

EDUARDO HOMSI

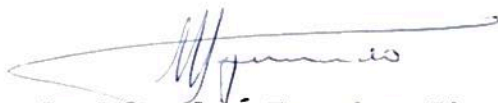
**EFEITOS DA NIFEDIPINA E DO ANTAGONISTA DE RECEPTOR DE PAF
(BN 52021) SOBRE A FUNÇÃO TUBULAR RENAL NA INSUFICIÊNCIA
RENAL AGUDA INDUZIDA POR GLICEROL EM RATOS**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Medicina.**

UNICAMP 1994

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Medicina do médico EDUARDO HOMSI.

Campinas, 27 de setembro de 1994.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. F. Figueiredo', with a long horizontal stroke extending to the right.

Prof.Dr. José Francisco Figueiredo
Orientador

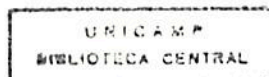
EDUARDO HOMSI

**EFEITOS DA NIFEDIPINA E DO ANTAGONISTA DE RECEPTOR DE PAF
(BN 52021) SOBRE A FUNÇÃO TUBULAR RENAL NA INSUFICIÊNCIA
RENAL AGUDA INDUZIDA POR GLICEROL EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de Doutor em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

UNICAMP 1994



Aos meus pais: William e Maiby

Aos meus irmãos Luiz e Carlos

À minha filha Camila

À Lucia e Bruna

Dedico :

Ao meu pai, William Homsí Elias, por todo carinho que me dispensou ao longo da minha vida e pela importância fundamental que teve na minha formação médica, ao ser meu professor durante os cursos de Propedêutica e Clínica Médica na Escola Paulista de Medicina.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Francisco Figueiredo, orientador desta tese, pela amizade, ensinamentos, incentivo e confiança.

Aos colegas Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia e Dra. Eliana Pires Oliveira Dias, pela permanente participação e apoio durante todos os trabalhos experimentais e laboratoriais. Às colegas do Núcleo de Medicina Experimental que ajudaram sempre que solicitadas: biomédicas Fabiana Sampaio A. de Paula e Marlene dos Santos Vilela.

Aos demais professores da Disciplina de Nefrologia da FCM UNICAMP pela ajuda, incentivo e amizade: Prof. Dr. Gentil Alves Filho, Prof. Dra. Maria Almerinda Ribeiro Alves, Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria, Dra. Marilda Mazzali e ao médico Dr. Rodrigo Surita.

Ao Departamento de Anatomia-Patológica, em particular à Dra. Izilda pela criteriosa e trabalhosa avaliação histológica.

Ao Departamento de Patologia Clínica pelo apoio nas dosagens laboratoriais.

À Disciplina de Medicina Interna da FCM UNICAMP por ceder seu laboratório e, em particular à Sra. Conceição A. Silva pelo empenho nas dosagens bioquímicas.

Ao Prof. Dr. Nestor Schor por ter cedido o BN 52021 utilizado em nosso trabalho.

À Comissão de Pós-Graduação da FCM UNICAMP, particularmente à Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela pelo apoio e confiança.

Ao Gustavo Ribeiro Alves pela acessoria em informática.

ÍNDICE

Página

1. Resumo.....	1
2. Introdução.....	2
2.1 Alterações hemodinâmicas na IRA induzida por glicerol.....	6
2.2 Fisiopatologia na IRA induzida por glicerol.....	8
2.3 Sistemas Vasoativos na IRA induzida por glicerol.....	14
2.4 Necrose tubular na IRA induzida por glicerol.....	22
2.5 Função tubular na IRA induzida por glicerol.....	27
3. Objetivos.....	29
4. Material e Métodos.....	31
4.1 Animais de experimentação.....	32
4.2 Indução da IRA.....	32
4.3 Estudo funcional em gaiolas metabólicas.....	32
4.4 Grupos experimentais.....	33
4.5 Série I.....	33
4.6 Série II.....	34
4.7 Série III.....	35
4.8 Série III A.....	37
4.9 Série III B.....	38
4.10 Série III C.....	39
4.11 Dosagens laboratoriais.....	40
4.12 Cálculo dos parâmetros funcionais.....	41
4.13 Avaliação histológica.....	44
4.14 Análise estatística.....	44
5. Resultados.....	46
5.1 Série I.....	47
5.2 Série II.....	50
5.3 Série III.....	59
5.4 Série III A.....	67
5.5 Série III B.....	68
5.6 Série III C.....	70
6. Discussão.....	72
6.1 Série I.....	73
6.2 Estudo da função tubular.....	74
6.3 Série II.....	79
6.4 Série III-Alterações funcionais e histológicas.....	83
6.5 Série III-Mecanismos de ação das drogas.....	87
6.6 Séries B e C.....	93
7. Conclusões.....	95
8. Bibliografia.....	97
9. Apêndice.....	112

RESUMO

RESUMO

A falência de filtração na Insuficiência Renal Aguda induzida por glicerol (IRA-GLI) é mantida, principalmente, por aumento da resistência arteriolar aferente e redução equivalente da resistência arteriolar eferente. Essas alterações hemodinâmicas determinam queda da pressão hidrostática no capilar glomerular e, portanto, da pressão de ultrafiltração.

A expansão salina e o bloqueio de diferentes sistemas vasoativos na fase inicial da IRA-GLI são capazes de atenuar a redução da filtração glomerular. Trabalhos anteriores demonstraram essa ação com a utilização tanto de diltiazem (bloqueador de canal de cálcio) quanto de BN 52021 (antagonista de receptor de PAF).

Em nosso trabalho avaliamos a ação da nifedipina (20mg/kg de rato) e do BN 52021 (1 mg/kg de rato) tanto sobre a filtração glomerular quanto sobre a função tubular na IRA-GLI em ratos, utilizando a técnica de clearance de lítio. Esta técnica permite o cálculo da reabsorção tubular fracional proximal e distal de sódio.

