



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Mestrado em Bioquímica**

**Dissertação de Mestrado**

**Expressão de Proteínas de Stress no Rim de  
Modelo Animal de Intolerância à Glicose**

Elisabete Sanches da Veiga

**Orientador:** Fernando Capela e Silva

**Co-Orientador:** Célia Antunes

Évora, Outubro 2011

**Mestrado em Bioquímica**

**Dissertação de Mestrado**

**Expressão de Proteínas de Stress no Rim de  
Modelo Animal de Intolerância à Glicose**

Elisabete Sanches da Veiga

**Orientador:** Fernando Capela e Silva

**Co-Orientador:** Célia Antunes

## **Agradecimentos**

A Deus por estar sempre ao meu lado me protegendo e guiando pelo caminho certo, e que nunca e em nenhum momento me deixou enfraquecer nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus queridos pais, por todo apoio que me têm dado e que continuarão a dar ao longo da minha vida e que sempre me incentivaram e aconselharam cada passo e decisão que tive que tomar na minha vida.

Os meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor Fernando Capela e Silva, do Departamento de Biologia da Universidade de Évora e à Professora Doutora Célia Antunes do Departamento de Química da Universidade de Évora, pela atenção, orientação e disponibilidade para a realização deste presente trabalho.

À Professora Ana Costa pela sua ajuda e apoio que me prestou nas análises e tratamentos dos resultados dos parâmetros bioquímicos, e à Eng<sup>a</sup> Luísa Fialho por toda a sua ajuda com os cortes dos tecidos.

Agradeço profundamente todos os meus familiares, em especial à minha querida avó (que Deus a tenha) por toda a sabedoria e conselhos que me transmitiu.

Ao meu querido amigo, companheiro Sandeney Fernandes pela pessoa maravilhosa que é por todo apoio, carinho, paciência e incentivo dedicado em cada passo e decisão que precisei tomar.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender...nem tão pequeno que não possa ensinar.”*

Esopo

# Índice

Agradecimentos .....	III
Índice.....	IV
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tabelas .....	VII
Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Unidades .....	VIII
Resumo.....	IX
Abstract .....	X
1 Introdução.....	1
1.1 A Diabetes Mellitus .....	1
1.2 DT2 e Proteínas de <i>Stress</i> .....	4
1.2.1 Proteínas de choque térmico .....	5
1.2.2 Metalotioneínas .....	6
1.3 Nefropatia diabética .....	7
1.3.1 Anatomia e fisiologia renal .....	7
1.3.2 Alterações renais na diabetes .....	14
2 Objectivos.....	16
2.1 Objectivo geral.....	16
2.2 Objectivos específicos .....	16
3 Materiais e Métodos .....	17
3.1 Delineamento experimental .....	17
3.2 Provas de tolerância à glicose oral .....	17
3.3 Parâmetros Bioquímicos .....	18
3.3.1 Análise sumária da urina.....	18
3.3.2 Creatinina.....	19
3.3.4 Ureia .....	22
3.3.5 Ácido Úrico.....	23
3.3.6 Clearance Renal.....	25
3.4 Histologia.....	26
3.5 Imuno-histoquímica.....	26
3.6 Análise estatística.....	28
4 Resultados .....	29
4.1 Curvas de tolerância à Glicose Oral .....	29
4.2 Análise sumária da urina .....	30

4.3	Peso dos animais e dos rins.....	32
4.4	Histomorfometria .....	32
4.5	Imuno-histoquímica.....	33
4.6	Estudo da Função Renal .....	39
5.	Discussão.....	43
6.	Conclusão .....	47
7.	Bibliografia.....	49
8.	Anexos.....	54

## Índice de Figuras

Figura 1. Curva de calibração para determinação da concentração de creatinina no plasma. ...	200
Figura 2: Curva de calibração para determinação da concentração de creatinina na urina. ....	21
Figura 3. Curva de calibração para determinação da concentração do ácido úrico nas mostras do plasma e urina. ....	24
Figura 4: Prova de tolerância à glicose oral. ....	29
Figura 5. Expressão das Hsp. ....	35
Figura 6. Expressão das metalotioneínas. ....	36
Figura 7. Expressão da actina. ....	37
Figura 8 Expressão da actina (secções de rim de animais GIR). ....	38
Figura 9. Concentração da ureia no plasma e urina e a variação da Clearance. ....	40
Figura10. Concentração do ácido úrico sérico e úrico e a variação da Clearance. ....	40
Figura11: Concentração da creatinina no plasma e na urina e a variação da Clearance. ....	42

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Níveis de glicose.....	4
Tabela 3. Preparação do ensaio da creatinina para a amostra da urina .....	19
Tabela 4. Preparação do ensaio da ureia para as amostras de plasma e da urina.....	20
Tabela 5. Preparação do ensaio do ácido úrico para as amostras de plasma e da urina .....	22
Tabela 5. Anticorpos utilizados na marcação imunohistoquímica .....	27
Tabela 7. Valores obtidos no teste de combur .....	30
Tabela 8. Peso dos rins nos animais controlo e GIR.....	32
Tabela 9. Parâmetros histomorfométricos.....	33
Tabela 10. Expressão das proteínas nos animais controlo e animais GIR .....	33

## Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Unidades

ATP	Trifosfato de Adenosina
DAB	Diaminobenzidina
DT1	Diabetes Tipo 1
DT2	Diabetes Tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
epm	Erro padrão da média
GIR	Geração de Ratos Intolerantes à Glicose (do Inglês <i>Glucose Intolerant Rat</i> )
GLDH	Glutamato Desidrogenase (do Inglês <i>Glutamate dehydrogenase</i> )
HDL	Lipoproteína de alta Densidade (do Inglês, <i>High Density Lipoprotein</i> )
HIER	Recuperação do Epitopo induzido pelo calor (do Inglês <i>Heat-Induced Epitope Retrieval</i> )
Hsp	Proteína de Choque Térmico (em inglês, <i>Heat shock proteins</i> )
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
kDa	Quilo Dalton
mM	Milimolar
MTs	Metalotioneínas (do Inglês <i>Metallothioneins</i> )
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina (do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
Nm	Nanómetro
PBS,	Tampão Fosfato salino ( do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
ROS	Espécie reactiva de oxigénio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i> )
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
µl	Micro litro
µmol	Micromol
α-SMA	alfa-actina no músculo liso (do Inglês, <i>Smooth Muscle Alpha-Actin</i> )

## Resumo

### EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE *STRESS* NO RIM DE MODELO ANIMAL DE INTOLERÂNCIA À GLICOSE.

A nefropatia diabética é uma condição causadora de insuficiência renal crónica em muitos pacientes com diabetes, obrigando a hemodiálise acarretando elevados custos e uma redução significativa da qualidade de vida do doente. Desconhece-se se a nefropatia diabética se desenvolve concomitantemente ou se resulta da diabetes.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a morfologia e função renais em ratos intolerantes à glicose (GIR).

Observaram-se alterações morfológicas capsulares e glomerulares de GIR. Observaram-se diferenças na expressão de Hsp, MTs e actina nos GIR. Os níveis de ureia, ácido úrico ou creatinina foram semelhantes em GIR e controlos. A função renal destes animais não parece comprometida, embora apresentem intolerância à glucose confirmada.

Tendo em conta as alterações de expressão de Hsp, MTs e actina, os GIR poderão ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de insuficiência renal em situações de *stress*. Estas alterações precoces poderão, contribuir para o desenvolvimento da nefropatia observada na diabetes.

## **Abstract**

### **EXPRESSION OF STRESS PROTEINS IN KIDNEYS FROM AN ANIMAL MODEL OF GLUCOSE INTOLERANCE**

Diabetic nephropathy is a condition that causes chronic kidney insufficiency and blood dialysis contributing to a reduction of the quality of life of diabetic patients and implies elevated costs. It is unknown whether nephropathy develops previously to diabetes or concomitantly with the disease.

The aim of this work was to evaluate kidney morphology and function in glucose intolerant rats (GIR).

Alterations in capsular and glomerular morphology were observed in GIR. The expression of stress proteins HSP, MTs and actin were altered in GIR. The biochemical parameters urea, uric acid and creatinine in GIR were similar to controls, suggesting that kidney function is normal despite the glucose intolerance.

Taking into account the differences in HSP, MTs and actin expression combined, GIR might be susceptible to develop kidney insufficiency if stress situations arise. Altogether, these results suggest that these alterations may contribute to the development of kidney dysfunction and diabetic nephropathy.

# 1 Introdução

## 1.1 A Diabetes Mellitus

A diabetes afecta actualmente mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável pela morte de, pelo menos, 1,1 milhões de pessoas por ano, razão pela qual é uma doença reconhecida como um problema de saúde pública, (WHO, 2011). O número de indivíduos com diabetes tem vindo a aumentar, entre outros factores, com o crescimento populacional, com o aumento da esperança média de vida e o aumento da taxa de obesidade associado à inatividade física (Schneider *et al.*, 2003). A nível mundial prevê-se que o número de indivíduos diabéticos seja no ano 2025, na ordem dos 320 milhões, quando em 2000 estavam identificados 180 milhões (Vernillo, 2001). Em Portugal esta patologia tem também uma elevada prevalência, com aproximadamente 12% da população sendo diabética e 25% pré-diabética (Gardete-Correia, 2010).

O termo diabetes corresponde a um conjunto de alterações metabólicas que levam à incapacidade de regulação do metabolismo da glicose (hiperglicemia) devido a uma falha relativa ou absoluta na secreção de insulina, por parte do pâncreas, e/ou a uma incapacidade, por parte dos tecidos, de usar eficientemente a insulina endógena (Holt *et al.*, 2010). A hiperglicemia daí resultante está associada a danos de longo prazo, disfunção e falência nos tecidos de vários órgãos, designadamente retinopatia, neuropatias e insuficiência renal, constituindo em si as complicações da diabetes (Seiça, 2003).

A insulina é uma hormona anabolizante que actua no armazenamento de substâncias energéticas e possui também um papel importante no metabolismo dos glúcidos, proteínas e lípidos (Leite, 2006). Sendo a insulina a hormona responsável pela regulação do sistema de transporte da glicose celular, uma deficiência na sua produção, ou uma insensibilidade por parte dos receptores presentes nos órgãos alvo resultam num aumento crónico dos níveis de glicose no sangue (Tatón *et al.*, 2010).

Adicionalmente, associada à diabetes, há uma neoglicogénese aumentada que também contribui para o estado de hiperglicemia observado nestes indivíduos (Alberti, 1998). Como consequência do aumento dos níveis de glicose no sangue, o organismo é obrigado a excretar o excesso de glicose através da urina. Devido a este facto, esta patologia foi inicialmente associada a uma “urina doce”, surgindo, por esta razão, a designação de diabetes mellitus (DM) (Voet, 2004).

Em 1997, a Organização Mundial de Saúde e a Associação Americana da Diabetes acordaram numa nova classificação para a diabetes mellitus (ADA, 1997). As formas de diabetes mais frequentes são a diabetes do Tipo 1 (DT1) e a diabetes do Tipo 2 (DT2). Outras formas de diabetes são a diabetes gestacional (que pode surgir durante a gravidez), a diabetes após remoção cirúrgica do pâncreas e outras formas raras de diabetes genética (Holt *et al.*, 2010).

A DT1 é uma doença que resulta, na maior parte dos casos, de uma destruição auto-imune das células beta do pâncreas endócrino (Alberti e Zimmet, 1998). Em indivíduos geneticamente susceptíveis pode surgir uma inflamação destas, quase sempre causada por uma infecção viral. Surge então uma total deficiência de insulina, uma vez que as células beta são as únicas capazes de produzir e secretar esta hormona. Como consequência todos os pacientes com DT1 necessitam de uma terapia de compensação de insulina, com excepção do período imediatamente após o diagnóstico da doença, durante o qual ainda ocorre secreção residual de insulina (Holt *et al.*, 2010). A DT1 manifesta-se tipicamente durante a infância ou adolescência, embora recentemente se tenha verificado que os adultos também podem desenvolver esta forma de diabetes, em alguns casos já por volta dos 40-50 anos de idade.

Pelo contrário, a DT2 é caracterizada pela resistência à acção de insulina periférica e hepática e à redução da capacidade secretora das células  $\beta$ -pancreáticas, por alterações funcionais destas células e redução da massa celular (Mahler, 1999; Seïça, 2003). A perda da função e da massa das células beta leva ao aumento da glicose que é finalmente expressada como diabetes (Pollom, 2009). Esse aumento da resistência periférica à insulina é devido aos defeitos na cascata de sinalização intracelular ou no próprio receptor de insulina.

As causas para o estabelecimento desta patologia ainda não estão completamente esclarecidas, mas pensa-se que a idade, obesidade, deposição inadequada de gordura corporal e falta de exercício físico podem causar resistência à acção da insulina nos seus tecidos-alvo levando a essa situação (Permegiani, 2010). A DT2 está principalmente associada a idades mais avançadas. No entanto, cada vez mais, este tipo de diabetes tem sido diagnosticado em jovens adultos, ou mesmo em adolescentes, estando relacionado com o aumento da taxa de obesidade (Permegiani, 2010).

Os sintomas da existência de hiperglicémia incluem a poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes com polifagia e visão turva (Permegiani, 2010). Outras complicações a longo prazo da diabetes incluem: retinopatia com perda de visão; neuropatia periférica com riscos de úlceras nos pés; vasculopatia periférica, devida à deposição dos lípidos nos vasos à medida que vão sendo transportados para os tecidos; e neuropatia autonómica, causando sintomas gastrointestinais, cardiovasculares e disfunção sexual (ADA, 2004). Na DT2 observam-se alterações no metabolismo dos lípidos, nomeadamente a nível das concentrações de colesterol total, colesterol HDL e LDL e triglicéridos. Pacientes com DT2 apresentam ainda um aumento na incidência de aterosclerose cardiovascular, doença cerebrovascular e hipertensão arterial (ADA, 2004). Sabe-se que a DT2 está associada a um risco de duas a quatro vezes maior de doença coronária (Permegiani, 2010).

A DT2 é geralmente precedida de um longo período de pré-diabetes. Neste estado os níveis de glicose pós-prandiais são já mais elevados que o normal e demoram mais tempo a retornar ao normal e os níveis de glicemia em jejum também estão ligeiramente aumentados (Guilauseau, 2008). Para um indivíduo ser considerado diabético tem que apresentar três condições principais: glicose plasmática em jejum superior a 126mg/dL, glicose plasmática ocasional superior a 200mg/dL e glicémia superior a 200mg/dL 2h após prova de tolerância à glicose oral (Paiva, 2001). No caso da pré-diabetes o que acontece é a existência de níveis de glicose sanguínea acima do normal ( $\geq 100$ mg/dL e  $< 126$ mg/dL), embora não suficientemente elevados, de acordo com os critérios, para se considerar DT2 (ADA, 2004; Tabela 1).

