiac sympathetic dysinnervation in diabetes. *Circulation*, 98:961-968, 1998.

STORNETTA, R.L.; GUYENET, P.G. & McCARTY, R.C.: Autonomic nervous system of heart rate during baroreceptor activation in conscious and anesthetized rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 20:121-127, 1987.

SUNDARESAN, P.R.; SHARMA, V.K.; GINGOLD, S.I. & BANERJEE, S.P.: Decreased beta-adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology*, 114(4):1358-1363, 1984.

SUNDKVIST, G. & LILJA, B.: Autonomic neuropathy predicts deterioration in glomerular filtration rate in patients with IDDM. *Diabetes Care*, 16(5):773-779, 1993.

SZALAY, L.; BENCSÁTH, P. & TAKÁCS, L.: Effect of splanchnicotomy on the renal excretion of d-glucose in the anesthetized dog. *Pflügers Arch.*, 369:79-84, 1977.

TAL, M.; KAHN, B.B. & LODISH, H.F.: Expression of the low K_m GLUT-1 glucose transporter is turned on in perivenous hepatocytes of insulin-deficient rats. *Endocrinology*, 129:1933-1941, 1991.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY: Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*, 93:1043-1065, 1996.

TESFAMARIAM, B.; BROWN, M.L.; KEYKIN, D. & COHEN, R.A.: Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 85:929-932, 1990.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 329:977-986, 1993.

THOMAS, T.P.; FELDMAN, E.L.; NAKAMURA, J.; KATO, K.; LIEN, M. STEVENS, M.J. & GREENE, D.A.: Ambient glucose and aldose reductase-induced myo-inositol depletion modulate basal and carbachol-stimulated inositol phospholipid metabolism and diacylglycerol accumulation in human retinal pigment epithelial cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9712-9716, 1993.

THORENS, B.; WEIR, G.C.; LEAHY, J.L.; LODISH, H.F. & BONNER-WEIR:
Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta-cells of diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6492-6496, 1990.

THORENS, B.: Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal and liver glucose fluxes. *Am. J. Physiol.*, 270:G541-G553, 1996.

THORUP, C.; KURKUS, J.; OLLERSTAM, A. & PERSSON, A.E.G.: Effects of acute and chronic unilateral renal denervation on the tubuloglomerular feedback mechanism. *Acta Physiol. Scand.*, 156:139-145, 1996.

TIMMONS, T.M. & DUNBAR, B.: Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol.*, 182:679-688, 1990.

TOMAS, P.K. & LASCELLES, R.G.: The pathology of diabetic neuropathy. *Q. J. Med.*, 35:489-509, 1966.

TOMINAGA, M.; MARUYAMA, H.; VASKO, M.R.; BAETENS, D.; ORCI, L. & UNGER, R.H.: Morphologic and functional changes in sympathetic nerve relationships with pancreatic alpha-cells after destruction of beta-cells in rats. *Diabetes*, 36(3):365-373, 1987.

TOMLINSON, D.R.; GILLON, K.R.W. & SMITH, M.G.: Axonal transport of noradrenaline and noradrenergic transmission in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 22:199-204, 1982.

TOMLINSON, K.C.; GARDINER, S. & BENNETT, T.: Blood pressure in streptozotocin-treated Blattleboro and Long-Evans rats. *Am. J. Physiol.*, 258:R852-R859, 1990a.

TOMLINSON, K.C.; GARDINER, S. & BENNETT, T.: Central effects of angiotensins I and II in conscious streptozotocin-treated rats. *Am. J. Physiol.*, R1147-R1156, 1990b.

- TOMLINSON, K.C.; GARDINER, S.; HEBDEN, R.A. & BENNETT, T.: Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev.*, 44(1):103-150, 1992.
- TOMODA, F.; BERGSTRÖM, G.; EVANS, R.G. & ANDERSON, W.P.: Evidence for decreased structurally determined preglomerular resistance in the young spontaneously hypertensive rat after 4 weeks of renal denervation. *J. Hypertension*, 15(10):1187-1195, 1997.
- TRINDER, P.: Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *N. Engl. J. Med.*, 284:353, 1969.
- TUCK, R.R.; SCHMELZER, J.D. & LOW, P.A.: Endoneurial blood flow and oxygen tension in the sciatic nerves of rats with experimental diabetic neuropathy. *Brain*, 107:935-950, 1984.
- TUCKER, B.J.; RASCH, R.; BLANTZ, R.C.: Glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in preproteinuric and proteinuric diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, 92:2, 686-694, 1993.
- TURINSKY, J.: Glucose and amino acid uptake by exercising muscles in vivo: effect of insulin, fiber population, and denervation. *Endocrinology*, 121:528-535, 1987.
- VADLAMUDI, R.V.S.V. & McNEILL, J.H.: Effect of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart responsiveness to carbachol. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 225(2):410-415, 1983.
- VAN BUREN, T.; KASBERGEN, C.M.; GISPEN, W.H. & DE WILDT, D.J.: In vivo cardiovascular reactivity and baroreflex activity in diabetic rats. *Cardiovasc. Res.*, 38(3):763-771, 1998a.
- VAN BUREN, T.; SCHIERECK, P.; DE RUITER, G.J.W.; GISPEN, W.H. & DE WILDT, D.J.: Vagal efferent control of electrical properties of the heart in experimental diabetes. *Acta Diabetol.*, 35:19-25, 1998b.

VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C.M.A.; KOLLÉ, L.A.A.; HOPMAN, J.C.W.; STOELINGA, G.B. & VAN GEIJN, H.P.: Heart rate variability. *Ann. Int. Med.*, 118:436-447, 1993.

VIANNA, L.G.; GILBEY, S.G.; BARNES, N.C.; GUY, R.J.C. & GRAY, B.J.: Cough threshold to citric acid in diabetic patients with and without autonomic neuropathy. *Thorax*, 43:569-571, 1988.

VINIK, A.I.; HOLLAND, M.T.; LE BEAN, J.M.; LIUZZI, F.J.; STANSBERRY, K.B.; COHEN, L.B.: Diabetic neuropathies. *Diabetes Care*, 15(12):1926-1975, 1992.

VLISSARA, H.: Advanced glycation in diabetic renal and vascular disease. *Kidney Int.*, 48:Suppl.51, S-43-S-44, 1995.

WAKISAKA, M.; HE, Q.; SPIRO, M.J. & SPIRO, R.G.: Glucose entry into rat mesangial cells is mediated by both Na⁺-coupled and facilitative transporters. *Diabetologia*, 38:291-297, 1995.

WANKE, T.; ABRAHAMIAN, H.; LAHRMANN, H.; FORMANECK, D.; MERKLE, M.; AUINGER, M.; ZWICK, H. & IRSIGLER, K.: No effect of naloxone on ventilatory response to progressive hypercapnia in IDDM patients. *Diabetes*, 42:282-287, 1993.

WAYNFORTH, L.C. & FLECKNELL, P.A.: Experimental and surgical technique in the rat. *Acad. Press. London.*, 1992.

WILCOX, C.S.; AMINOFF, M.J. & SLATER, J.D.H.: Sodium homeostasis in patients with autonomic failure. *Clin. Sci. Mol. Med.* 53:321-328, 1977.

WILLIAMSON, J.R.; CAHNG, K.; FRANGOS, M.; HASAN, K.S.; IDO, Y.; KAWAMURA, T. NYENGAARD, J.R.; VAN DEN ENDEN, M.; KILO, C. & TILTON, R.G.: Hyperglycemia pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42:801-813, 1993.

WILSON, D.R.; HONRATH, U. & SOLE, M.: Effect of acute and chronic denervation on renal function after release of unilateral obstruction in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 5:731-737, 1979.

WINOCOUR, P.H.; DHAR, H. & ANDERSON, D.C.: The relationship between autonomic neuropathy and urinary sodium and albumin excretion in insulin-treated diabetics. *Diabet. Med.* 3(5):436-440, 1986.

WOO, M.A.; STEVENSON, W.G.; MOSER, D.K.; TRELEASE, R.B. & HARPER, R.M.: Patterns of beat-to-beat heart rate variability in advanced heart failure. *Am. Heart J.*, 123:704-710, 1992.

YAGIHASHI, S. & SIMA, A.A.S.: Diabetic autonomic neuropathy in the BB rat: Ultrastructural and morphometric changes in sympathetic nerves. *Diabetes*, 34(6):558-564, 1985.

YAGIHASHI, S. & SIMA, A.A.S.: Diabetic autonomic neuropathy in the BB rat: Ultrastructural and morphometric changes in parasympathetic nerves. *Diabetes*, 35(7):733-743, 1986.

ZANDER, E.; SCHULTZ, B.; HEINKE, P.; GRIMMBERGER, E.; ZANDER, G.; GOTTSCHILING, H.D.: Importance of cardiovascular autonomic dysfunction in IDDM subjects with diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 12:259-264, 1989.

ZANDER, E.; SEINDLEIN, I.; HERFURTH, S.; HEINKE, P.; CLHUP, R.; BADENDICK, K.; STRESE, J.; ZANDER, G.; SCHULTZ, B.: Increased prevalence of proliferative retinopathy and cardiovascular autonomic dysfunction in IDDM patients with proteinuria. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 99:102-107, 1992.

ZANONE, M.M.; BANGA, J.P.; PEAKMAN, M.; EDMONDS, M. WATKINS, P.J.: An investigation of antibodies to nerve growth factor in diabetic autonomic neuropathy. *Diabet. Med.*, 11:378-383, 1994.

ZATZ, R.; MEYER, T.W.; RENNKE, H.; BRENNER, B.M: Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5963-5967, 1985.

ZATZ, R.; DUNN, R.; MEYER, T.W.; ANDERSON, S.; RENNKE, H.G.& BRENNER, B.M: Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. J. Clin. Invest., 77:1925-1930, 1986.