Induzimos a IRA através da injeção intra-muscular de glicerol a 50% (5 ml/kg de rato), precedida de jejum de 12 horas. Antes do estudo funcional administrávamos expansão hídrica correspondente a 10% do peso corporal dos ratos. Os testes funcionais foram repetidos às 3, 6, 12 e 24 horas após a indução da IRA. Com esta metodologia obtivemos forma não oligúrica de IRA. O clearance de creatinina apresentou redução progressiva, com nadir no estudo realizado com 24 horas de evolução, quando atingiu valor correspondente a 29 % do controle. Houve queda acentuada e precoce

da reabsorção fracional proximal de sódio. O acometimento tubular distal foi discreto.

Observamos prevenção parcial da falência de filtração glomerular com ambos os tratamentos. O clearance de creatinina 24 horas após a indução da IRA foi significativamente maior nos animais tratados comparados ao grupo não tratado. O BN 52021 não alterou a queda da reabsorção tubular fracional proximal, enquanto a nifedipina preservou parcialmente esta função tubular.

Concluimos que na IRA-GLI o segmento tubular mais acometido é o proximal e que as duas drogas utilizadas mostraram capacidade de proteção funcional neste modelo. Porém, apenas a nifedipina preservou parcialmente a reabsorção fracional proximal de sódio e, portanto, diminuiu a lesão tubular proximal.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Durante a 2ª Guerra Mundial houve grande avanço no conhecimento da insuficiência renal aguda (IRA), devido ao grande número de casos registrados. Entre as observações clínicas mais importantes, destaca-se a de Bywaters e Beal (1) que, em 1941, descreveram a associação entre lesão da musculatura esquelética esmagada em desmoronamentos após bombardeio aéreo em Londres e insuficiência renal aguda. Os autores notaram que a lesão renal era encontrada nos túbulos, com alterações necróticas ao nível proximal e depósito de cilindros pigmentados e restos celulares nos túbulos distais. Relacionaram as lesões renais com a liberação de mioglobina da musculatura lesada. Posteriormente, reproduziram a lesão renal, em animais de laboratório, injetando soluções contendo mioglobina (2).

Desde então, os modelos experimentais que induzem à insuficiência renal aguda, através de mioglobinúria ou hemoglobinúria, têm sido amplamente empregados no estudo desta síndrome (3,4,5). A injeção intramuscular de glicerol a 50% em ratos, destacou-se como o modelo mais empregado e mais representativo das formas clínicas de insuficiência renal aguda. Thiel e col.(6) demonstraram que a privação de água e consequente desidratação por 24 horas antes da injeção de glicerol em ratos, permitia o surgimento de alterações funcionais renais na totalidade dos animais estudados. De maneira adversa a resposta funcional em ratos hidratados era bastante variável, sendo que apenas 56% desenvolviam graus variados de uremia.

Na patogênese da insuficiência renal aguda induzida por glicerol (IRA-GLI) interagem alterações hemodinâmicas e as ações

nefrotóxicas da mioglobina (liberada pelo tecido muscular) e da hemoglobina (resultante da hemólise) (7).

1. Alterações hemodinâmicas na IRA induzida por glicerol

Na maioria dos estudos que utilizam o modelo glicerol os animais são submetidos a privação de água por 12 a 24 horas antes da injeção intramuscular de glicerol. Além disso, a lesão muscular provoca transudação de líquido do intravascular para o tecido muscular, onde é sequestrado. Thiel e col (6) observaram redução no volume plasmático de 5.5 ml/100g para 4.4 ml/100g em ratos submetidos a jejum por 24 horas, utilizando técnica de albumina marcada com iodo isotópico. Em outro grupo de animais injetaram glicerol 10 ml/kg intramuscular e encontraram volemia de 3.4 ml/100g. Em consequência da redução da volemia, surge redução do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo renal (8). Por outro lado, a pressão arterial sistêmica dos animais permanece normal sugerindo aumento da resistência vascular periférica (8,9,10).

Utilizando técnica de medida de fluxo plasmático renal e débito cardíaco através de microesferas radioativas, Hsu e col.(8) notaram, 3 horas após a injeção de glicerol, redução de 64% do débito cardíaco e de 80% do fluxo plasmático renal. Após expansão volêmica com plasma, em um volume equivalente a 3% do peso corporal, houve recuperação parcial do débito cardíaco (70% do controle) e normalização do fluxo renal. Kishimoto e col.(9) utilizando a mesma técnica notaram também redução do débito cardíaco e fluxo renal tanto às 3 horas quanto às 10 horas após injeção de glicerol. A queda do débito cardíaco e do fluxo plasmático renal foi mais

acentuada 10 horas após a injeção de glicerol (respectivamente 47% e 62%).

Os primeiros estudos sobre o fluxo sanguíneo renal no modelo glicerol (10,11) demonstraram redução sustentada do fluxo cortical renal, desde as primeiras horas, até 24 horas após a injeção, mesmo com os animais tendo livre acesso à água após a injeção do glicerol. A metodologia de estudo do fluxo plasmático renal era baseada na inalação de gases e mensuração de seu desaparecimento no córtex renal, que possuía eletrodos implantados com este objetivo. Vários estudos subsequentes (8,12,13) utilizando técnica de injeção de microesferas radioativas contestaram os achados iniciais, demonstrando queda do fluxo plasmático renal global e cortical, somente na fase inicial do modelo glicerol, com normalização do fluxo, porém não da filtração glomerular após 24 horas de evolução. A discrepância dos resultados entre as duas técnicas foi atribuída ao aumento da massa renal na evolução da IRA. Tal fato levaria a subestimação das medidas ao ser utilizada a técnica inalatória. Churchill e col.(14) modificaram detalhes desta técnica, apresentaram os resultados corrigidos por grama de tecido renal e encontraram queda de 50% do fluxo sanguíneo renal 4 horas após a injeção de glicerol e de apenas 10% às 24 horas.

Reineck e col.(15) utilizando monitorização do fluxo renal através de fluxômetro eletromagnético implantado na artéria renal esquerda de ratos, observaram queda do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular às 3, 6, 12 e 18 horas após a injeção de glicerol (não precedida de jejum). Após as medidas em condições basais os ratos foram submetidos a expansão intravenosa utilizando solução de Ringer, em um volume equivalente a 5 a 10% do peso corporal, com taxa de infusão de 1 ml/minuto e notaram normalização do fluxo renal em todos os grupos. Com relação à

filtração glomerular notaram normalização nos períodos iniciais (3 e 6 horas) e manutenção de redução significativa nos períodos subsequentes. Estudo do mesmo laboratório confirmou os dados anteriores, demonstrando recuperação do clearance de inulina, após expansão salina entre 3 e 6 horas após a injeção de glicerol e ausência desta resposta quando a mesma infusão foi realizada em 18 a 20 horas após a injeção de glicerol (16). Utilizando volume inferior de salina (3% do peso corporal), Kurtz e col.(13) observaram recuperação parcial do fluxo sanguíneo cortical renal, assim como do clearance de creatinina 3 horas após a injeção de glicerol.