**Tabela 1.** Níveis de glicose em três estados diferentes do indivíduo<sup>1</sup>

	<b>Normal</b>	<b>Intolerância à glicose</b>	<b>Diabetes</b>
Glicose em jejum	<100 mg/dl <6.1 mmol/l	100-125 mg/dl 6.1-6.9 mmol/l	≥126 mg/dl ≥7.0 mmol/l
2 h após teste oral de tolerância à glicose	<140 mg/dl <7.8 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l	≥200 mg/dl ≥11.1 mmol/l

<sup>1</sup>Adaptada de WHO, 1999

## 1.2 DT2 e Proteínas de *Stress*

Na DT2 observam-se alterações na expressão de proteínas de *stress* (Hooper, 2003; Li *et al.*, 2007). Células de todo o organismo respondem a uma variedade de condições de *stress* através de uma rápida transcrição e subsequente tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, designadas de proteínas de *stress* (Locke *et al.*, 1990).

O termo proteína de *stress* tem carácter genérico na descrição de eventos biológicos, uma vez que diferentes estímulos podem induzir o mesmo mecanismo de defesa celular (Welch, 1992). Dependendo da natureza e da intensidade da agressão, as células podem responder com um incremento ou com um decréscimo da sua actividade. As respostas celulares são induzidas por uma série de condições normais e anormais que afectam os processos homeostáticos, e incluem alterações no estado fisiológico envolvendo hormonas e factores de crescimento, condições patofisiológicas e agentes de *stress* ambientais (Morimoto *et al.*, 1994). As respostas às situações de *stress* envolvem interacções moleculares cuja função é proteger e reparar as macromoléculas dos danos causados pelos agentes de *stress* e manter a integridade genética e metabólica (Sanders *et al.*, 1996). Um incremento dos danos causados nas proteínas nativas por situações de *stress* induz a síntese de proteínas que participam na sua protecção e no seu *turnover* através de três vias discretas: (1) aumentando os níveis de chaperoninas, as quais, a par das suas funções de protecção e reparação, transportam as proteínas danificadas, e não reparáveis, para os locais apropriados de degradação lisossómica e citoplasmática, (2) aumentando os níveis de ubiquitina, o que faz aumentar esta via de

degradação citoplasmática das proteínas, e (3) aumentando os níveis de diversas proteases que selectivamente degradam as proteínas não nativas (Goldberg *et al.*, 1994). O termo "proteínas de *stress*" (Goering, 1995) é hoje usado relativamente a um conjunto de proteínas que incluem, entre outras, as proteínas de choque térmico e as metalotioneínas (Del Razo *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (Hsp, do inglês *heat shock proteins*) surgem na literatura como uma das classes de proteínas de *stress* melhor estudadas. São classes de proteínas altamente conservadas, desde seres primitivos (procariotas) até o Homem, o que é um indício do seu grande valor evolutivo. As Hsp podem ser agrupadas em famílias: Hsp27, Hsp47, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp110 de acordo com as suas sequências de aminoácidos e pesos moleculares em kD. Em cada família, há diferentes proteínas - por exemplo, Hsp72, Hsp73 no grupo de HSp70; os pesos moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão são distintos (Meyer e Silva, 1999). Embora inicialmente referidas como proteínas de choque térmico, uma vez que foram descobertas como uma resposta a situações de *stress* térmico, é hoje evidente que a síntese das Hsp é induzida em resposta a vários tipos de factores. Os estímulos que induzem a síntese de Hsp e respostas de *stress* são numerosos e variados, e podem incluir-se numa das seguintes categorias: (1) poluentes ambientais, designadamente metais pesados, pesticidas organofosforados, dioxinas, radiações electromagnéticas; (2) condições patofisiológicas, incluindo *stress* oxidante, *stress* mecânico, febre e inflamação, infecções virais e microbianas; (3) processos fisiológicas particulares, em condições normais, designadamente durante: o desenvolvimento embrionário, a diferenciação, o ciclo celular e a estimulação hormonal. As Hsp são citoprotectoras, protegem proteínas, ácidos nucleicos e dos danos causados pela redução da oxidação, evitando a apoptose, supressão de citocinas pró-inflamatórias e reparação de canais de iões (Hooper, 2003).

Na diabetes, os níveis de Hsp são baixos por aquisição ou defeito genético, no entanto, a restauração dos níveis de Hsp melhora os sintomas neuropáticos. A diminuição dos níveis das Hsp na DT1 e na DT2 podem ser um factor primário

principal para o desenvolvimento destas patologias e danos nos órgãos enquanto que o aumento do nível destas proteínas pode limitar o desenvolvimento da diabetes, mas também pode reduzir a morbilidade e mortalidade nestes pacientes (Hooper, 2003). Um atraso na cicatrização de feridas, observada em indivíduos com esta patologia foi associado a um “atraso” na resposta por parte de Hsp (Bitar *et al.*, 1999, citado por Hooper e Hooper, 2009). Restabelecendo a acção da insulina verificou-se um aumento dos níveis de Hsp, em modelos animais diabéticos, enquanto que uma interrupção na cascata de sinalização de insulina parecia diminuir os seus níveis (Chu *et al.*, 1998 citado por Hooper e Hooper, 2009).

### 1.2.2 Metalotioneínas

As metalotioneínas (MTs) são proteínas intracelulares de baixo peso molecular com alta afinidade para o zinco (Zn) e para o Cobre (Cu) (Cai *et al.*, 2002). Com efeito, as MTs ocorrem em todos os grupos do reino animal (Viarengo *et al.*, 1999) e podem ser também encontradas nas plantas superiores (Rauser, 1999), microrganismos eucariotas (Valls *et al.*, 2000), e alguns procariotas (Silver e Phung, 1996). As MTs são proteínas intracelulares ricas em cisteína, e foram inicialmente descritas como reguladoras do metabolismo dos metais e eficientes “limpadores” de ROS (Hidalgo *et al.*, 2001). Foram identificadas quatro isoformas de MTs nos mamíferos, sendo que as MTs I e II são expressas na maioria dos tecidos (Miles *et al.*, 2000). Essas duas isoformas são induzidas por estímulos inflamatórios ou patológicos, como citocinas pro-inflamatórias, *stress* oxidativo e glicocorticoides (Andrews, 2000). Além das suas propriedades antioxidantes, as MT-I e II também possuem importantes funções anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, oferecendo protecção para as células e tecidos durante várias condições patológicas, como parece acontecer na diabetes.

Nos diabéticos os radicais livres formam-se desproporcionalmente devido à oxidação da glicose, glicação não enzimática de proteínas, e degradação oxidativa de proteínas glicadas. Estas consequências do *stress* oxidativo desempenham um papel importante na patogénese de complicações diabéticas (Rosen *et al.*, 2001). Diabetes causada pelo *stress* oxidativo pode ter como consequência a morte celular dos órgãos

nos indivíduos diabéticos causando disfunções orgânicas. Dado o potencial antioxidante das MTs, essas complicações são impedidas através da supressão do dano oxidativo (Li *et al.*, 2007).

### **1.3 Nefropatia diabética**

Para além das alterações descritas registam-se também importantes alterações morfológicas nos tecidos dos pacientes com DT2. Por exemplo, os rins podem sofrer alterações funcionais e estruturais quando surge a diabetes, nomeadamente, aumento de peso, aumento do volume glomerular, aumento da espessura da membrana basal glomerular e aumento da fracção e do volume mensagial – sendo esta situação designada, genericamente, de nefropatia diabética (Schrijvers, 2004).

#### **1.3.1 Anatomia e fisiologia renal**

Os rins são órgãos pares localizados retroperitonealmente, ligados funcionalmente ao organismo pelo hilo, local por onde passam os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e o ureter (que conduz a urina do rim para a bexiga). São órgãos com uma forma característica, de tonalidade acastanhada. Os rins estão envolvidos por uma cápsula fibrosa que ao nível do hilo renal se deixa atravessar pela artéria renal, a veia renal e a pelve colectora que se continua com o ureter (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

Cada rim é revestido pela cápsula renal, uma camada de tecido conjuntivo fibroso, com raras fibras elásticas, a qual, por sua vez, é rodeada por uma densa camada de tecido adiposo, a cápsula adiposa peri-renal, que o protege de choques mecânicos e ajuda a manter na sua posição. Os rins, e o tecido adiposo que os rodeia, estão ligados à parede abdominal por uma fina bainha de tecido conjuntivo laxo, a fâscia renal. Na porção média do bordo interno de cada rim existe uma pequena área denominada hilo, por onde entram a artéria e os nervos renais e saem a veia renal e os ureteres. O hilo abre-se numa cavidade profunda denominada seio renal, que contém tecido conjuntivo e tecido adiposo (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

O rim divide-se em duas regiões bastante distintas, a região periférica ou o córtex renal e a região central ou medula renal. Na medula renal, existem estruturas chamadas de pirâmides de Malpighi, que convergem na região central do rim, formando o bacinete. Dos bacinetes partem os ureteres. No córtex renal ficam estruturas microscópicas chamadas de nefrónios, onde o sangue é efectivamente filtrado (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

O nefrónio é a unidade funcional do rim, ou seja, a estrutura que filtra o sangue e produz urina com o excedente de líquidos e os resíduos eliminados do organismo pelo rim. Cada rim conta com mais de um milhão de pequenos nefrónios, cada um constituído por dois elementos básicos: o corpúsculo renal ou glomérulo, situado na zona do córtex, onde o sangue é filtrado, e o túbulo renal ou sistema de canais colectores, um canal que começa por atravessar a zona da medula, regressa ao córtex, onde a produção da urina é concluída, para finalmente atingir o tubo colector (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

**Corpúsculo renal:** o corpúsculo renal é uma formação esférica constituída por um conjunto de ansas capilares, o glomérulo, situado no interior da chamada cápsula de Bowman, formada por duas membranas, uma interna, que envolve intimamente os capilares glomerulares e uma externa, separada da interna. A camada visceral da cápsula de Bowman é composta por células epiteliais especializadas chamadas podócitos, com um grande corpo celular e prolongamentos citoplasmáticos, conhecidos por pedicelos. Entre as membranas internas e externas existe uma cavidade denominada espaço capsular de Bowman, na qual se acumula o filtrado glomerular, ou urina primária.

O corpúsculo renal possui um pólo vascular, que é o local onde se encontram as arteríolas aferente e eferente, e diametralmente oposto, o pólo urinário, que corresponde à zona onde o espaço capsular se continua com o tubo contornado proximal. O filtrado glomerular, de aspecto aproximado a um plasma (líquido claro, sem células), ao deixar o espaço capsular, passa a circular através de um sistema tubular contendo distintos segmentos: tubo contornado proximal, ansa de Henle, tubo contornado distal e ducto colector. O espaço entre a confluência das ansas capilares de cada glomérulo é ocupado pelo mesângio, constituído pelas células mesangiais intraglomerulares e pelas células mesangiais extraglomerulares. As células mesangiais possuem propriedades contrácteis,

têm capacidade fagocítica, são capazes de proliferar, sintetizam a matriz mesangial e colagénio e são capazes de sintetizar prostaglandinas, endotelinas e citocinas (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

**Tubo contornado proximal:** São constituídos por uma porção inicial turtuosa, a porção contornada, e uma porção mais distal, muito curta, rectilínea, a porção recta. São formados por epitélio cuboidal simples, com células grandes, núcleo central, com bordadura em escova e aparência um pouco recortada da superfície apical das células quando estas são vistas de perfil. São mais longos que os tubos contornados distais e compreendem a porção principal do córtex. Cerca de 80% da água e do sódio são reabsorvidos nos tubos contornados proximais (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

**Ansa de Henle:** cada tubo contornado proximal continua como o segmento fino, ou ramo descendente, da ansa de Henle, situado numa pirâmide medular ou num raio medular, e que se caracteriza por possuir células epiteliais acentuadamente escamosas/pavimentosas. A ansa de Henle, com o seu trajecto medular, em forma de U, é fundamental para que se produza urina hipertónica (extremamente concentrada) e para a conservação da água do organismo. A ansa de Henle continua através do segmento espesso, ou ramo ascendente, formado por epitélio pavimentoso simples, que se vai tornando cuboidal simples (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

**Tubo contornado distal:** Ao tubo ascendente da ansa de Henle segue-se o tubo contornado distal, de menor extensão que o proximal, formado por epitélio cuboidal simples, com células mais pequenas do que as do tubo contornado proximal, e sem bordadura em escova. É no tubo contornado distal que ocorre a acidificação da urina, sendo reabsorvido o bicarbonato, por troca com iões hidrogénio. É nas células do tubo contornado distal que actua a hormona aldosterona, produzida pelo córtex das glândulas supra-renais, promovendo a reabsorção do sódio que ainda esteja presente no lúmen, por troca com o potássio. Na última porção do tubo contornado distal, conforme as necessidades fisiológicas, pode ainda actuar a hormona antidiurética (ou vasopressina: hormona de natureza polipeptídica, armazenada no lobo posterior da hipófise, proveniente do hipotálamo), tornando as células do tubo permeáveis à água e promovendo a sua reabsorção. O tubo contornado distal apresenta o denominado

aparelho justaglomerular que é uma pequena formação endócrina constituída: (i) pela mácula densa, uma região do tubo contornado distal, junto ao glomérulo e à artéria aferente, em que as células de revestimento se tornam cilíndricas e estreitas, umas bem próximas das outras, com um núcleo muito evidente, e de polaridade invertida, isto é, exibem grânulos de secreção no pólo basal; (ii) pelas células mesangiais extraglomerulares, as células de Laci, cuja função é ainda desconhecida; e (iii) pelas células justaglomerulares, derivadas das células musculares lisas da parede da arteríola aferente, e, em menor quantidade, da parede da arteríola eferente, com um citoplasma com grande quantidade de grânulos de secreção, sendo responsáveis pela produção da renina. Estes três componentes dispõem-se num espaço delimitado pelas arteríolas aferente e eferente e pela parede do tubo contornado distal, onde se situa a mácula densa (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

**Tubos colectores:** Ao tubo contornado distal segue-se o tubo colector, muito curto, que drena para o canal colector. No córtex são observados como os raios medulares, mas predominam nas pirâmides medulares. Consistem de tubos direitos, revestidos por epitélio cuboidal simples, com o núcleo central, em que se podem distinguir dois tipos de células: as células principais (reabsorvem água e sódio, e segregam potássio) e as células intercalares (da sua actividade resulta um aumento da concentração, em hidrogeniões e bicarbonatos, no lúmen). Perto do ápice da pirâmide o epitélio cuboidal torna-se colunar e os ductos são maiores e tipicamente ovóides. Estes são conhecidos como ductos papilares de Bellini e abrem nos cálices menores.

A permeabilidade dos canais colectores à água é controlada pela hormona antidiurética (Young e Heath, 2000; Gonçalves, 2006).