Estes dados demonstraram que nas primeiras horas a queda da filtração glomerular no modelo glicerol é volume dependente e que na evolução da lesão renal outros fatores que não a queda do fluxo sanguíneo renal mantêm a queda da filtração glomerular. Após as primeiras 6 horas mecanismos intrarenais são responsáveis pela manutenção da reduzida filtração glomerular. A falência da filtração irá persistir por 5 a 7 dias, quando inicia-se a fase de recuperação funcional (17).

2. Fisiopatologia na IRA induzida por glicerol

Os possíveis mecanismos envolvidos na queda da filtração glomerular, no período de manutenção da IRA-GLI, são comentados a seguir.

2.1 Obstrução tubular

Oken e col.(4), em 1966, publicaram importante estudo funcional da IRA-GLI utilizando técnica de micropunção. A medida da filtração glomerular por néfron e do fluxo tubular só foram possíveis nos néfrons mais preservados de ratos não desidratados previamente. Mesmo selecionando os túbulos menos lesados observaram reduções significativas do clearance de inulina por néfron (14.7 nl/min vs 43 nl/min) e de fluxo tubular proximal (7 nl/min vs 17 nl/min), em relação ao controle. Os ratos previamente desidratados apresentavam colapamento dos túbulos e ausência de filtração na maioria dos néfrons, impedindo a avaliação quantitativa destes parâmetros. Nas primeiras 4 horas, após a injeção intramuscular de glicerol, a pressão intratubular caiu em relação ao controle, principalmente nos ratos previamente desidratados (4.8 cm H₂O versus 15 cm H₂O). A pressão intratubular obtida 18 a 26 horas após a injeção de glicerol ainda era reduzida (10.5 cm H₂O). Como a pressão intratubular, mesmo com a presença de cilindros, era sempre menor que o controle, os autores concluíram que a presença dos cilindros era consequência, ao invés de causa da falência da filtração glomerular.

Cushner e col.(16) mediram a pressão intratubular, através de micropunção, na IRA-GLI em ratos não desidratados. Encontraram pressões equivalentes aos controles, tanto 3-6 quanto 18-20 horas após a injeção de glicerol. Estudaram o efeito da infusão intravenosa aguda de 25 ml de solução de Ringer (1 ml/min.) sobre a pressão intratubular. Após esta infusão, notaram maior aumento da pressão intratubular nos ratos com IRA-GLI do que nos ratos controles. Baseado nestes dados concluíram pela participação da obstrução intratubular na manutenção da IRA-GLI,

principalmente no período tardio (18-20 horas), quando a expansão volêmica não resultou em melhora do clearance de inulina.

Wolfert e col.(18) não encontraram aumento na pressão medida no espaço de Bowman em ratos euvolêmicos com IRA-GLI. Também não observaram correlação entre a pressão no espaço de Bowman e a filtração glomerular por néfron.

Manobras que aumentam o fluxo urinário por todo o néfron como sobrecarga salina (16,19), manitol (21) e denervação renal (22) conferem proteção na IRA-GLI. Embora o mecanismo de proteção não seja totalmente conhecido, é razoável supor que o maior fluxo urinário diminuiria a extensão dos depósitos de cilindros que levariam à obstrução tubular.

Em outros modelos nos quais a obstrução tem papel relevante, a pressão intratubular está sempre aumentada e independe de expansão salina aguda prévia para ser observada (23). No modelo glicerol a importância das obstruções tubulares é secundária. Outros mecanismos parecem ser mais importantes na manutenção da reduzida filtração glomerular, após a normalização do fluxo sanguíneo renal.

2.2 Retrodifusão

A retrodifusão de ultrafiltrado glomerular através dos túbulos lesados por necrose tubular, importante em outros modelos de IRA (24), não encontra suporte experimental na IRA induzida por heme pigmentos. Estudos de microinjeção de inulina radioativa e outros solutos marcadores de permeabilidade tubular, em túbulos proximais de ratos lesados por injeção de metahemoglobina, demonstraram apenas pequena redução da sua recuperação em sítios distais do néfron, sugerindo mínima participação da

retrodifusão na fisiopatogenia deste modelo (25). A taxa de filtração glomerular por néfron, medida na junção glomérulo-tubular (espaço de Bowman), independe do trânsito de ultrafiltrado pelos túbulos. No modelo IRA-GLI demonstrou-se que a medida da taxa de filtração glomerular na junção glomérulo-tubular tem valor igual ao clearance de inulina por néfron, obtido através de coleta de ultrafiltrado nos túbulos (18). A concordância destas duas técnicas de medir a filtração glomerular por néfron só é possível na ausência de retrodifusão.

2.3 Hemodinâmica glomerular e coeficiente de ultrafiltração (Kf)

Hsu e col.(26), utilizando injeção de microesferas radioativas, encontraram redução significativa do diâmetro das arteríolas aferentes 24 horas após a injeção glicerol. Ao mesmo tempo, a resistência vascular renal dos ratos era normal. Para conciliar estes achados, os autores sugeriram que haveria, ao lado de aumento da resistência arteriolar aferente, redução concomitante e proporcional da resistência arteriolar eferente. Esse achado demonstrou o papel da vasoconstrição pré-glomerular na fisiopatogenia da IRA-GLI, inclusive nas fases mais avançadas, quando a resistência vascular renal e o fluxo renal estão normalizados.

O importante trabalho de hemodinâmica glomerular na IRA-GLI em ratos euvolêmicos, de Wolfert e col.(18), mostrou 24 horas após a injeção de glicerol que cerca de 50% da população de túbulos estavam colapsados, como notado nos estudos pioneiros de Oken e col.(4). A filtração glomerular dos néfrons filtrantes foi bastante variável, mas em média muito reduzida, às custas de redução na pressão hidrostática no capilar glomerular. Infelizmente, no modelo glicerol, a grande heterogeneidade dos valores de

filtração glomerular observados inter-néfrons, não permite relacionar a pressão oncótica da arteríola eferente (colhida de vaso não obrigatoriamente relacionado ao glomérulo estudado) com os vários outros dados hemodinâmicos obtidos pela micropunção. Sem este parâmetro, valores definitivos de coeficiente de ultrafiltração (K_f), pressão líquida de ultrafiltração e fração de filtração por néfron não podem ser calculados. Não se obtendo o valor da fração de filtração por néfron (SNFF), tornou-se inviável o cálculo do fluxo sanguíneo glomerular aferente e eferente. Por sua vez, sem estes parâmetros, não se calculam as resistências arteriolares aferente e eferente. Porém, dados deste mesmo trabalho mostram, no período de estudo (24 horas após a injeção de glicerol), fluxo sanguíneo global renal normal e pressão arterial sistêmica normal e, portanto, fluxo sanguíneo para cada glomérulo provavelmente normal. O fluxo sanguíneo glomerular depende da soma das resistências arteriolares aferente e eferente, que deve ser a mesma encontrada em ratos normais para ser compatível com a manutenção de fluxo sanguíneo normal. Partindo dos valores de pressão arterial média, pressão do capilar glomerular e pressão dos vasos eferentes, os autores puderam estimar os valores limites da relação entre resistência arteriolar aferente e eferente (R_a/R_e). Consideraram limites a ausência de filtração (SNFF=0) e o valor máximo obtido para fração de filtração, medida com albumina bovina marcada, em estudo preliminar no mesmo modelo (SNFF=0.21). Este cálculo mostrou taxa de R_a/R_e entre 3.5 e 3.0. Estes valores são 2.2 e 1.9 vezes superiores à taxa de R_a/R_e em controles. Considerando que a soma de R_a e R_e (resistência vascular renal global) não está alterada na fase de manutenção da IRA-GLI e que a taxa R_a/R_e está claramente aumentada, concluiu-se que a baixa pressão hidrostática no capilar glomerular, responsável pela falência de

filtração neste modelo, reflete aumento na resistência aferente (R_a) e comparável queda na resistência eferente (R_e). Ainda neste trabalho, os autores encontraram correlação positiva entre a pressão líquida de ultrafiltração aferente e a taxa de filtração glomerular por néfron. A partir da equação da regressão, estimaram a filtração glomerular que seria obtida com a pressão de ultrafiltração encontrada em ratos normais, e o valor encontrado sugeriu que, nos ratos com IRA-GLI, o K_f possa estar reduzido em cerca de 40%. Tal queda no K_f levaria a uma queda de 10% da filtração glomerular em ratos normais. Esta queda do K_f quando sobreposta a um aumento na taxa de R_a/R_e , da magnitude da observada na IRA-GLI, tem mínimo efeito sobre a filtração glomerular.

Dach e col (27) estudaram as alterações morfológicas glomerulares através de microscopia eletrônica em ratos controles, ratos que receberam infusão intravenosa de angiotensina II e ratos que receberam glicerol intramuscular, na fase precoce do modelo e 24 horas após a injeção. Notaram constrição e estreitamento das alças capilares dos ratos que receberam angiotensina II. Os animais que receberam glicerol após jejum prolongado apresentaram, apenas na fase precoce, debris granulares cobrindo parte do endotélio filtrante. A análise no período de manutenção do modelo, 24 horas após a injeção de glicerol, mostrou morfologia glomerular normal, sem constrição capilar ou debris no endotélio e, portanto, sem qualquer evidência de prejuízo à permeabilidade dos capilares glomerulares.

Os dados indiretos apresentados sugerem que redução do K_f não é importante no modelo glicerol.

3. Sistemas Vasoativos na IRA induzida por glicerol

Os sistemas vasoativos regulam a resposta vascular renal, tanto na fase inicial após a injeção de glicerol (quando há queda da perfusão renal e grande aumento da resistência vascular renal) quanto na fase posterior e característica do modelo (quando embora haja normalização da resistência vascular, permanece a vasoconstrição aferente, compensada por vasodilatação eferente).

3.1 Sistema Renina Angiotensina

McDonald e col(28) mostraram prevenção da insuficiência renal aguda no modelo glicerol, através da sobrecarga crônica de salina. Os ratos recebiam salina, ao invés de água, durante 2 a 3 meses antes da lesão pelo glicerol. Após a injeção de glicerol a elevação da concentração de uréia plasmática foi menor no grupo que recebeu salina, comparado com o grupo de animais que recebeu água. Os autores entenderam que a sobrecarga crônica de salina suprimiu o sistema renina-angiotensina, e por isso preveniu a insuficiência renal. Trabalho posterior (29) avaliou o efeito da sobrecarga crônica de salina, através do clearance de inulina, e não notou diferença na filtração glomerular, entre o grupo com sobrecarga salina e o grupo controle. Wilkes e col.(19) avaliaram a função renal através da concentração de uréia plasmática e só notaram proteção da função renal quando a ingestão oral de salina era feita após a injeção de glicerol e não com a ingestão crônica por 1 mes pré-glicerol. Concluíram que a proteção pela salina era resultante de melhor repleção do volume extra-celular, de aumento da excreção urinária de

água e solutos com prevenção de obstruções tubulares e não dependia da depleção da renina renal.

Carvalho e col.(30) estudaram ao longo das primeiras 48 horas após o glicérol os níveis plasmáticos de renina, substrato de renina e atividade plasmática de renina. Encontraram inicialmente aumento da concentração de renina com pico às 8 horas e, posteriormente, do substrato de renina com pico às 24 horas. Não obtiveram correlações entre concentrações do substrato da renina, da concentração de renina plasmática ou da atividade plasmática da renina com a severidade da insuficiência renal e sugeriram que estas modificações no sistema não foram relacionadas com o desenvolvimento da IRA. Baranowski e col.(31) demonstraram que a redução na filtração glomerular precedia qualquer modificação na concentração intrarrenal de renina e angiotensinas e concluíram que o sistema renina-angiotensina não participaria da geração deste tipo de IRA experimental.