Duas funções primordiais são desempenhadas pelos rins, o primeiro é a eliminação dos produtos terminais do metabolismo orgânico, como a ureia, a creatinina e o ácido úrico, entre outros, e o segundo é o controlo das concentrações da água e da maioria dos constituintes dos líquidos do organismo, tais como sódio, potássio, cloro, bicarbonatos e fosfatos. Os rins exercem as suas funções através dos seguintes mecanismos que são considerados os principais: a filtração glomerular, a reabsorção tubular e a secreção tubular de diversas substâncias (Young e Heath, 2000; Guyton, 2006).

A ureia é o produto final do catabolismo dos aminoácidos e é parcialmente reabsorvida por filtração glomerular. Produzida no fígado, ela passa para a circulação sanguínea, onde é degradada a nível intersticial e eliminada pelo suor, trato gastrointestinal e rim. A sua concentração varia em indivíduos saudáveis e é influenciada por diversos factores como: grau de hidratação, conteúdos proteicos da dieta, função hepática e função renal. É utilizada na avaliação do estado do funcionamento renal (Quintas *et al.*, 2008).

A creatinina é um produto metabólico formado pela descarboxilação da creatina-fosfato. Encontra-se presente no músculo, cérebro e sangue, na forma livre e na forma de fosfocreatina. Pode também ser encontrada na urina em pequenas quantidades. É eliminada preferencialmente por filtração glomerular; a sua retenção é, portanto, um índice de insuficiência glomerular. Uma pequena parte é eliminada por secreção tubular. A creatinina urinária é filtrada livremente pelos glomérulos sendo reabsorvida apenas em certas condições clínicas incluindo a diabetes. A concentração de creatinina torna-se anormal quando aproximadamente metade ou mais de nefrónios tenham sido comprometidos. É, assim, um óptimo parâmetro de avaliação da função renal (Quintas *et al.*, 2008).

O ácido úrico ( $C_5H_4N_4O_3$ ) é um composto orgânico de carbono, azoto, oxigénio e hidrogénio. É um produto de eliminação do metabolismo do azoto, encontrado na urina em pequenas quantidades. O seu doseamento pode ser utilizado na avaliação de disfunção renal (Quintas *et al.*, 2008).

A filtração corresponde à passagem de materiais através da membrana de filtração para o lúmen da cápsula de Bowman, em resultado da diferença de pressão. A membrana de filtração constitui uma barreira de filtração, que impede a entrada de células e proteínas sanguíneas no lúmen da cápsula de Bowman, mas permite a entrada de outros componentes do sangue. A fracção de filtração, após a sua entrada no nefrónio, denomina-se filtrado (Young e Heath, 2000; Guyton, 2006).

O filtrado deixa o lúmen da cápsula de Bowman e passa pelo tubo contornado proximal, pela ansa de Henle e pelo túbulo contornado distal, até chegar ao tubo colector. Ao atravessar estas estruturas, muitas das substâncias do filtrado são alvo de reabsorção tubular. A reabsorção é o retorno ao sangue de substâncias existentes no filtrado. Em geral, a maior parte da água é reabsorvida através da parede do nefrónio

por osmose e os solutos úteis são reabsorvidos, através da parede do nefrónio por processos como a difusão simples, a difusão facilitada, o transporte activo e o co-transporte. Sais inorgânicos, moléculas orgânicas e cerca de 99% do volume do filtrado deixam o nefrónio e entram no líquido intersticial, após o que estas substâncias entram nos capilares peritubulares de baixa pressão e, posteriormente, na circulação sistémica, através das veias renais. Os solutos reabsorvidos do lúmen do nefrónio para o líquido intersticial incluem aminoácidos, glicose, frutose,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{HCO}^-$  e  $\text{Cl}^-$ , ao passo que os produtos de degradação, excesso de solutos e uma pequena quantidade de água não são reabsorvidos (Young e Heath, 2000; Guyton, 2006).

A reabsorção da maioria das moléculas de soluto no túbulo contornado proximal está ligada ao transporte activo primário de  $\text{Na}^+$ , através da membrana basal das células epiteliais do nefrónio, do citoplasma para o líquido intersticial, criando assim uma baixa concentração de  $\text{Na}^+$  dentro das células. Na membrana basal da célula, o ATP proporciona a energia necessária para fazer sair o  $\text{Na}^+$  dentro das células por troca com o  $\text{K}^+$ , por co-transporte. Uma vez que a concentração de  $\text{Na}^+$  no lúmen do túbulo é elevada, existe grande gradiente de concentração entre o lúmen do nefrónio e o líquido intersticial das células que o revestem. Este gradiente de concentração para o  $\text{Na}^+$  é a fonte de energia para o co-transporte de muitas moléculas de soluto do lúmen do nefrónio, como a glicose, aminoácidos,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , para dentro das células que o constituem.

Após a passagem das moléculas por co-transporte para dentro da célula, elas atravessam a membrana basal por difusão facilitada. A reabsorção de solutos no túbulo contornado proximal é intensiva e o túbulo é permeável à água, por isso, à medida que as moléculas são transportadas do nefrónio para o líquido intersticial, a água desloca-se por osmose na mesma direcção (Young e Heath, 2000; Guyton, 2006).

A ansa de Henle penetra na medula renal, onde a concentração de solutos no líquido intersticial é muito alta. O ramo descendente da ansa de Henle é permeável à água, mas pouco permeável à ureia, ao sódio e à maior parte dos outros iões, pelo que há uma concentração da urina. O líquido intersticial na medula renal tem uma alta concentração de soluto, assim a água passa por osmose do túbulo para o líquido intersticial muito mais rapidamente do que os solutos. Em menor quantidade, alguns

solutos difundem-se do líquido intersticial para o túbulo (Young e Heath, 2000; Guyton, 2006).

O ramo ascendente da ansa de Henle é impermeável à água e aos solutos. No entanto, alguns solutos como o  $\text{Na}^+$ , o  $\text{K}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são transportados do ramo ascendente da ansa de Henle para o líquido intersticial, através do co-transporte do  $\text{K}^+$  e do  $\text{Cl}^-$  conjuntamente com  $\text{Na}^+$ , através da membrana apical. Uma vez dentro das células do ramo ascendente, o  $\text{Cl}^-$  e o  $\text{K}^+$  atravessam a membrana basal da célula, por difusão facilitada, de uma área de maior concentração dentro da célula para o exterior e de menor concentração, o líquido intersticial. O gradiente de concentração para o  $\text{Na}^+$  é criado pelo transporte activo deste ião para fora da célula, por troca com o  $\text{K}^+$  através da membrana basal (Young e Heath, 2000; Guyton, 2006).

No túbulo contornado distal e no tubo colector, o  $\text{Cl}^-$  é transportado através da membrana apical acompanhando o  $\text{Na}^+$ . O gradiente de concentração para o  $\text{Na}^+$  resulta do transporte activo de  $\text{Na}^+$  através da membrana basal da célula. Adicionalmente, os tubos colectores estendem-se desde o córtex renal, onde a concentração do líquido intersticial é muito elevada. A água passa por osmose para dentro do líquido intersticial, mais concentrado, quando o túbulo contornado distal e o tubo colector lhe são permeáveis. Consequentemente, é produzido um pequeno volume de urina muito concentrada.

Quando o túbulo contornado distal e o tubo colector não estão permeáveis à água, a passagem desta por osmose não ocorre e, por isso, é produzido um grande volume de urina diluída. A produção de urina concentrada ou diluída depende do controlo hormonal. A urina produzida no final destes processos apenas conterà 1% da água inicialmente filtrada, uma pequena parte dos sais e nenhum nutriente (Young e Heath, 2000; Guyton, 2006).

### 1.3.2 Alterações renais na diabetes

A DT2 tornou-se a causa mais frequente do estado final da doença renal. No entanto, a fisiopatologia da nefropatia diabética tem sido estudada principalmente em modelos experimentais de DT1. Tendo em conta as diferenças registadas na fisiologia da nefropatia entre estes dois tipos de diabetes, é de extrema importância o desenvolvimento de bons modelos experimentais para o estudo da nefropatia na DT2 (Schrijvers *et al.*, 2004).

Cerca de 20 a 40% da nefropatia diabética atingem os doentes com esta patologia, sendo a principal causa da insuficiência renal terminal em todo o mundo. Logo após o aparecimento da diabetes, praticamente todos os pacientes apresentam um aumento no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular (TFG), ou seja, estado de hiperfiltração glomerular, excedendo em 20-40% o valor normal. Os rins encontram-se aumentados e os glomérulos e os tubos tornam-se hipertrofiados, e mesmo após a evolução para a falência renal os rins dos diabéticos permanecem proporcionalmente maiores que os rins em outras patologias.

Os pacientes com nefropatia diabética quase sempre desenvolvem hipertensão arterial, aumento progressivo da proteinúria e um declínio lento e progressivo da taxa de filtração glomerular (ADA, 2007). A alteração mais precoce na nefropatia é o espessamento da membrana basal dos capilares dos glomérulos. Simultaneamente, verifica-se uma esclerose glomerular progressiva, caracterizada por expansão mesangial celular. A expansão mesangial progressiva causa colapso dos capilares glomerulares e a área de filtração diminui proporcionalmente (Guyton, 2006). Em decorrência da expansão do mesângio e do colapso progressivo dos capilares glomerulares ocorre isquemia túbulo-intersticial, observando-se infiltrado inflamatório e posteriormente atrofia e fibrose. Esta lesão isquémica favorece a ocorrência de necrose na papila renal. A expansão da matriz extracelular no glomérulo e nos tubos, ou seja, a acumulação de colagénio e fibronectina, é uma característica da nefropatia diabética (Permegiani, 2010).

Atribui-se ao hiperfluxo renal um papel fundamental no desencadeamento e progressão da nefropatia diabética. Os mecanismos iniciais, dependentes da

hiperglicémia, parecem envolver a activação renal dos sistemas das cininas-prostaglandinas. Quando a glomeruloesclerose se estabelece, a progressão da doença, provavelmente, deve-se à hiperfiltração compensatória, condição adaptativa em que os nefrónios remanescentes tentam manter a TFG (Faria, 2001).

O aparecimento da proteinúria marca o início da nefropatia diabética propriamente dita. O paciente que apresenta proteinúria já apresenta lesão glomerular visível à microscopia óptica (Guyton, 2006). Simultaneamente, a TFG inicia o seu declínio como resultado da glomeruloesclerose. Quando a taxa de filtração glomerular cai abaixo de um determinado limiar, tem início a elevação do azoto não-proteico no plasma, marcando o início da insuficiência renal. Neste momento, a evolução para a síndrome urémica e rins no estado terminal é inevitável, mesmo com intervenções actualmente disponíveis que retardam o processo de deterioração renal (Guyton, 2006).

Na nefropatia diabética a proliferação/activação da célula mensagial, danos tubulares e a regeneração bem como a fibrose intersticial têm sido associados com a neoexpressão de uma ampla gama de proteínas do citoesqueleto incluindo a actina e a vimentina (Sanai *et al.*, 2000).

Na progressão da fibrose renal, quer na glomerulonefrite clínica e experimental, a proliferação de macrófagos tem sido descrita como um importante mecanismo de remodelação celular. Yang *et al* (1998) mostraram as células mesangiais e os fibroblastos intersticiais adquirem novos fenótipos com a progressão dos danos renais. É o caso da expressão da  $\alpha$ -actina do músculo liso ( $\alpha$ SMA), proteína do citoesqueleto, observada em várias doenças renais, pelo que as células mesangiais e intersticiais positivas para  $\alpha$ SMA são consideradas fibrogénicas (Yonemoto *et al.*, 2006). Por outro lado, foi observado que as células dos tubos contornados que expressam  $\alpha$ SMA, consideradas como resultado de transdiferenciação do epitélio mesenquimal, estão associadas aos miofibroblastos intersticiais na glomerulonefrite humana grave (Jinde *et al.*, 2001). Assim, alterações na expressão da  $\alpha$ SMA sugerem um papel na patogénese da doença renal diabética (Sanai *et al.*, 2000; Yonemoto *et al.*, 2006).

## **2 Objectivos**

### **2.1 Objectivo geral**

O objectivo principal deste trabalho foi efectuar o estudo das alterações renais em ratos intolerantes à glicose (GIR).

### **2.2 Objectivos específicos**

Através da análise de marcadores bioquímicos:

- ♦ Avaliação da função renal recorrendo à análise indicadores bioquímicos (ácido úrico, creatinina e ureia) na urina e no sangue.

Através de métodos imuno-histoquímicos:

- ♦ Avaliar a existência de possíveis alterações morfológicas neste tecido, nomeadamente ao nível dos nefrónios;
- ♦ Avaliar a expressão de proteínas de stress, metalotioneínas (MTs) e proteínas de choque térmico (Hsp70);
- ♦ Avaliar a expressão da proteína do citoesqueleto, actina.

## **3 Materiais e Métodos**

### **3.1 Delineamento experimental**

Para a realização do presente trabalho, foram usados 6 ratos controlo e 6 ratos intolerantes à glicose (GIR) todas fêmeas de aproximadamente 16 semanas de idade, do biotério do Departamento de Química da Universidade de Évora. Os animais GIR foram obtidos por cruzamentos co-sanguíneos, entre os animais que apresentavam alterações mais significativas da prova de tolerância à glicose oral. Estes animais apresentam alterações nas curvas de tolerância à glicose que se caracterizam por elevados níveis de glicemia aos 30 e 60min, após a ingestão de um “bolus” de glicose.

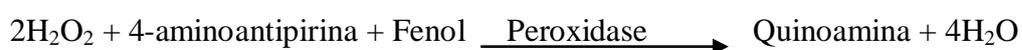
Os ratos foram mantidos com livre acesso a água e alimentos (*dieta standard* para ratos; SAFE tipo A04), num sistema com temperatura 23-24°C e humidade 60% regulada, num ciclo claro/escuro de 12/12h. Estes procedimentos foram supervisionados por um investigador treinado pela Federação de Laboratórios Europeus de Ciência Animal e em conformidade com a lei portuguesa (Portaria1005/92) a qual segue as recomendações da União Europeia no que diz respeito à regulamentação da experimentação em animais de laboratório.

### **3.2 Provas de tolerância à glicose oral**

No início desta experiência foi necessária a determinação das glicémias em jejum, peso corporal e realização das provas de tolerância à glicose oral. Os animais foram pesados após um jejum de 18 a 20h para a determinação do peso corporal. As glicemias foram determinadas no sangue total da veia da cauda, utilizando um glicómetro (Accutrend Sensor, Boehringer Mannheim) e tiras teste (Accu-chek) para glicose, que se baseiam no método da glicose-oxidase (reacção 1) (Yuen, 2000). Após a determinação das glicémias em jejum foi administrado um bolus de glicose com o auxílio de uma sonda gástrica. A solução de glicose continha 1,75g de glicose por peso corporal (g), em água.