Vários estudos procuraram atenuar a gravidade da IRA-GLI através da interrupção farmacológica do sistema renina angiotensina, seja por antagonistas competitivos do receptor (32,33), ou do bloqueio da enzima de conversão da angiotensina I (9,32,34). A ação destas drogas sobre o fluxo sanguíneo renal, na fase precoce do modelo, foi controversa, com aumento (32) ou não (9), apesar da técnica de microesferas ter sido utilizada em ambos trabalhos. Por outro lado, com relação à evolução da insuficiência renal, houve concordância em todos trabalhos empregando tanto bloqueador de enzima conversora, como antagonista de receptor de angiotensina II mostrando que o bloqueio do sistema renina-angiotensina é totalmente ineficaz em proteger a função renal.

Baranowski e col.(35) estudaram o efeito da administração de angiotensina I sobre o fluxo renocortical de ratos, medido por laser-doppler, 24 horas após o glicérol. Baseados em seus achados concluíram que há queda da atividade intra-renal da enzima conversora de angiotensina e, portanto, da síntese de angiotensina II. A ação vasoconstritora da angiotensina II é mais intensa sobre as arteríolas eferentes e a redução de sua produção levaria à redução da resistência arteriolar eferente como esperado neste modelo.

A análise de todos estes dados sugere que a estimulação do sistema renina angiotensina não desempenha papel importante no curso da IRA-GLI, embora possa influir no aumento global da resistência vascular, nas primeiras horas após a lesão muscular. A redução da atividade da enzima conversora intra-renal, posteriormente, pode estar relacionada com a redução da resistência arteriolar eferente e manutenção da queda da filtração glomerular.

3.2 Hormônio Anti-diurético

Hofbauer e col.(36) demonstraram que os níveis plasmáticos de arginina-vasopressina (ADH) estão muito aumentados após injeção de glicérol, com pico às 2 horas. Este aumento ocorre em consequência tanto da hipovolemia, quanto da hiperosmolaridade sanguínea induzida pelo próprio glicérol. A injeção de anticorpo anti-ADH reduziu transitoriamente a pressão arterial sistêmica destes ratos, demonstrando importância do ADH na hemodinâmica sistêmica. No entanto, em relação à hemodinâmica renal, o ADH não desempenha papel importante. Wilson e col.(37) demonstraram que o curso da insuficiência renal é comparável em ratos com diabetes

insipidus e ratos normais. Konrads e col. (38) mostraram que a redução do volume urinário e aumento da uréia plasmática eram mais pronunciados em ratos com diabetes insipidus do que em ratos normais. Por estas razões a vasopressina parece não desempenhar importante papel patogênico no modelo glicerol.

3.3 Catecolaminas

Provavelmente o sistema adrenérgico está envolvido na vasoconstricção renal e sistêmica, que ocorrem imediatamente após a injeção de glicerol. Mclean e col.(39) demonstraram que administração prévia de fenoxibenzamina diminuiu a gravidade da lesão funcional e morfológica no modelo glicerol. Este estudo demonstrou que o bloqueio de receptores alfa-adrenérgicos pode atenuar o desenvolvimento da IRA quando é utilizada pequena dose de glicerol (3ml/kg). No entanto, Cheng e col.(40) demonstraram grande redução da concentração renal de noradrenalina, neuropeptídeo Y e dopamina 24 horas após a injeção de glicerol. Avaliação histoquímica da inervação renal revelou lesão acentuada das terminações adrenérgicas onde são estocados tanto a noradrenalina como o neuropeptídeo Y, fortes agentes vasoconstrictores renais. Segundo os autores a lesão da inervação adrenérgica observada 24 horas após o glicerol e a redução da concentração renal destes agentes estariam associados com a normalização da resistência vascular renal observada tardiamente no modelo glicerol. Esses dados são contrários à participação do sistema adrenérgico na manutenção da IRA-GLI.

3.5 Eicosanóides

Inibição da síntese de prostaglandinas com indometacina, resultou em agravamento da IRA-GLI em coelhos (41). Este efeito foi atribuído à diminuição da síntese de prostaglandinas vasodilatadoras, especialmente prostaglandina E2, que se oporiam a mediadores vasoconstrictores. O mesmo efeito da indometacina não foi observado em ratos (41) provavelmente porque nos ratos a prostaglandina E2 não tem efeito vasodilatador. Por outro lado, a infusão de prostaglandina E2 foi capaz de atenuar a IRA-GLI em ratos (42). Da mesma forma, o tratamento com o análogo da prostaglandina I2, o Iloprost, resultou em menor grau de alterações histopatológicas e hematúria em ratos com IRA-GLI(43). Neste estudo não foi feita avaliação funcional renal dos animais. Aumento da síntese de tromboxane A2 cortical foi demonstrado após glicerol (44) e este aumento correlacionou-se com o aumento da creatinina sérica. Watson e col.(45) provocaram inibição seletiva da síntese de tromboxane A2, com 4-imidazol acetofeno e não notaram qualquer efeito protetor sobre o curso da IRA-GLI. O efeito de outro inibidor da síntese de tromboxane A2, o UK 38485, foi avaliado apenas histologicamente e mostrou proteção neste modelo experimental (43). Neste mesmo trabalho os autores dosaram a atividade de leucotrieno C 4 em homogeinizado de tecido renal 6 horas após injeção de glicerol e encontraram atividade aumentada deste potente vasoconstrictor. Dado à complexidade dos efeitos de diferentes metabólitos do ácido aracdônico, mais estudos serão necessários para melhor avaliar o papel deste importante sistema de regulação hemodinâmica da IRA.

3.6 Adenosina

A adenosina é produzida nas células que sofrem isquemia e é liberada para o meio extra-celular. O efeito hemodinâmico renal da adenosina é peculiar promovendo, em ratos normais, vasoconstrição pré-glomerular e relaxamento arteriolar eferente (46). Como já citado, estudo da hemodinâmica glomerular no modelo glicerol (18) mostrou alterações semelhantes às observadas pela ação da adenosina.