Os animais foram contidos e procedeu-se à administração do bolus de glicose, de acordo com as regras de manipulação animal estabelecidas na legislação em vigor, com o objectivo de não magoar ou proporcionar qualquer tipo de desconforto no animal. Neste tipo de teste é necessário que o animal não entre em *stress*, pois tal poderia comprometer os resultados obtidos. O tempo foi cronometrado e as glicémias foram registadas aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do bolus de glicose.

### Reacção 1.



## 3.3 Parâmetros Bioquímicos

Antes do sacrifício os ratos foram colocados, em jejum, durante 24 horas, em gaiolas metabólicas individuais para recolha de urina.

Após a recolha da urina os animais foram eutanaziados, sob efeito de anestésico, por punção cardíaca. O sangue obtido foi colocado em tubos com EDTA 6mM, para impedir a coagulação. Posteriormente procedeu-se a uma centrifugação a 3000g durante 15min a 4°C, para a recolha do plasma. Este foi aliquoteado e armazenado a -20°C para a posterior determinação de parâmetros bioquímicos de interesse.

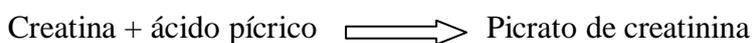
### 3.3.1 Análise sumária da urina

Procedeu-se à análise química utilizando fita de polielectrólitos (Combur 10 Test) para detecção semiquantitativa de proteínas, glicose, nitritos, bilirrubina, pH, corpos cetónicos, leucócitos, sangue e urobilinogénio na urina não centrifugada.

### 3.3.2 Creatinina

Para a determinação da creatinina a urina foi centrifugada a 3000rpm durante 10 minutos. A creatinina presente na amostra reage com o picrato em meio alcalino originando um complexo de cor vermelho-amarelado. Mede-se a velocidade de formação desse complexo utilizando uma cinética de 2 pontos durante os períodos iniciais da reacção; a reacção do picrato com outros cromogénios presentes na amostra é lenta, ocorrendo nos períodos finais da reacção, o que não interfere no doseamento da creatinina. A absorvância deste complexo é proporcional à concentração de creatinina na amostra.

#### Reacção 2.

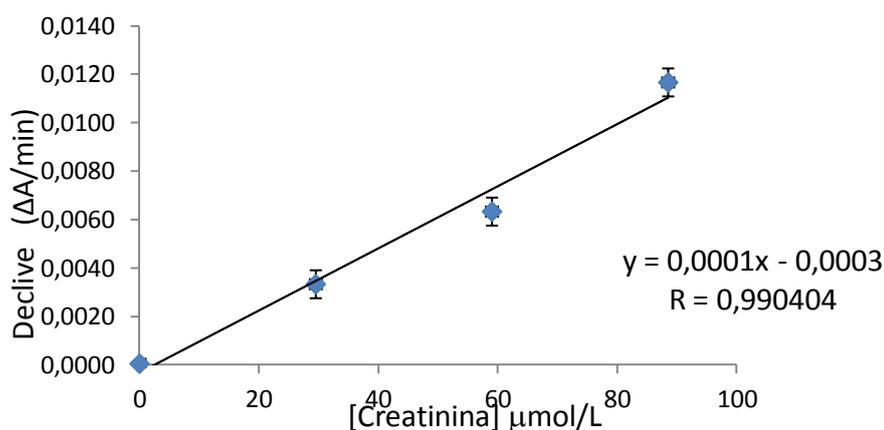


Para a determinação da creatinina no plasma e na urina foi utilizado um kit comercial (Clonital). O ensaio foi preparado de acordo com as seguintes tabelas:

**Tabela 2.** Preparação do ensaio da creatinina para a amostra do plasma.

	Padrão	Amostra
Reagente de trabalho	200µl	200µl
Equilibrar a temperatura, adicionar		
Amostra	-	40µl
Padrão	40µl	-

Após 30 segundos leu-se a absorvância do padrão e das amostras a 37°C e a um comprimento de onda de 510nm durante o intervalo entre 1 a 2 minutos. Para a realização deste estudo foi necessário construir uma curva de calibração (Figura 1) com concentrações adequadas para as respectivas amostras.



**Figura 1. Curva de calibração para determinação da concentração de creatinina no plasma.**

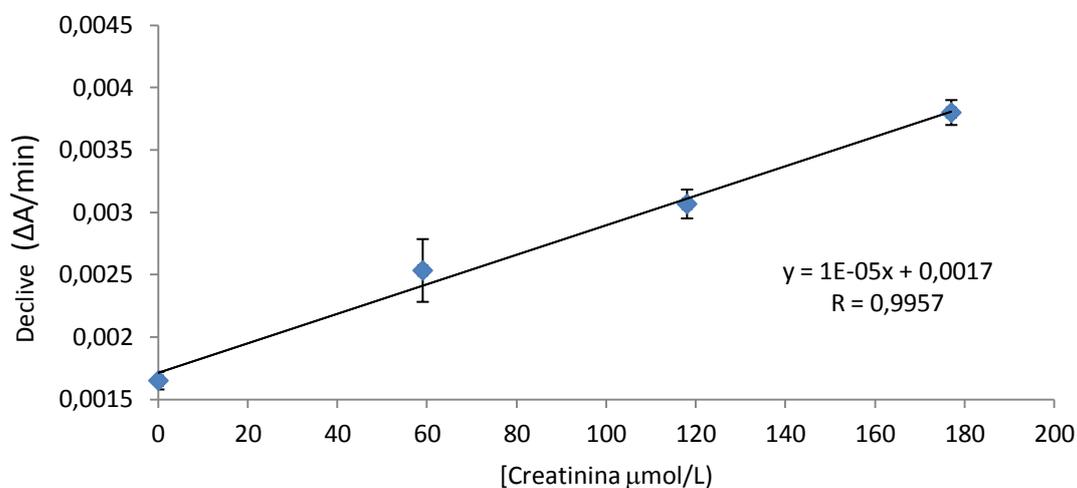
Os pontos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 replicados. O Y da equação da recta diz respeito à absorvância e o X à concentração de creatinina no plasma.

Para a amostra do soro a curva foi preparada com diluições sucessivas do padrão disponibilizado pelo Kit, cuja concentração é de  $177\mu\text{mol/L}$ , tendo-se obtido os padrões com concentrações de  $88,5\mu\text{mol/L}$ ,  $59\mu\text{mol/L}$  e  $29,5\mu\text{mol/L}$ . A concentração da creatinina no plasma foi calculada por interpolação utilizando a equação da curva de calibração.

**Tabela 3.** Preparação do ensaio da creatinina para a amostra da urina (diluída em água destilada 1:50)

	Padrão	Amostra
Reagente de trabalho	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
Equilibrar a temperatura, adicionar		
Amostra	-	20 $\mu\text{l}$
Padrão	20 $\mu\text{l}$	-

Após 30 segundo leu-se a absorvância do padrão e das amostras a  $37^\circ\text{C}$  e a um comprimento de onda de 510nm durante o intervalo entre 1 a 5 minutos. Para a realização deste estudo foi necessário construir uma curva de calibração (Figura 2) com concentrações adequadas para as respectivas amostras.



**Figura 2: curva de calibração para determinação da concentração de creatinina na urina.**

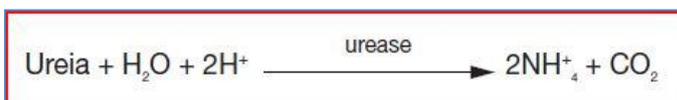
Os pontos representam a média±desvio padrão de 3 replicados. O Y da equação da recta diz respeito à absorvância e o X à concentração de creatinina na urina.

Para a amostra da urina a curva foi preparada com o branco de concentração 0μmol/L e diluições sucessivas do padrão disponibilizado pelo Kit, tendo-se obtido concentrações de 59 μmol/l para o padrão mais diluído, 118μmol/L para padrão menos diluído e 177μmol/L correspondente à concentração do padrão não diluído. As concentrações da creatinina na urina foram calculadas por interpolação utilizando a equação da curva de calibração.

### 3.3.4 Ureia

A ureia é hidrolisada através da urease em dióxido de carbono e amónia, a qual reage, na presença de glutamato desidrogenase (GLDH), com  $\alpha$ -cetoglutarato  $\beta$ -NADH<sub>2</sub> formando  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> em quantidades iguais. A amónia formada reage com salicilato e hipoclorito de sódio em meio alcalino, originando uma coloração verde. Através da leitura da variação da absorvância num determinado intervalo de tempo devida à oxidação do  $\beta$ -NADH<sub>2</sub>, é possível calcular a actividade do analito na amostra. O aumento da absorvância é proporcional à concentração de ureia na amostra.

#### Reacção 3.



Na determinação da concentração da ureia nas amostras do plasma e da urina foi utilizado um kit comercial (Sentinel; ver Tabela 3).

**Tabela 4.** Preparação do ensaio da ureia para as amostras de plasma e da urina.

	Amostra	Calibrador
Amostra	10 $\mu$ l	
Padrão		10 $\mu$ l
Reagente 1	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
Misturar e incubar durante 1min à temperatura. Adicionar:		
Reagente 2	1000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l

Após 30 segundo leu-se a absorvância do padrão e das amostras a 37°C e a um comprimento de onda de 340nm durante num intervalo de 0 a 1 min. Para o cálculo das concentrações da ureia das nossas amostras, assumiu-se a linearidade e utilizou-se apenas o padrão, de acordo com a seguinte fórmula:

$$[\text{Ureia}] = \Delta A \text{ amostra} / \Delta A \text{ padrão} \times 40 \times \text{FD} = \text{mg/ dL}$$

### 3.3.5 Ácido Úrico

O ácido úrico é oxidado pela uricase em alantoína, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de uma reacção de ligação oxidativa, catalisada pela peroxidase. O peróxido de hidrogénio formado reage com o diclorofenolsulfureto e 4-aminoantipirina, produzindo uma antipirilquinonimina. O complexo formado é directamente proporcional à concentração de ácido úrico da amostra.

#### Reacção 4.



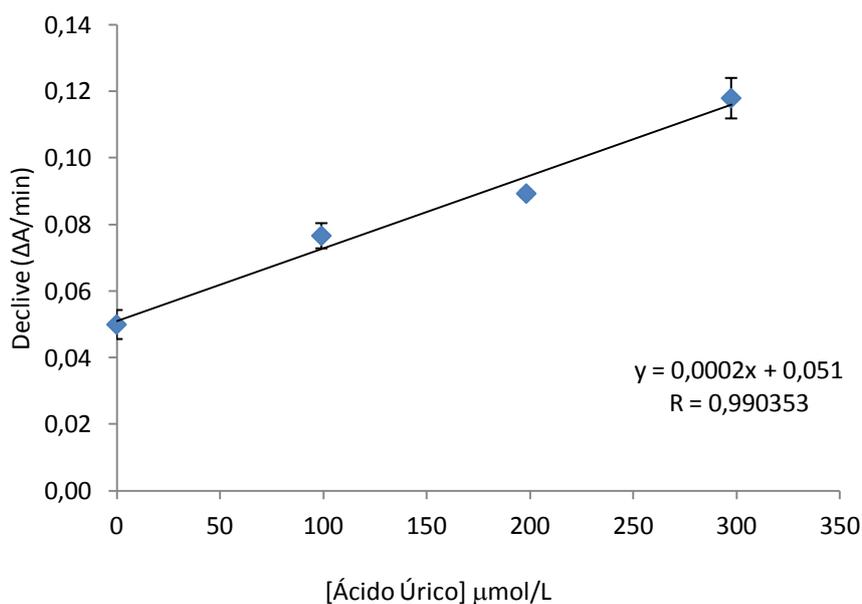
As concentrações de ácido úrico nas amostras do plasma e da urina foram determinadas utilizando um Kit comercial (Clonital; ver Tabela 5).

**Tabela 5.** Preparação do ensaio do ácido úrico para as amostras do plasma e da urina

	Branco	Padrão	Amostra
Amostra	-	-	5µl
Padrão	-	5µl	-
Reagente de trabalho	200µl	200µl	200µl

Após a mistura de todos os componentes incubou-se a 37°C durante 10 minutos e efectuou-se a leitura da absorvância a 520nm da amostra e do padrão contra o branco.

Para o cálculo das concentrações do ácido úrico nas amostras a curva foi preparada com o branco de concentração  $0\mu\text{mol/L}$  e diluições sucessivas do padrão disponibilizado pelo Kit, tendo-se obtido concentrações de  $99,2\mu\text{mol/l}$  para o padrão mais diluído,  $198,3\mu\text{mol/l}$  para padrão menos diluído e  $297,5\mu\text{mol/L}$  correspondente à concentração do padrão não diluído. As concentrações do ácido úrico nas amostras foram calculadas por interpolação utilizando a equação da curva de calibração.



**Figura 3. Curva de calibração para determinação da concentração do Ácido Úrico nas mostras do plasma e urina.**

Os pontos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 replicados. O Y da equação da recta diz respeito à absorvância e o X à concentração do Ácido Úrico.

### 3.3.6 Clearance Renal

A *clearance* é a medida da taxa de filtração glomerular, ou seja, do volume filtrado pelo rim a cada minuto. As concentrações das substâncias (ácido úrico, creatinina e ureia) no plasma e na urina, o peso corporal e o volume urinário de 12 a 24 horas são medidos simultaneamente para que a *clearance* seja calculado.

Depuração renal é uma medida que permite analisar a actividade renal.

Neste trabalho foi calculado a Clearance para todos os parâmetros usados da função renal (Ácido Úrico, Creatinina e Ureia), usando a seguinte fórmula:

$$\text{Clearance de Creatinina} = \frac{[\text{creatinina}] \text{ urina } \text{mg} / \text{dL} \times \text{mL Urina } 24\text{h}}{[\text{creatinina}] \text{ soro } \text{mg} / \text{dL} \times 720 \text{min}}$$

$$\text{Clearance de Ureia} = \frac{[\text{Ureia}] \text{ urina } \text{mg} / \text{dL} \times \text{mL Urina } 24\text{h}}{[\text{Ureia}] \text{ soro } \text{mg} / \text{dL} \times 720 \text{min}}$$

$$\text{Clearance ÁcidoÚrico} = \frac{[\text{ÁcidoÚrico}] \text{ urina } \text{mg} / \text{dL} \times \text{mL Urina } 24\text{h}}{[\text{ÁcidoÚrico}] \text{ soro } \text{mg} / \text{dL} \times 720 \text{min}}$$

### **3.4 Histologia**

Após o sacrifício dos animais os rins foram removidos e pesados, e após seccionados sagitalmente, foram fixados em formaldeído neutro a 10%, tamponado (pH 7.4), durante 24 horas. De seguida procedeu-se ao seu processamento pelas técnicas histológicas de rotina, em sistema automático: inclusão em parafina e corte em micrótopo rotativo, em secções com 5 µm de espessura. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro de 75x25 mm e corados com: Hematoxilina e Eosina (H&E), para observação da estrutura geral e eventuais alterações histopatológicas e avaliação histomorfométrica.