Vários derivados de xantina, como aminofilina (47), 8 fenil-teofilina (48), pentoxifilina (49), HWA-138 (50) e BW A1433U (51), foram estudados no modelo glicerol e protegeram parcialmente o desenvolvimento da IRA. Todas estas drogas apresentam, em comum, a capacidade de bloquear os receptores de adenosina, sugerindo a participação deste mediador vasoativo na patogênese da IRA-GLI. Outros mecanismos de proteção renal poderiam ser imputados às xantinas como diminuição da congestão vascular medular pelo seu efeito sobre a reologia sanguínea, ação diurética ou bloqueio da síntese do Fator de Necrose Tumoral (TNF alfa).

3.6 Citocinas

Em trabalho recente, Shulman e col.(52) demonstraram a importância do TNF alfa na patogênese da IRA-GLI. A concentração plasmática de TNF alfa mostrou-se elevada nas primeiras horas após a injeção de glicerol, enquanto os níveis desta citocina eram indetectáveis no grupo controle. A administração de anticorpo anti-TNF, antes da injeção de glicerol, foi capaz de atenuar a gravidade da IRA, avaliada pelos níveis de

uréia, creatinina e clearance de creatinina, 24 após a lesão muscular. É bem conhecido que as endotoxinas das bactérias Gram negativas são potente estímulo para a liberação de TNF alfa dos macrófagos (53) e de vários tecidos, principalmente dos rins (54). Existem evidências na literatura que indicam a participação de endotoxemia na IRA-GLI (55) e este poderia ser um dos estímulos à produção de TNF neste modelo.

O TNF alfa é a citocina mais importante na resposta inflamatória sistêmica (56). Entre várias atividades biológicas destacam-se sua ação sobre o endotélio vascular aumentando sua permeabilidade, a indução da síntese de fatores de coagulação, a ativação dos polimorfonucleares através do aumento da sua atividade fagocítica e aumento da expressão de moléculas de adesão em sua superfície e no endotélio vascular. Além disso, o TNF alfa estimula a síntese de eicosanóides (57) e Fator Ativador de Plaqueta (PAF) (58,59). Por sua vez, o PAF retroalimenta a produção macrofágica de TNF alfa e outras linfocinas, fechando o ciclo, que culmina na lesão microvascular (60).

O PAF é um fosfoglicerídeo autacóide mediador da reação inflamatória. É sintetizado por diferentes células a partir do metabolismo dos fosfolípídeos de membrana celular, tendo sido reportada sua síntese e liberação pelas células mesangiais (61). A infusão intravenosa de PAF em ratos, resultou em insuficiência renal aguda (62) e o mecanismo foi atribuído à vasoconstrição renal (63). O tratamento com o antagonista de receptor de PAF, o BN 52021, impediu estas alterações funcionais renais induzidas pelo PAF (62). Participação do PAF foi encontrada na IRA induzida por endotoxina (64), na IRA isquêmica (65), e na IRA induzida por glicerol (66).

Lopez-Farre e col. (66) estudaram a participação do PAF na IRA-GLI através da dosagem glomerular do PAF. Encontraram concentração

mensurável deste mediador nos glomérulos dos ratos com IRA enquanto ele era indetectável nos glomérulos de ratos normais. Além disso, mostraram efeito protetor do antagonista de receptor do PAF (BN 52021) sobre a redução da filtração glomerular e fluxo plasmático renal na fase aguda do modelo assim como menor queda do clearance de creatinina em animais mantidos em gaiolas metabólicas por até 3 dias. Todos estes dados apontam para a importância deste mediador na IRA, particularmente na IRA-GLI.

3.7 Endotelina e Óxido Nítrico

Atualmente é bem conhecida a importância dos autacóides vasoativos derivados do endotélio no controle do tônus da musculatura lisa vascular (67). A endotelina, polipeptídeo com 21 aminoácidos, foi isolada de cultura de células endoteliais e mostrou ser a mais potente substância vasoconstrictora endógena (68). A ação da endotelina sobre seus receptores estimula a produção de prostaciclina e de óxido nítrico, vasodilatadores que regulam e contrabalançam o seu efeito vasoconstrictor (69). A mioglobina e a hemoglobina são potentes inibidores do óxido nítrico (70) e, recentemente, Maree e col. (71) apresentaram trabalho que demonstrou proteção da IRA por glicerol após infusão de L-Arginina, o precursor de óxido nítrico. A proteção obtida com aumento da síntese de óxido nítrico, sugere aumento do tônus vasoconstrictor do sistema vasoativo endotelial. Apesar da importância da endotelina em diferentes causas de IRA (72,73,74), sua participação não foi investigada, até o momento, no modelo glicerol.

4. Necrose tubular na IRA induzida por glicerol

A redução do aporte de oxigênio ao tecido renal resulta em redução precoce dos níveis de ATP (trifosfato de adenosina) celular. A córtex renal é mais sensível do que a medula, que normalmente é relativamente hipóxica e, está mais habilitada a repor seus estoques de ATP através do metabolismo glicolítico anaeróbico. A resistência medular à hipóxia não é uniforme. A porção espessa medular da alça de Henle não consegue sustentar níveis razoáveis de ATP mesmo porque esta região é particularmente mal perfundida na isquemia renal. Apenas 10 minutos de isquemia completa reduzem os níveis de ATP renal entre 70% e 90% em relação aos valores basais (75).

Vários processos vitais celulares, dependentes do fornecimento energético do ATP, são afetados. Esses processos incluem síntese proteica, lipogênese e transporte iônico de membrana. Sódio e cálcio acumulam-se dentro das células. Normalmente existe um grande gradiente entre o cálcio livre intra e extracelular. O concentração de cálcio extracelular é cerca de 10000 vezes superior ao intracelular. Este gradiente é mantido por sistemas enzimáticos de extrusão de cálcio energia-dependentes. Com a redução do ATP celular a extrusão de cálcio via Ca^{++} -ATPases é inibida. Além disso, a atividade da Na^{+} - K^{+} ATPase também é deprimida, aumentando a concentração de Na^{+} intracelular propiciando a entrada de cálcio nas células pela via trocadora de Ca^{++} e Na^{+} (76). Na tentativa de manter a homeostase de cálcio, organelas intracelulares como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, aumentam ativamente sua captação de cálcio (77). O retículo endoplasmático tem alta afinidade e, de início, é responsável pelo