As preparações definitivas foram observadas em microscópio fotónico Nikon Eclipse 600, sendo as imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100. Por cada animal de cada grupo, foi seleccionada uma lâmina e em cada uma delas, observaram-se aleatoriamente, com uma ampliação de 200X, quarenta corpúsculos renais para a medição do perímetro da cápsula de Bowman e do glomérulo, da área do glomérulo, da cápsula de Bowman e do espaço de Bowman, através do software SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Chicago, USA).

### **3.5 Imuno-histoquímica**

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando os anticorpos primários (Thermo Scientific) contra metaloteioneína, Hsp70, actina/músculo liso (Tabela 6) pelo método da Streptavidina-biotina-peroxidase (UltraVision Sistema de Detecção de Kit, NeoMarkers, USA, ref<sup>ª</sup> TP-015-HD), de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela 6.** Anticorpos utilizados na marcação imunohistoquímica

Anticorpo	Referência	HIER <sup>1</sup>	Diluição	Incubação <sup>2</sup>
Metalotioneínas	Mouse-11.175, Ab-1, clone E9	Não	1:50	60 min.
Hsp70	Mouse-482, Ab-2, clone W27	Sim	1:50	30 min.
Actina	Rabbit-9010	Não	1:100	30 min.

<sup>1</sup> HIER (*Heat-Induced Epitope Retrieval*): Recuperação antigénica. <sup>2</sup> À temperatura ambiente.

Resumidamente: secções de 5 µm de espessura, dos mesmos blocos da análise histológica, foram estendidas em lâminas de vidro de 75x25 mm, tratadas com polilissina, desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em graduações decrescentes de álcool até água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogénio a 3% em metanol (1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%, para 9 partes de metanol absoluto), durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*; pH 7,4), três vezes por dois minutos. Antes da incubação com o anticorpo primário anti-Hsp70, os cortes foram pré-tratados para recuperação antigénica (Tabela 6), em solução tampão citrato (pH 6,0), a 98°C durante 20 minutos, após o que foram arrefecidos, durante 20 minutos, à temperatura ambiente e lavados em PBS, três vezes por dois minutos. Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com a solução de bloqueio durante 5 min à temperatura ambiente, após o que foram incubados, em câmara húmida com os respectivos anticorpos primários (Tabela 6). Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com anticorpo secundário biotilado durante 15 minutos, em câmara húmida à temperatura ambiente. Logo após foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase durante 15 minutos em câmara húmida à temperatura ambiente, sendo lavados novamente em PBS, três vezes por dois minutos, e submetidos à revelação com o cromogénio castanho [DAB, Diaminobenzidina], durante 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer durante 1 minuto, posteriormente lavados em água corrente, durante 1-2 minutos, e desidratados em graduações de álcool, clarificados em xilol e montados com Entellan (Merck, nº. 107961).

Para a interpretação dos resultados foram incubadas secções adjacentes como controlos negativos: (a) sem o anticorpo primário e (b) com soro normal (concentração semelhante à do anticorpo primário).

Relativamente à expressão das proteínas as lâminas foram também examinadas em microscópio fotónico Nikon Eclipse 600 sendo as imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100. A intensidade da coloração e a localização de células/estruturas imunorreactivas foram avaliadas em, pelo menos, uma secção de cada glândula por animal, por um observador que desconhecia o grupo a que pertenciam os animais. A imunocoloração foi avaliada de forma qualitativa de acordo com a seguinte escala: - (negativo); + (imunomarcação fraca); ++ (imunomarcação moderada); +++ (imunomarcação forte).

### **3.6 Análise estatística**

Os valores obtidos da histomorfometria e imuno-histoquímica foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças na análise estatística dos dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Foi usado o programa SPSS16.

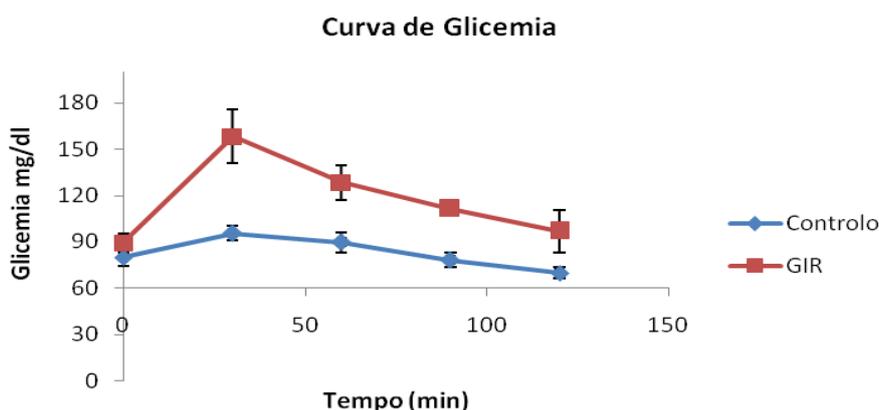
Os resultados dos parâmetros bioquímicos foram expressos em valores médios  $\pm$  erro padrão da média (epm). A comparação entre os valores médios dos grupos foi efectuada utilizando a análise de variância simples (ANOVA), para um intervalo de confiança de 95%. As diferenças na análise estatística dos dados é considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## 4 Resultados

### 4.1 Curvas de tolerância à Glicose Oral

Efectuaram-se provas de tolerância a 12 animais fêmeas (6 Controlos e 6 GIR), todos eles da mesma idade (16 semanas). Na figura 4 estão representados as curvas de tolerância à glicose oral de ambos os grupos em estudo, controlo e GIR.

As glicemias em jejum dos animais GIR estão ligeiramente mais elevadas do que os animais controlo,  $89,2 \pm 5,98$  mg/dl e  $79,8 \pm 5,38$  mg/dl respectivamente. Este aumento dos níveis de glicemia em jejum nos animais GIR em relação aos animais controlo sugere que estes animais começam a apresentar alguns sinais de hiperglicemia em jejum.



**Figura 4: Prova de tolerância à glicose oral.**

Valores médios de glicemias medidas em jejum e após administração oral de um bolus de 1,75g de glicose/kg de peso corporal dos animais controlo e GIR. Os pontos representam o valor médio desvio  $\pm$  padrão.

Relativamente às glicemias pós-prandiais observam-se que as curvas nos GIR apresentaram valores mais elevados comparativamente com os animais controlo. É possível observar que as diferenças mais significativas ocorrem aos 30 min, onde atingem os valores máximos. Aos 60 min verificou-se uma diminuição dos níveis de glicemia, e estas continuam a diminuir, e aos 120 min aproximam-se dos valores de jejum. Essas diferenças entre o controlo e o GIR, estatisticamente são significativas ( $p=0,02$ ).

## 4.2 Análise sumária da urina

Às amostras de urina não centrifugada foi efectuado um teste prévio, teste Combur, que avaliam as alterações patológicas que causam mudanças claras de cor nos campos de teste, em que dão alguma informação sobre o estado em que os animais se encontram. Na tabela 7 estão descritos os resultados, não se tendo observado diferenças significativas entre controlos e GIR.

**Tabela 7.** Valores obtidos no teste de Combur®

Animal	Densidade	Média da densidade	Desvio Padrão da Densidade	pH	Média de pH	Desvio Padrão de pH	Leucócitos	Nitrito	Proteínas	Glicose	Cetona	Urobilinogénio	Bilirubina	Sangue	Hemoglobina
Controlo	1,01	1,013	0,006	6	5,83	0,75	-	-	1	normal	-	normal	-	-	-
	1,01			7			-	-	1+	normal	-	normal	-	-	-
	1,01			6			-	-	1+	normal	-	normal	-	-	-
	1,01			6			-	-	1+	normal	-	normal	-	-	-
	1,03			5			1+	-	1+	normal/1+	-	normal	1+	-	-
	1,02			5			-	-	1+	normal	-	normal	-	-	-
GIR	1,02	1,012	0,003	6	6,67	0,52	-	-	1+	normal	-	normal	-	-	-
	1,01			7			-	-	-/+1	normal	-	normal	-	-	-
	1,02			6			-	-	-/+1	normal	-	normal	-	-	-
	1,01			7			-	-	-	normal	-	normal	-	-	-
	1,01			7			-	-	-/+1	normal	-	normal	-	-	-
	1,01			7			-	-	-	normal	-	normal	-	-	-

No que respeita às densidades médias obtidas verificou-se uma ligeira diferença entre os grupos controlo e GIR, mas estatisticamente não é significativa ( $p=0,55$ ). Em relação ao pH, o valor médio para o grupo controlo é de 5,87, e para o grupo GIR é de 6,67. Esta diferença de pH entre os grupos controlo e GIR é estatisticamente significativa ( $p=0,049$ ).

Nos leucócitos, praticamente todos os animais dos dois grupos em estudo (controlo e GIR) apresentavam negativos, com excepção de um único animal do grupo controlo que apresenta leucócito positivo.

Todos os animais dos dois grupos em estudo apresentam resultados para a presença de nitrito negativo. No que respeita às proteínas, todos os animais do grupo controlo tinha o resultado positivo. O mesmo não aconteceu com o grupo dos animais GIR, visto que só um único animal apresentava o resultado positivo, dois animais deste grupo apresentava resultado negativo e os restantes animais deste grupo apresentavam resultado intermédio.

Quanto á presença de glicose, nos animais do grupo controlo um único animal é que apresentava glicose ligeiramente mais do que o normal, e os restantes animais tiveram todos resultados normais, inclusivamente os animais do grupo GIR.

Relativamente á presença de cetona, todos os animais de ambos os grupos apresentavam resultados negativos.

Para o urobilinogénio o resultado foi normal para todos os animais dos dois grupos em estudo. De todos os animais em estudo, apenas um animal do grupo controlo apresentava bilirrubina na urina. Nenhum dos animais apresentou sangue e hemoglobina na urina.

### 4.3 Peso dos animais e dos rins

Na Tabela 8 estão representados os pesos corporais e os pesos dos rins dos animais controlos e GIR. No que diz respeito ao peso corporal dos animais verificou-se uma diferença significativa entre os animais controlos e GIR, tendo os animais controlo com o peso corporal mais elevado do que os animais GIR. O mesmo foi observado com o peso dos rins. No entanto, no que se refere ao peso relativo dos rins não houve diferenças entre os animais controlo e os animais GIR.

**Tabela 8.** Peso dos rins nos animais controlo e GIR (média  $\pm$  desvio padrão)

	Peso corporal (g)	Peso do rim (g)	Peso relativo do rim (%)
<b>Controlos</b>	220,17 $\pm$ 7,57 <sup>a</sup>	0,89 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,02
<b>GIR</b>	197,33 $\pm$ 4,43 <sup>b</sup>	0,77 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,39 $\pm$ 0,03

<sup>a,b</sup> Valores na mesma coluna com letras diferentes, diferem significativamente ( $p < 0.05$ )

### 4.4 Histomorfometria

Na Tabela 9 é possível observar, as diferenças encontradas nos rins dos animais dos diferentes grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas relativamente à área do glomérulo (AG), à área da cápsula de Bowman (AC), ao perímetro da cápsula de Bowman e ao perímetro do glomérulo, mas observaram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente ao rácio AC/AG e ao espaço de Bowman.

**Tabela 9.** Parâmetros histomorfométricos

do corpúsculo renal (pixels) (média ± desvio padrão)

Animais	Área da Cápsula Bowman (AC)	Área do Glomérulo (AG)	Ratio AC/AG	Área do Espaço Bowman (AC-AG)	Perímetro do Glomérulo	Perímetro da Cápsula
<b>Controlo</b>	191771,6 ± 45098,7	158051,5 ± 37386,6 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,05 <sup>a</sup>	33720,0 ± 11333,2	1581,4 ± 226,3 <sup>a</sup>	1745,2 ± 256,2 <sup>a</sup>
<b>GIR</b>	180641,3 ± 53603,4	144947,5 ± 43832,7 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,04 <sup>b</sup>	35693,8 ± 12085,7	1479,3 ± 222,4 <sup>b</sup>	1645,0 ± 247,8 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Valores na mesma coluna afectados por letras diferentes em índice superior diferem significativamente para  $P < 0,05$ .

#### 4.5 Imuno-histoquímica

Na Tabela 10 e nas Figuras 5 a 8 pode observar-se a expressão das diferentes proteínas nos animais normais e nos animais intolerantes à glucose (GIR).

**Tabela 10.** Expressão das proteínas estudadas nas diferentes estruturas do rim nos animais controlo (C) e animais intolerantes à glucose (GIR)<sup>1</sup>

Grupo	Hsp		MTs		Actina	
	C	GIR	C	GIR	C	GIR
Glomérulo	+	+++	-/+	-/+	-/+	+
Tubos contornados proximais	++	-/+	+++	++	+	+
Ansa de Henle	-/+	-/+	-/+	-/+	+	+ /+++
Tubos contornados distais	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Canais colectores	-/+	-/+	-/+	-/+	+	++ /++++
Interstício renal	++	+++	-/+	-/+	+ /+++	+++

<sup>1</sup> Intensidade de coloração: - (negativo); + (imunomarcação fraca); ++ (imunomarcação moderada); +++ (imunomarcação forte).

Relativamente à Hsp70 nos animais controlo foi observada imunomarcção fraca a moderada nos glomérulos, tubos contornados proximais e no interstício renal da zona medular; nos animais GIR foi observada imunomarcção positiva forte nos glomérulos e no interstício renal da zona medular (Tabela 10 e Figura 5). Não foi observada imunomarcção nas secções que serviram de controlos negativos.

Relativamente às metalotioneínas nos animais controlo foi observada imunomarcção positiva, moderada a forte, nos tubos contornados proximais, diminuindo a expressão do córtex para a medula; nos animais GIR a imunomarcção é aparentemente menos evidente, sendo também os tubos contornados a estrutura com maior marcação (Tabela 10 e Figura 6). Adjacentes às zonas de forte marcação aparecem zonas negativas. Não foi observada imunomarcção nas secções que serviram de controlos negativos.

Relativamente à actina nos animais controlo foi observada imunomarcção positiva, fraca a moderada nas várias estruturas histológicas, (Tabela 10 e Figura 7); nos animais GIR é possível observar, de uma maneira geral, imunomarcção positiva, de fraca a forte nas várias estruturas histológicas mais forte nos tubos colectores e no interstício renal da zona medular (Tabela 10 e Figura 8). Não foi observada imunomarcção nas secções que serviram de controlos negativos.

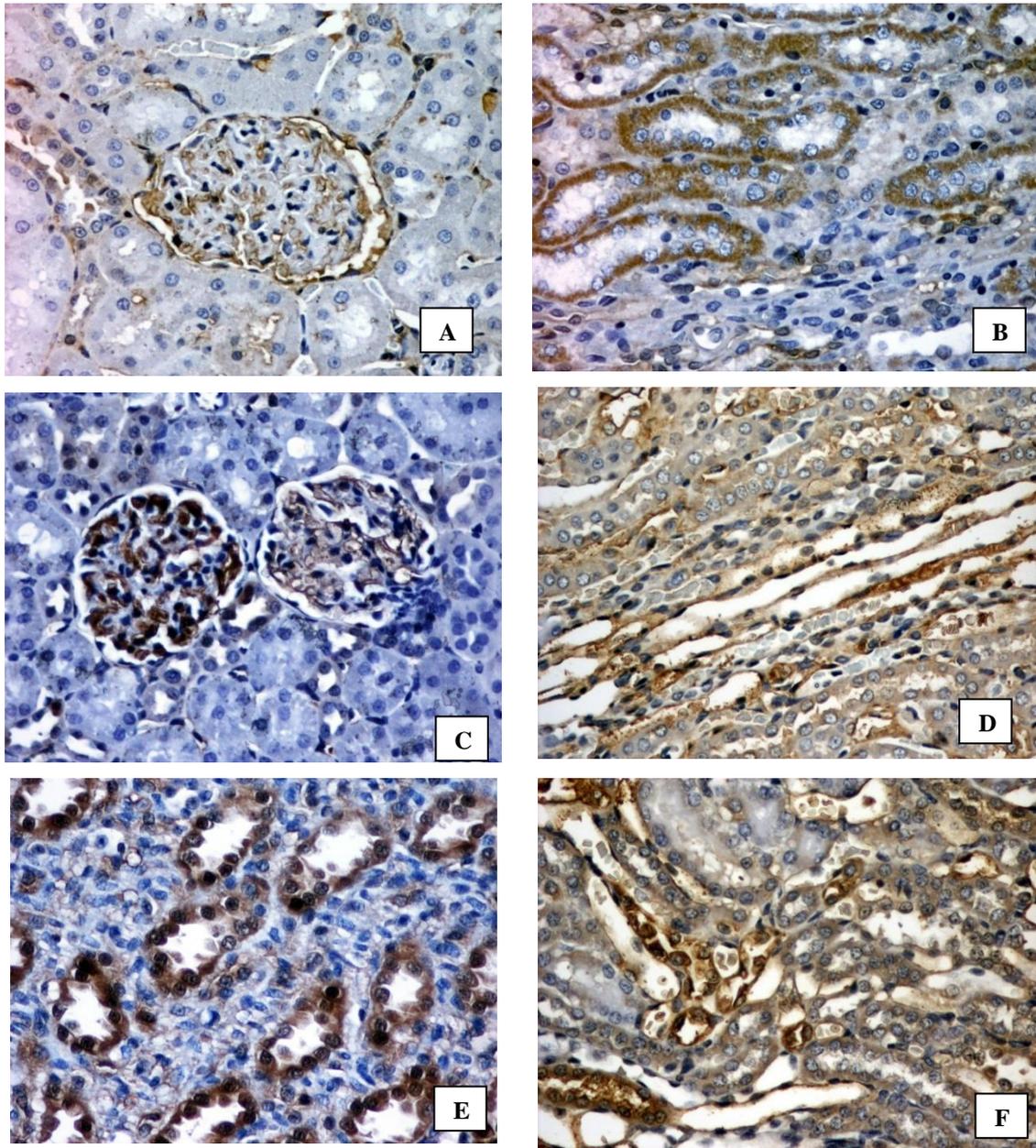


Figura 5. Expressão das Hsp.

Nos animais do grupo controlo é possível observar imunomarcção positiva, evidenciada pela cor castanha, nos glomérulos (A), e nos tubos contornados distais (B), ao nível do citoplasma. Nos animais GIR é possível observar imunomarcção positiva, evidenciada pela cor castanha, nos glomérulos (C), na ansa de Henle (D) e nos canais colectores (E e F) [Ampliação 200x; contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

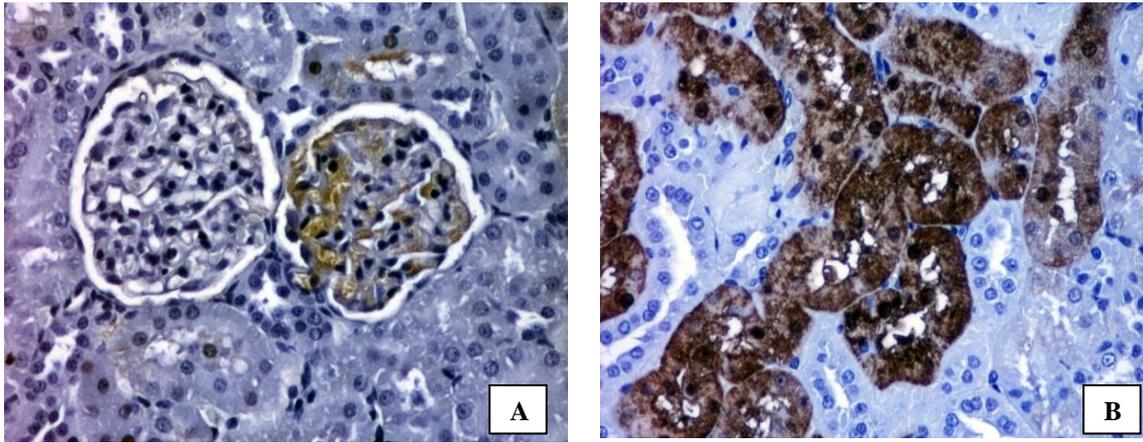


Figura 6. Expressão das metalotioneínas.

É possível observar imunomarcagem positiva, evidenciada pela cor castanha, no glomérulo (A) e nos tubos contornados proximais (B), ao nível do núcleo e do citoplasma [Ampliação 200x; contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

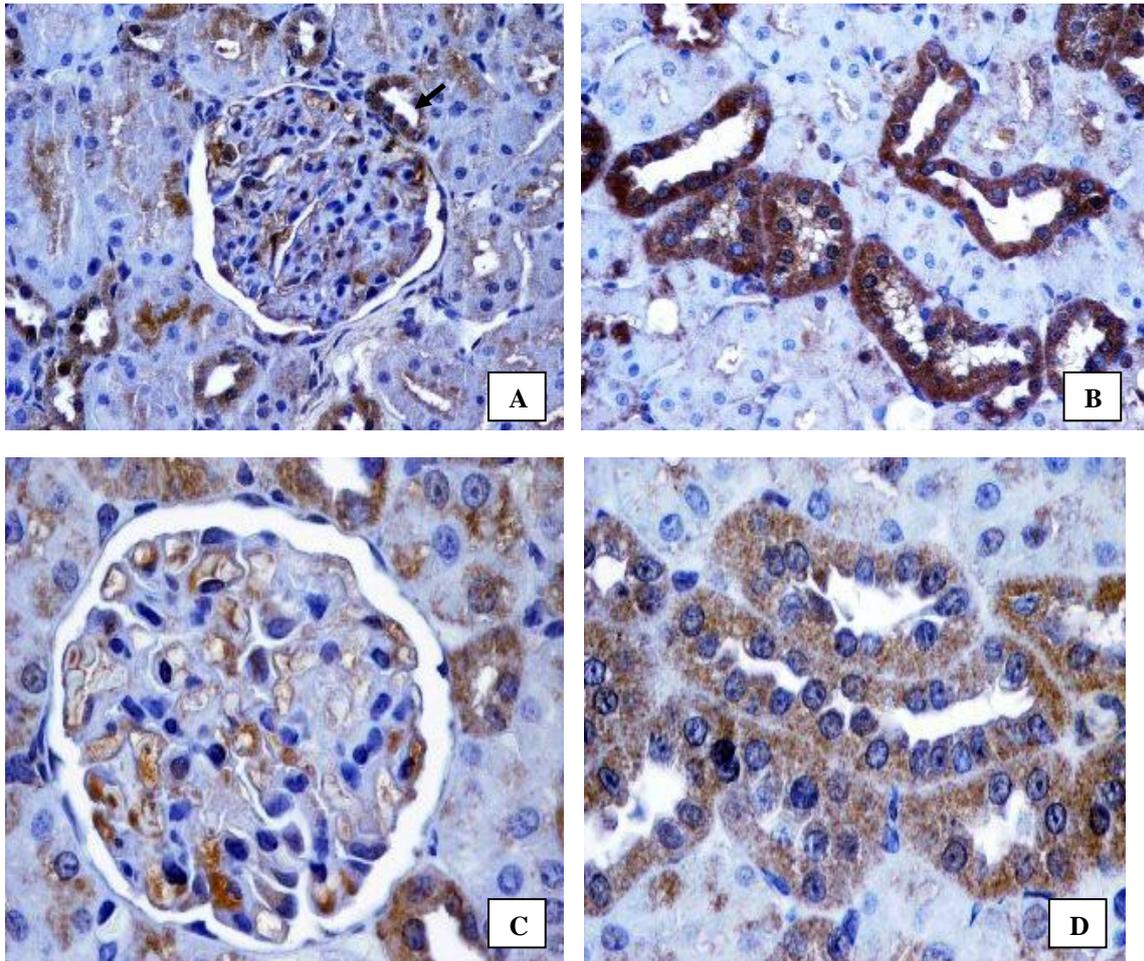


Figura 7. Expressão da actina.

Nos animais do grupo controle é possível observar imunomarcção positiva, evidenciada pela cor castanha, nos glomérulos (A, 200x), e nos tubos contornados distais (B, 200x), ao nível do citoplasma; em A é evidente a mácula densa (seta) com imunomarcção positiva. Nos animais GIR é possível observar imunomarcção positiva, evidenciada pela cor castanha, nos glomérulos (C, 400x) e nos tubos contornados distais (D, 400x) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

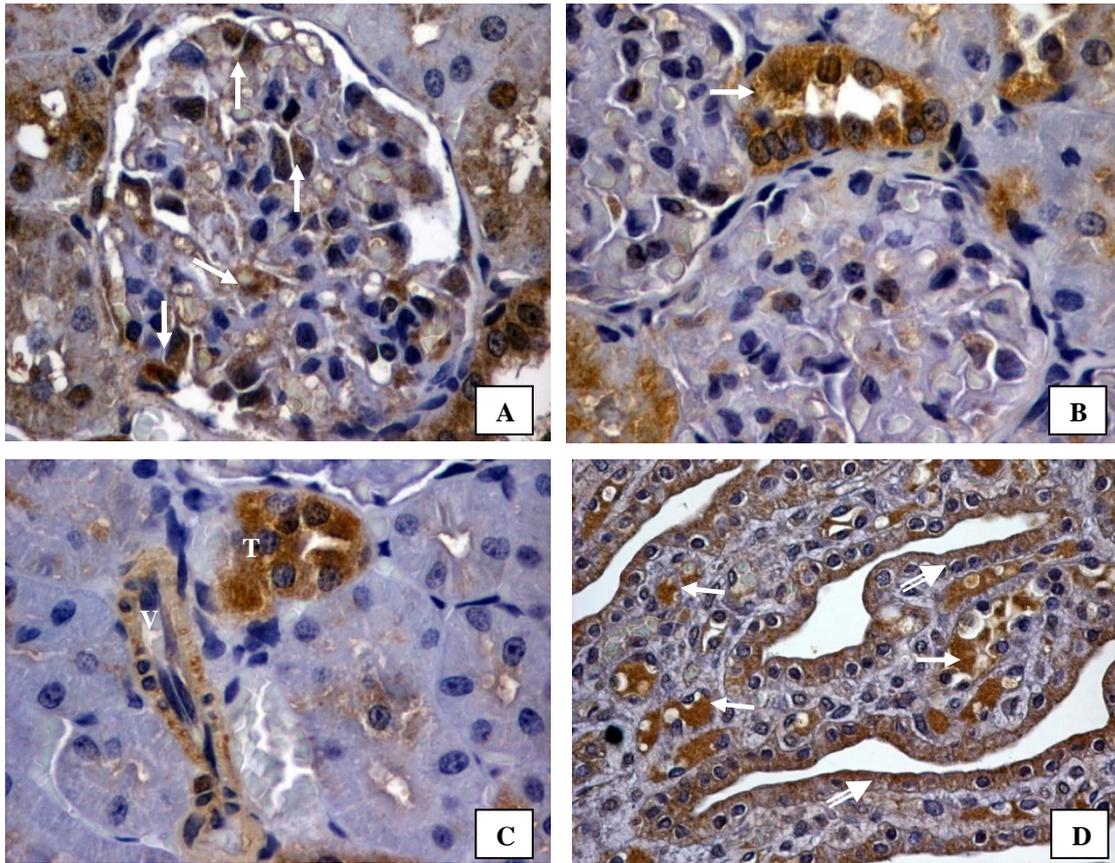


Figura 8 Expressão da actina (secções de rim de animais GIR).

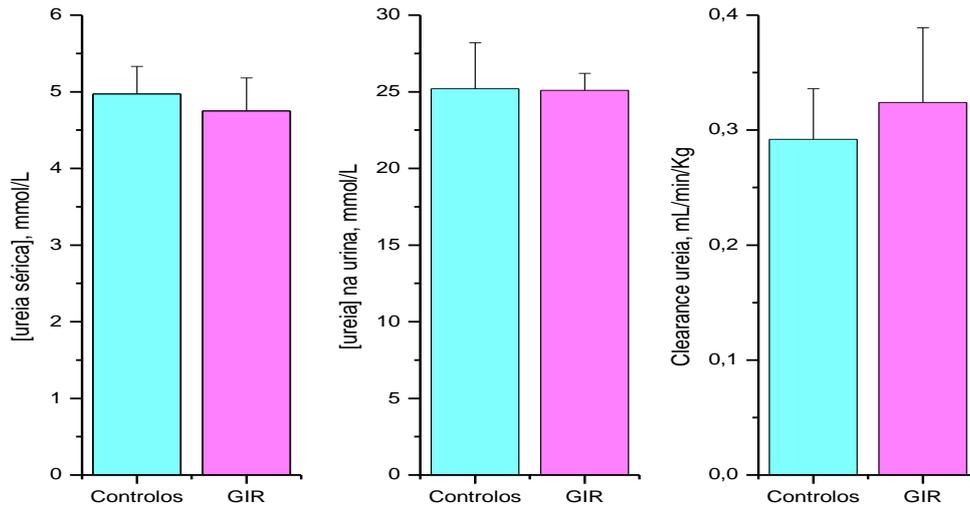
Em A (400x), é possível observar imunomarcção positiva, evidenciada pela cor castanha, em algumas células mesangiais (setas); em B (400x), a expressão da actina é muito forte na mácula densa (seta), e em C (400x) num vaso sanguíneo (V) e num tubo contornado proximal (T); em D (200x) é possível observar uma forte imunomarcção nas células epiteliais dos canais colectores (dupla seta) e no interstício renal (seta) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

## 4.6 Estudo da Função Renal

Nas secções anteriores mostrou-se que os GIR apresentavam alterações morfológicas ao nível dos glomérulos e da cápsula, o que poderá ter implicações na função renal.