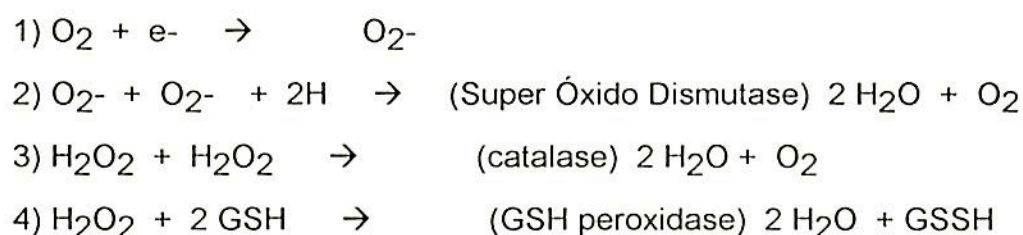
tamponamento do cálcio. Porém, tem pequena capacidade e este mecanismo é rapidamente saturado. As mitocôndrias representam um sistema de alta capacidade de tamponar o cálcio. Grande quantidade de cálcio pode ser captado pelas mitocôndrias na presença de ATP, principalmente quando ocorre reperfusão após período de isquemia (78). O aumento do cálcio intramitocondrial causa, entretanto, edema mitocondrial, desacoplamento da fosforilação oxidativa e liberação de ácidos graxos livres que também alteram a função mitocondrial. Estas alterações mitocondriais voltam a reduzir a produção celular de ATP, reduzem a captação reticular de cálcio, assim como, a extrusão celular de cálcio pela Ca^{++} -ATPase de membrana celular, finalmente impedindo o tamponamento do cálcio intracelular (78).

O aumento do cálcio iônico livre nas células esta implicado com alterações hemodinâmicas renais após período de isquemia. A ligação do cálcio com proteínas, como as calmodulinas, ativa o sistema contrátil da miosina, e este efeito pode estar relacionado com a perda da auto-regulação renal, hipersensibilidade à estimulação nervosa renal, aumento da resistência vascular renal e queda do Kf observados após isquemia renal (79).

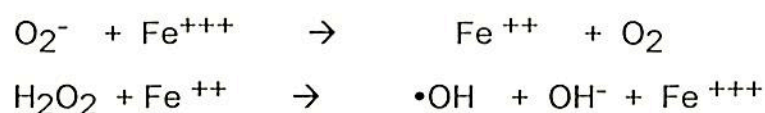
Além disso, o aumento do cálcio livre ativa proteases e fosfolipases cálcio-dependentes. Nakamura e col. (80) mostraram que a atividade da fosfolipase A2 estava aumentada no tecido renal de ratos submetidos a 45 minutos de isquemia por clampeamento arterial. Bonventre e col. (81), anteriormente, já haviam demonstrado que o aumento da atividade da fosfolipase A2 é dependente da concentração de cálcio citosólico ou mitocondrial. A fosfolipase A2 desempenha papel importante na lesão isquêmica. Promove degradação dos fosfolípidos de membranas celulares, libera ácidos graxos tóxicos para as mitocôndrias, produz ácido

aracdônico que é convertido para eicosanóides por lipoxigenases e cicloxigenases. Nesta biossíntese gera radicais reativos de oxigênio. Além disso, a fosfolipase A2 atuando sobre substrato específico libera precursor de PAF que é mediador importante na IRA (62).

O aumento do cálcio citosólico durante a isquemia também ativa protease cálcio-dependente convertendo a enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase (82). Ao mesmo tempo há degradação intracelular do ATP em ADP (adenosina di-fosfato) e AMP (adenosina mono-fosfato). O AMP é metabolizado pela 5-nucleotidase com a formação de adenosina, inosina e hipoxantina. Como já citado, a adenosina pode vazar das células e desempenhar importantes ações hemodinâmicas (46). Portanto, no ambiente isquêmico há aumento da hipoxantina intracelular e da enzima xantina oxidase. Durante a reperusão a xantina oxidase utiliza o oxigênio molecular como receptor de elétrons, enquanto cataliza a conversão de hipoxantina em ácido úrico, gerando radicais superóxidos. As possíveis vias metabólicas dos radicais superóxido são esquematizadas a seguir:



5) Reação de Haber-Weiss



Dois radicais superóxidos reagem e geram peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Dependendo das circunstâncias, o peróxido de hidrogênio formado pode seguir diferentes caminhos. Pode ser convertido a oxigênio molecular e água pela enzima catalase, pode oxidar a glutatona em reação catalisada pela glutatona peroxidase. Em ambos os casos impede o efeito destrutivo dos radicais reativos. Por outro lado, pode seguir uma reação em 2 tempos, conhecida como reação de Haber-Weiss e gerar o radical hidroxila que é o mais tóxico para as células. Na reação de Haber-Weiss há participação do ferro férrico e radical superóxido que reagem formando ferro ferroso e oxigênio. A seguir o ferro ferroso reage com peróxido de hidrogênio e gera radical hidroxila, íon hidroxila e ferro férrico. Alternativamente, o peróxido de hidrogênio pode reagir diretamente com o ferro férrico e gerar radicais ferril, ou perferril que também são tóxicos.

No modelo glicerol ocorre tanto isquemia quanto sobrecarga de ferro livre e ligado ao heme da mioglobina para o tecido renal (83) . Se, por um lado a isquemia/reperfusão ativa a produção de radicais superóxido, a sobrecarga de ferro catalisa a produção de metabólitos mais lesivos que determinam peroxidação das membranas celulares e necrose tubular.

Vários estudos demonstraram proteção funcional e da lesão renal no modelo glicerol utilizando agentes queladores de ferro (84,85) ou agentes sequestradores de radicais hiperativos de oxigênio (85,86,87), confirmando sua importância na patogênese da necrose tubular neste modelo.