Assim, analisaram-se os parâmetros bioquímicos séricos e urinários mais relevantes para a caracterização da função renal, designadamente, a ureia, o ácido úrico e a creatinina bem como as respectivas taxas de clearance.

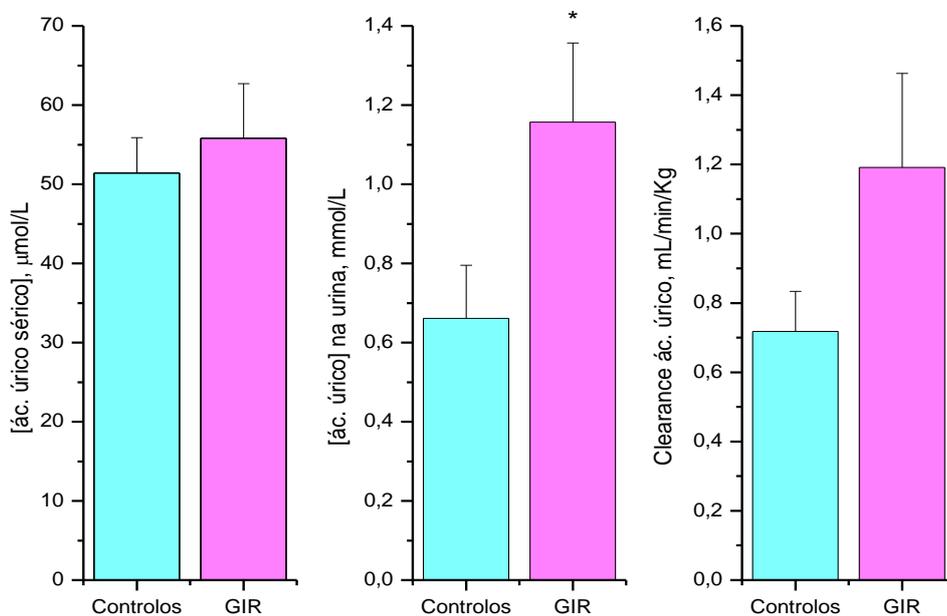
Na figura 9 estão representados os valores médios das concentrações da ureia nas amostras de soro e urina nos grupos dos animais controlo e GIR, também estão representados os valores médios da taxa de clearance da ureia nos dois grupos dos animais em estudo. Estatisticamente, não se observou nenhuma diferença significativa nas concentrações da ureia sérica entre os animais em estudo, tendo-se registado os valores de  $4,96834 \pm 0,361$  e  $4,47 \pm 0,432$  mmol/L para controlo e GIR respectivamente ( $p=0,40$ ). Também não se observaram na urina diferenças entre os grupos nos níveis de ureia na urina ( $25,21 \pm 3,01$  mmol/L e  $25,13 \pm 1,1$  mmol/L para controlo e GIR, respectivamente;  $p=0,98$ ). Finalmente a taxa de clearance da ureia entre os grupos dos animais estudados, foi também similar observando-se valores de  $0,29 \pm 0,044$  e  $0,32 \pm 0,065$  mL/min/Kg para controlo e GIR, respectivamente ( $p=0,69$ ).



**Figura 9. Concentração da Ureia no soro e urina e a variação da Clearance.**

Valores médios das concentrações  $\pm$  epm determinadas dos grupos Controlo e GIR através de um método enzimático-colorimétrico. Controlo n=6 e GIR =5 a 6,  $p>0,05$ .

No caso do ácido úrico, cujos resultados estão representados na figura 10.

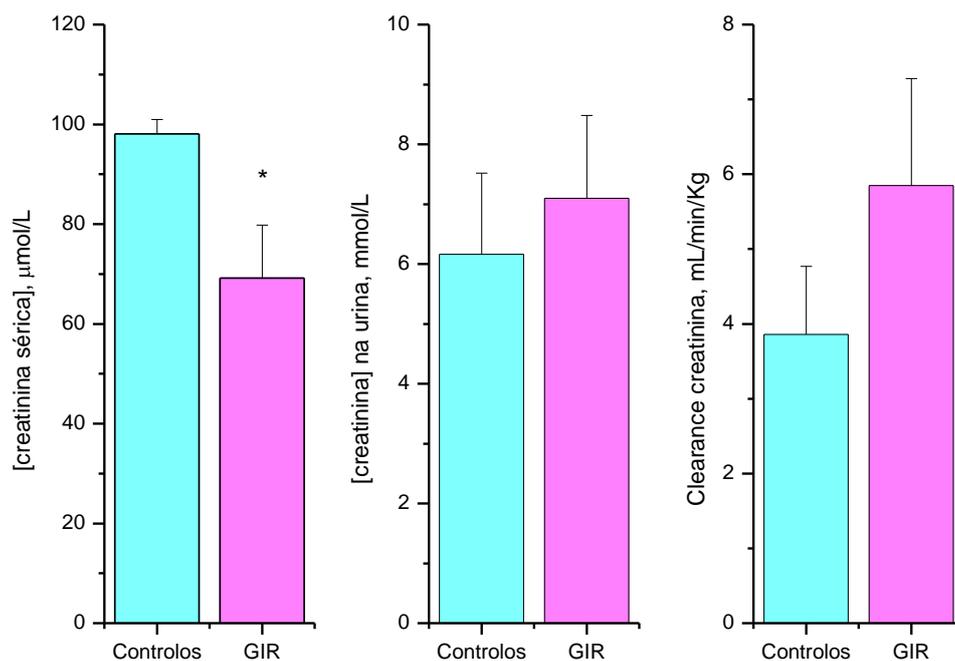


**Figura10. Concentração do ácido úrico sérico e úrico e a variação da Clearance.**

Valores médios das concentrações  $\pm$  epm determinadas dos grupos Controlo e GIR através de um método enzimático-colorimétrico. Controlo n=6 e GIR =5 a 6; \*  $p<0,05$ .

Observaram-se valores séricos de ácido úrico semelhantes em ambos os grupos ( $51,39 \pm 4,5 \mu\text{mol/L}$  e  $55,8 \pm 6,9 \mu\text{mol/L}$  para controlo e GIR, respectivamente;  $p=0,603$ ), enquanto que os valores de ácido úrico nas amostras da urina do GIR ( $1,157 \pm 0,2 \text{mmol/L}$ ) foram mais elevados que nos controlos ( $0,661 \pm 0,1 \text{mmol/L}$ ),  $p=0,042$ . No entanto os valores da taxa de clearance do ácido úrico não foram significativamente diferentes ( $0,718 \pm 0,116 \text{ mL/min/Kg}$  e  $1,191 \pm 0,249 \text{ mL/min/Kg}$  para controlo e GIR respectivamente,  $p=0,12$ ), embora tendessem a ser mais elevados.

Por seu turno, a creatinina sérica foi menor nos GIR ( $69,1 \pm 10,6$  e  $98,1 \pm 2,9 \mu\text{mol/L}$  para GIR e controlos, respectivamente;  $p < 0,05$ ), assumindo valores contrários na urina ( $7,44 \pm 1,72$  e  $5,56 \pm 1,74 \text{ mmol/L}$  para GIR e controlos, respectivamente;  $p > 0,05$ ), (ver figura 11).



**Figura11: Concentração da creatinina no soro e na urina e a variação da Clearance.**

Valores médios das concentrações  $\pm$  epm determinadas dos grupos Controlo e GIR através de um método enzimático-colorimétrico. Controlo n=6 e GIR =5 a 6; \*  $p < 0,05$ .

No que respeita à clearance da creatinina esta parece estar aumentada nos GIR quando comparado com os controlos ( $5,86 \pm 0,91$  e  $3,86 \pm 1,43$  mL/min/Kg para GIR e controlo, respectivamente;  $p = 0,26$ ).

## 5. Discussão

No que se refere aos níveis de glicose sanguíneo concluiu-se que os animais GIR apresentam características típicas de DT2, muito embora não sofram de hiperglicemia em jejum.

Comparando todos os resultados da análise sumária da urina, verificamos que a densidade da urina para ambos os grupos está dentro dos valores normais (1,015 a 1,025). Em relação ao pH urinário, embora quando comparando controlo e GIR apresentam diferenças estatísticas significativas, os seus valores médios estão dentro dos normais (pH urinário varia entre 4,5 e 8). Os leucócitos são glóbulos brancos, célula de defesa, a sua presença na urina indica a actividade inflamatória nas vias urinárias. Nos animais em estudo não se verificou a presença desta, sendo assim pode-se concluir que não existe nenhuma complicação inflamatória a nível urinário.

O teste de detecção de nitrito na urina é uma prova indirecta para o diagnóstico precoce de bactéria na urina. Esta situação não se verifica nas amostras em estudo, o que significa que os animais não apresentavam nenhuma infecção.

A presença de uma pequena quantidade de proteína na urina dos animais em estudo pode indicar o início da disfunção renal, no entanto, com a análise bioquímica dos parâmetros indicadores da função renal poderemos ter um resultado mais concreto.

Quantidades normais de glicose na urina sugerem que os animais em estudo (controlo e GIR) não apresentam elevadas concentrações de glicose na circulação, como ocorre na diabetes.

Os corpos cetónicos são produtos da metabolização de gorduras e normalmente não estão presentes na urina. A sua presença indica uma diabetes descompensada ou jejum muito prolongado. Nos animais em estudo não se observou a presença de corpos cetónicos, pois, estes são controlos e GIR, e o jejum é de 12h.

A presença de urobilinogénio e bilirrubina podem indicar complicações hepáticas ou hemólise (destruição das hemácias), neste ensaio não se verificam estas alterações.

Nenhum dos animais apresentava sangue e hemoglobina na urina, o que sugere que os animais não apresentam nenhuma indicação de hemólise. Em suma, em qualquer dos grupos não se observaram alterações dos indicadores analisados que sugerissem estados patológicos. No que se refere aos níveis de glicose sanguínea concluiu-se que os animais GIR apresentam características típicas de DT2, muito embora não sofram de hiperglicemia em jejum.

Geralmente, os glomérulos e os rins são de tamanho normal ou aumentado, no início do desenvolvimento da nefropatia diabética, distinguindo-a assim de muitas outras formas de insuficiência renal crónica, onde é reduzido o tamanho renal. No presente trabalho as diferenças encontradas entre os pesos dos rins são justificadas pelo facto dos animais controlo serem mais pesados do que os animais GIR, não se tendo encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os pesos relativos. Deste modo, os nossos dados sugerem que no estado de desenvolvimento das alterações renais, elas ainda não se traduzem na anatomia do rim.

Relativamente aos dados histomorfométricos não se observaram diferenças significativas entre os grupos controlo e GIR, e quando elas se verificam, provavelmente têm justificação na diferença de tamanho/peso dos rins dos animais dos dois grupos. Por outro lado, o tamanho reduzido da amostra também poderá ter contribuído para alguma discrepância verificada entre alguns dos resultados.

Os resultados observados relativamente à expressão das Hsp70 mostraram uma imunomarcção, pelo menos aparentemente, mais forte nos tubos contornados proximais dos animais controlo, enquanto nos animais GIR essa marcação mais evidente se verificou ao nível dos glomérulos. O papel das proteínas de choque térmico na auto-imunidade foi objecto de estudo de vários autores, tal como a relação entre as Hsp70 e a diabetes (Elias *et al.*, 1991). As diferenças observadas sugerem uma resposta celular induzida por uma série de condições que afectam os processos homeostáticos e incluem alterações no estado fisiológico provocadas pelo *stress* associado à DT2. Este aumento de HSP70 nos animais GIR pode reflectir uma resposta ao aumento do *stress* oxidativo, visto que a síntese de Hsp70 é aumentada em resposta ao *stress* oxidativo (Yabunaka *et al.*, 1995).

Relativamente à expressão das metalotioneínas (MTs) observou-se uma forte marcação nos tubos contornados proximais, ao nível do núcleo e do citoplasma, dos animais controlo, enquanto, pelo menos aparentemente, essa marcação pareceu ligeiramente diminuída nos animais GIR. Em conjunto, os resultados evidenciam uma maior expressão das MTs no grupo controlo comparativamente com os animais do grupo GIR. Alguns estudos têm revelado que a elevada presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na DT2, pode provocar um desequilíbrio na oxidação/redução celular e uma diminuição das defesas antioxidantes, incluindo uma alteração na capacidade de síntese de MTs com reflexos nos mecanismos envolvidos na filtração, reabsorção e secreção renal nas diferentes partes dos tubos contornados (Seghrouchni *et al.*, 2002). Deste modo, os nossos resultados sugerem o sistema de defesa antioxidante providenciado pelas MTs pode já estar comprometido num estado precoce do desenvolvimento da DT2.

Na nefropatia diabética a alteração mais precoce é o espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares. Simultaneamente, verifica-se uma esclerose glomerular progressiva, caracterizada por expansão mesangial. A expansão mesangial progressiva causa o colapso dos capilares glomerulares e a área de filtração declina proporcionalmente (Faria, 2001).

A alteração mais precoce na nefropatia diabética é o espessamento da membrana basal dos capilares dos glomérulos, mas a microscopia óptica não revela essas alterações devendo recorrer-se à microscopia electrónica (Tyagi *et al.*, 2008) ou a outros indicadores dessas alterações. Sabe-se, por outro lado, que se instala uma esclerose glomerular progressiva, caracterizada por expansão mesangial celular (Yang *et al.*, 1998). Ainda que não muito evidente em todos os glomérulos, observámos algumas células mesangiais positivas para a actina o que pode indiciar o início do desenvolvimento de alterações nessa estrutura, o que é reforçado com o facto de não termos encontrado infiltrados inflamatórios nem fibroblastos positivos para a actina. Sabe-se que na nefropatia diabética a proliferação/ativação das células mensangiais, danos tubulares e a regeneração bem como a fibrose intersticial têm sido associados com a neoexpressão da actina (Sanai *et al.*, 2000). Adicionalmente foi observado que as células dos tubos contornados que expressam  $\alpha$ SMA, consideradas como resultado de transdiferenciação do epitélio mesenquimal, estão associadas aos miofibroblastos intersticiais na glomerulonefrite humana grave (Jinde *et al.*, 2001).

Nas nossas observações não detetamos isquemia túbulo-intersticial, hipertrofia e fibrose. Esta fibrose, a que corresponde a expansão da matriz extracelular no glomérulo e nos tubos, é uma característica da nefropatia diabética (Permegiani, 2010). Deste modo, e conjugando com os dados bioquímicos, os nossos resultados sugerem uma tendência para alterações estruturais, ainda não muito acentuadas, nos animais GIR, pelos que seria interessante o recurso à microscopia electrónica e a avaliação da expressão de macrófagos, de proteínas da matriz extracelular (colagénio e fibronectina) e de proteínas da membrana basal (laminina e colagénio IV).

No que respeita aos parâmetros bioquímicos usados como medidores de função renal, na maioria dos parâmetros não se observaram diferenças significativas entre controlos e GIR. No entanto, registou-se um aumento nos níveis de ácido úrico na urina e uma diminuição dos níveis de creatinina sérica. Estas alterações foram acompanhadas de uma tendência para o aumento de clearance destas substâncias nos GIR, embora a diferença registada não tenha sido estatisticamente significativa, o que se pode dever ao baixo número de animais por grupos e à grande variabilidade que estes parâmetros podem apresentar. Os resultados aqui apresentados sugerem alterações incipientes de clearance consistentes com as que se observam tradicionalmente na diabetes. Níveis elevados de ácido úrico sérico também podem ser encontrados em diversas patologias incluindo a insuficiência renal.

Estes resultados mostram que a função renal dos GIR permanece normal apesar das alterações morfológicas identificadas, sugerindo que estas últimas podem constituir alterações prévias ao desenvolvimento de patologia renal. O facto de terem sido identificadas em animais intolerantes à glicose, sugerem ainda que podem constituir alterações características dos pré-diabéticos que poderão contribuir para um aumento de susceptibilidade do mesmo ao *stress* e para o desenvolvimento de nefropatia diabética.

## 6. Conclusão

Este trabalho apresenta um estudo comparativo efectuado ao nível da morfologia, expressão de proteínas relacionadas com a resposta ao *stress* e funções renais. Os resultados obtidos permitem concluir que:

- i) Os animais GIR apresentam glicemia em jejum mais elevados que os controlo, embora dentro do intervalo normal;
- ii) Provas de tolerância à glicose oral nos GIR apresentam valores significativamente alteradas, indicando que estes animais sofrem de intolerância à glicose;
- iii) Os dados dos pontos i) e ii) que os GIR se encontram num estado pré-diabético;
- iv) A análise sumária da urina não indicou nenhuma alteração que pudesse sugerir estados patológicos;
- v) Nos dados histomorfométricos não se observaram diferenças significativas entre os grupos controlo e GIR
- vi) Os resultados sugerem possíveis alterações nas proteínas de *stress*, proteínas de choque térmico e metalotioneínas;
- vii) Não se registaram diferenças significativas nos níveis de ureia ou da sua clearance;
- viii) Observou-se um aumento dos níveis de ácido úrico na urina dos GIR;
- ix) Ocorreu uma diminuição dos níveis séricos de creatinina nos GIR;
- x) Estas variações referidas nos pontos viii) e x) foram acompanhadas de uma tendência de aumento de clearance, muito embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas;
- xi) A função renal não parece estar comprometida nos GIR.

Em suma, os resultados no seu conjunto sugerem que ocorrem alterações morfológicas da cápsula e do glomérulo no rim em situações de intolerância à glicose, condições prévia à diabetes.

Embora, estas alterações parecem não condicionar a função renal, quando correlacionadas com as alterações concomitantes de expressão de HSP e MTs, e actina sugerem que, os GIR poderão estar mais susceptíveis ao desenvolvimento de insuficiência renal em situações de *stress* que os controlos.

Estas alterações precoces poderão, pois, contribuir para o desenvolvimento de patologia renal comumente observado em indivíduos diabéticos.

## 7. Bibliografia

- ADA - American Diabetes Association (1997) The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **20**: 1183-1197.
- ADA - American Diabetes Association (2004) Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 29 **Suppl 1**: S43-48.
- ADA - American Diabetes Association (2007) Nephropathy screening and treatment. *Diabetes Care*. 30 **Suppl 1**: S19-21.
- Alberti KG, Zimmet PZ. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*. **15**: 539–553.
- Alberti KG. (1998) Impaired glucose tolerance: what are the clinical implications. *Diabetes Research and Clinical Practice* **40** Suppl, S3-S8.
- Andrews, (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* **59**:95–104.
- Cai L, Chen S, Evans T, Cherian MG, Chakrabarti S, (2002) Endothelin-1-mediated alteration of metallothionein and trace metals in the liver and kidneys of chronically diabetic rats. *Int J Experimental Diabetes Res.*, **3**:193–198.
- Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderón-Aranda ES, Manno M, Albores A. (2001) Stress Proteins Induced by Arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* **177**: 132-148.
- Faria JBL de (2001) Atualização em fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética. *J Bras Nefrol* 23: 121-129.
- Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, Mesquita AC, Fona C, Carvalho R, Massano-Cardoso S. (2010) First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabetic Medicine* **27**: 879–881.
- Goering PL. (1995) Stress Proteins: Molecular biomarkers of chemical exposure and toxicity. In Butterworth F.M., Corkum L.D. e Guzman-Rincon J. (eds) *Biomarkers and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York: 217-227.
- Goldberg ME, Guillou Y. (1994) Native disulfide bonds greatly accelerate secondary structure formation in the folding of lysozyme. *Protein Science* **3**: 883-887.

- Gonçalves C (2006) Aparelho urinário. In Gonçalves C, Bairos V (Eds) *Histologia, Texto e Imagens*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, pp. 301-318.
- Guillausseau PJ, Meas T, Virally M, Laloi-Michelin M, Medeau V, and Kevorkian JP. 2008. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism* **34** Suppl 2: S43-48.
- Guyton AC and Hall JE. (2006) *Medical Physiology*, 11th edition, chapter 26. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Hamman RF. (1992) Genetic and environmental determinants of non insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* No.8 287-338
- Hidalgo J, Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Molinero A: ( 2002) Metallothionein expression and oxidative stress in the brain. *Methods Enzymol* **348**:238–249,
- Holt Richard I G, Cockram Clive, Flyvbjerg Allan, Goldstein Barry J, (2010). *Textbook of Diabetes*. Fourth Edition. Willey-black Well
- Hooper PL. (2003) Diabetes, nitric oxide and heat shock proteins. *Diabetes Care* **26**: 951-952.
- Hooper PL, Hooper PL. (2009) Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. *Cell Stress and Chaperones* **14**: 113-115.
- Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR, Sakai H, Kurokawa K, Atkins RC, Lan HY. (2001) Tubular phenotypic changes in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *American Journal of Kidney Disease* 2001; **38**: 761-769.
- Leite MF (2006) Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas. *Fac Odon Univ S.Paulo* 19-31
- Li X, Cai L, Feng W. (2007) Diabetes and metallothionein. *Medicinal Chemistry* **7**: 761-768.
- Locke, M.; Noble, E. G.; Atkinson, B. G. (1990) Exercising mammals synthesize stress proteins. *American Journal of Physiology*, **258**: C723-C729.
- Mahler RJ, Adler ML. (1999) Type 2 Diabetes Mellitus: Update on Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**: 1165-1171.

- Meyer T. N., A. L. da Silva. (1999) Resposta celular ao estresse. *Rev Ass Med Brasil*; 45(2): 181-8
- Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V: (2000) Induction, regulation degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:35–70, 2000
- Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C. (1994) *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Paiva C. (2001) Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. *Medicina Interna* Vol.7 No.4 234-238
- Permegiani J. M., (2010). The effect of long-term dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment on renal function and metabolism in diabetic rats. Universidade federal do rio grande do sul, 2010.
- Pollom RD (2009) Importance of daily plasma glucose control in type 2 diabetes. *The Journal of Family Practice* 58 Suppl 8: S10-S17
- Quintas Alexandre, Freire Ponces Ana, Halpern J Manuel.(2008) *Bioquímica: Organização Molecular da Vida*. Copyright
- Rausser EE. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**: 19-48.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: A summary of a Congress series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev.*; **17**:189–212
- Sanai T, Sobka T, Johnson T, El-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Gharbia OB, Oldroyd S, El Nahas AM. (2000) Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* **43**: 91-100.
- Sanders BM, Goering PL, Jenkins K. (1996) The role of general and metal-specific cellular responses in protection and repair of metal-induced damage: stress proteins and metallothioneins. In Chang L.W. (ed) *Toxicology of Metals*. CRC Press, Boca Raton: 165-187.

- Schneider H, Shaw J, Zimmet P. (2003) Guidelines for the detection of diabetes mellitus - diagnostic criteria and rationale for screening. *Clin Biochem Rev* Aug;24(3):77-80.
- Schrijvers BF, De Vriese AS, de Voorde JV, Rasch R, Lameire NH, Allan Flyvbjerg A. (2004) Long-term renal changes in the Goto–Kakizaki rat, a model of lean type 2 diabetes. *Nephrology Dialysis Transplantation* **19**: 1092-1097.
- Seiça RM, Martins MJ, Pessa PB, Santos RM, Rosario LM, Suzuki KI, and Martins MI. (2003) Morphological changes of islet of Langerhans in an animal model of type 2 diabetes. *Acta Medica Portuguesa* **16**: 381-388.
- Silver S, Phung LT. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology* **50**: 753-789.
- Tatón J, Czech A, Piatkiewicz P. (2010) Insulin as the main regulator of cellular glucose utilization – aetiological aspects of insulin resistance. *Polish J Endocrinology* Vol.61 No.4 388-394.
- Tyagi I, Agrawal U, Amitabh V, Jain AK, Daxena S. (2008) Thickness of glomerular and tubular basement membranes in preclinical and clinical stages of diabetic nephropathy. *Indian Journal of Nephrology* **18**: 64-69.
- Valls M, Bofill R, Romero-Isart N. (2000) Drosophila MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms. *FEBS Letters* **467**: 189-194.
- Vernillo AT. (2001) Diabetes mellitus: Relevance to dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* Mar;91(3):263-70.
- Viarengo A, Burlando B, Dondero F. (1999) Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* **4**: 455-466.
- Voet D, and Voet JG (2004). *Biochemistry*, John Wiley and Sons, inc, 3rd ed.
- Welch WJ. (1992) Mammalian stress response: cell physiology structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*, **72**: 1063-1081.
- WHO (1999) Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of a WHO Consultation.

- WHO - World Health Organization (2011) Health topics: Diabetes [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/en/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/) (consultado em Agosto de 2011)
- Yabunaka N., Yoshinori O., Ichiro W., Hiroshi N., Hiroyuki F., Yuko A. (1995) Elevated levels of heat-shock protein 70 (HSP70) in the mononuclear cells of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* **30**:143-147
- Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Yang WC, Mu W, Gilbert RE, Cooper ME, Atkins RC, Lan HY. (1998) Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation* **13**: 1967-1974.
- Young B, Heath JW. (2000) Wheater's Functional Histology, A Text and Colour Atlas. 4th Edition. Elsevier.
- Yonemoto S, Machiguchi T, Nomura K, Minakata T, Nanno M, Yoshida H. (2006) Correlations of tissue macrophages and cytoskeletal protein expression with renal fibrosis in patients with diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Nephrology* **10**: 186-192.

## 8. Anexos

Anova: factor único

### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	6	29,81	4,97	0,78
Gir	6	26,85	4,48	1,12

### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,73	1	0,73	0,77	0,40	4,96
Dentro de grupos	9,52	10	0,95			
Total	10,25	11				

**Tabela 1:** ANOVA. Comparação entre os grupos controlo e GIR das concentrações de Ureia nas amostras do soro, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	6	151,28	25,21	54,49
Gir	5	125,68	25,14	6,16

### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,016	1	0,016	0,00049	0,98	5,12
Dentro de grupos	297,11	9	33,012			
Total	297,12	10				

**Tabela 2:** ANOVA. Comparação entre os grupos controlo e GIR das concentrações de Ureia nas amostras de Urina, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

#### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
controle	6	1,76	0,29	0,011
Gir	5	1,62	0,32	0,021

#### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0027	1	0,0027	0,17	0,69	5,12
Dentro de grupos	0,14	9	0,016			
Total	0,14	10				

**Tabela 3:** ANOVA. Comparação entre os grupos Controle e GIR da Clearance da ureia, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

#### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controle	6	308,33	51,39	120,46
GIR	6	335	55,83	289,72

#### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	59,26	1	59,26	0,29	0,603	4,96
Dentro de grupos	2050,93	10	205,093			
Total	2110,19	11				

**Tabela 4:** ANOVA. Comparação entre os grupos controle e GIR das concentrações do Ácido Úrico nas amostras do soro, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

#### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	6	3966,67	661,11	107185,2
GIR	5	5783,33	1156,67	135361,1

#### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	669750,84	1	669750,8	5,59	0,042	5,12
Dentro de grupos	1077370,37	9	119707,8			
Total	1747121,21	10				

**Tabela 5:** ANOVA. Comparação entre os grupos controlo e GIR das concentrações do Ácido Úrico nas amostras da Urina, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

#### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Controlo	6	4,31	0,72	0,081
GIR	5	5,95	1,19	0,37

#### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,61	1	0,61	2,90	0,12	5,12
Dentro de grupos	1,89	9	0,21			
Total	2,50	10				

**Tabela 6:** ANOVA. Comparação entre os grupos Controlo e GIR da Clearance do Ácido úrico, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
controle	6	588,67	98,11	51,85
GIR	6	415,33	69,22	678,52

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2503,70	1	2503,70	6,86	0,026	4,96
Dentro de grupos	3651,85	10	365,19			
Total	6155,56	11				

**Tabela 7:** ANOVA. Comparação entre os grupos controle e GIR das concentrações da Creatinina nas amostras do Soro, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
controle	6	50,67	8,44	34,91
GIR	5	64,17	12,83	76,94

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	52,53	1	52,53	0,98	0,35	5,12
Dentro de grupos	482,31	9	53,59			
Total	534,85	10				

**Tabela 8:** ANOVA. Comparação entre os grupos controle e GIR das concentrações da Creatinina nas amostras da urina, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
controle	6	23,15	3,86	5,0049
GIR	5	29,23	5,85	10,29

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	10,79	1	10,79	1,47	0,26	5,12
Dentro de grupos	66,20	9	7,36			
Total	76,99	10				

**Tabela 9:** ANOVA. Comparação entre os grupos Controle e GIR da Clearance da Creatinina, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
controle	6	6,08	1,013	3,67E-05
GIR	6	6,07	1,012	6,67E-06

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	8,333E-06	1	8,3333E-06	0,38	0,55	4,96
Dentro de grupos	0,00022	10	2,1667E-05			
Total	0,00022	11				

**Tabela 10:** ANOVA. Comparação entre os grupos Controle e GIR da densidade da urina não centrifugada, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

#### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
controle	6	35	5,83	0,57
GIR	6	40	6,67	0,27

#### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,083	1	2,083	5	0,049	4,96
Dentro de grupos	4,17	10	0,42			
Total	6,25	11				

**Tabela 11:** ANOVA. Comparação entre os grupos Controle e GIR do pH da urina não centrifugada, para intervalo de confiança de 95%.

Anova: factor único

#### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
C	6	479	79,83	28,97
GIR	6	535	89,17	35,77

#### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	261,33	1	261,33	8,074	0,02	4,96
Dentro de grupos	323,67	10	32,37			
Total	585	11				

**Tabela 12:** ANOVA. Comparação entre os grupos Controle e GIR da curva de tolerância à glicose oral, para intervalo de confiança de 95%.