Tendo em vista a grande importância do acúmulo de cálcio citosólico no desencadeamento tanto da resposta hemodinâmica quanto da lesão tubular na IRA, o emprego de agentes bloqueadores de canais de cálcio na IRA é bastante lógico. Vários estudos experimentais demonstraram

sua eficiência na IRA isquêmica, principalmente quando utilizados antes e após o período de isquemia (88,89,90). Neumayer e col. (91) obtiveram menor incidência de IRA pós-transplante renal, em humanos, quando trataram os receptores e adicionaram ao Eurocollins, o diltiazem. Estudos experimental (92) e clínico (93) demonstraram proteção da função renal na nefrotoxicidade por contrastes iodados. Existe evidência favorável (93) e contrária (94) à eficiência destes agentes na nefrotoxicidade por gentamicina dependendo da dose administrada deste aminoglicosídeo. Estudo de clearance global em gaiola metabólica (95), assim como estudo utilizando técnica de micropunção glomerular (96), mostraram eficiência dos antagonistas de cálcio na prevenção da nefrotoxicidade aguda por ciclosporina.

No modelo glicerol, apenas Lee e col.(33) estudaram a ação de um bloqueador de cálcio, o diltiazem. Compararam os ratos tratados com diltiazem com ratos sem tratamento e tratados com captopril. Mostraram proteção funcional e histológica apenas no grupo tratado com diltiazem. O pico de creatinina sérica nos animais sem tratamento ou nos animais tratados com captopril foi superior a 5 mg/dl, enquanto os animais tratados com diltiazem permaneceram com creatinina inferior a 2 mg/dl. A avaliação histomorfométrica 24 horas após o glicerol mostrou aproximadamente 40% de túbulos necróticos nos grupos sem tratamento e nos tratados com captopril e redução para aproximadamente 20% de túbulos necróticos nos animais tratados com diltiazem.

5. Função tubular na IRA induzida por glicerol

Apesar do grande número de estudos que avaliaram a patogênese e fisiopatologia da falência de filtração na IRA por glicerol, poucas investigações concentraram-se em avaliar a repercussão da lesão renal na função tubular.

Westenfelder e col. (97) demonstraram que diferentes funções tubulares proximais como reabsorção de glicose, bicarbonato, fósforo e o transporte de ácido paraminohipúrico estavam muito reduzidos na IRA-GLI. Analisaram as alterações morfológicas tubulares através de microscopia eletrônica e notaram que o principal segmento acometido, com alterações celulares mais severas, foi o túbulo contornado proximal (perda da borda em escova, grande edema mitocondrial e vacuolização citoplasmática). Havia alterações moderadas na pars reta e discretas na porção espessa da alça de Henle. A função distal, analisada através da acidificação urinária, secreção de potássio, amônia e acidez titulável, estava preservada. Finalmente, notaram redução da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ em homogeneizados de córtex e medula dos ratos com IRA. Como a maior concentração de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ está presente nos túbulos proximais concluíram, baseados nos resultados dos estudos funcionais, histológicos e enzimáticos que há um defeito difuso na função tubular proximal no modelo glicerol.

Scherzer e col.(98) mediram a atividade de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ em vários segmentos tubulares, corticais e medulares dissecados de ratos com IRA-GLI. Encontraram atividade enzimática semelhante ao controle no túbulo contornado proximal, na pars reta e no coletor cortical e redução significativa da atividade desta enzima na porção espessa da alça de Henle, tanto

medular como cortical e no túbulo contornado distal. Os dados deste trabalho sugerem redução da atividade da bomba de sódio nos segmentos distais.

Outra técnica bastante utilizada no estudo da função tubular é o clearance de lítio (99,108,121). Em condições adequadas o clearance de lítio permite estimar o fluxo tubular pós-proximal e a partir deste dado calcular a reabsorção proximal e distal de sódio. Não temos conhecimento do emprego desta técnica na IRA experimental até o momento.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudar as alterações da filtração glomerular e da função tubular, utilizando a técnica de clearance de lítio, durante a fase de desenvolvimento da lesão renal no modelo glicérol.

2. Avaliar a ação do bloqueador de canal de cálcio (nifedipina) e do antagonista de receptor de PAF (BN 52021), sobre a função renal e tubular, no modelo glicérol.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais de experimentação

Foram utilizados ratos machos da raça Wistar-Hannover, fornecidos pelo biotério central da UNICAMP. Após o desmame os ratos receberam apenas ração comercial Purina[®] (que contém de 0.3 a 0.5 g de sódio/100 g de ração) e água "ad libitum". Esta dieta é considerada normossódica para ratos. Os animais utilizados nos experimentos apresentavam 8 a 12 semanas de vida e 200 a 350 g de peso.

2. Indução da Insuficiência Renal Aguda

Os animais foram mantidos em jejum completo (ração e água) por 12 horas, ao longo da noite. Após o jejum os ratos foram pesados em balança eletrônica Denver®, USA e glicerol a 50% foi injetado via intramuscular dividido em ambas patas traseiras, tendo sido utilizadas 2 doses conforme será especificado na descrição dos experimentos. Após a injeção de glicerol os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais com livre acesso à água e ração.

3. Estudo funcional em gaiolas metabólicas

Quatorze horas antes do estudo funcional infundíamos por gavagem 0.06 mEq/100 g de rato de cloreto de lítio, utilizando solução com concentração de cloreto de lítio de 0.06 mEq/ml. Estudo anterior em nosso laboratório demonstrou que tal sobrecarga de lítio não induz à níveis séricos

superiores a 0.5 mEq/l e permite a manutenção de patamar na concentração sérica entre 9 e 24 horas após a infusão do cloreto de lítio (117). Após a infusão do cloreto de lítio a ingesta de ração era suspensa e de água permitida até o início do estudo funcional.

Ainda precedendo o estudo foi realizada sobrecarga hídrica. A infusão de água, também por gavagem, foi dividida em 2 infusões correspondendo cada uma a 5% do peso corporal dos ratos e ocorriam 80 e 20 minutos antes do estudo funcional.

O estudo funcional renal foi realizado através da medida dos clearances de creatinina, lítio e sódio. O tempo de coleta urinária nas gaiolas metabólicas, com os ratos acordados, foi de 2 horas. O sangue foi coletado no fim deste período, após anestesia com éter, através de punção cardíaca.

4. Grupos experimentais

Foram realizadas 3 séries de experimentos:

Série I. Níveis séricos de creatinina, creatina-fosfoquinase (CPK) e hematócrito na IRA-GLI

Avaliação das variações da creatinina, CPK e hematócrito, durante o desenvolvimento da IRA-GLI. A dose utilizada de glicerol a 50%, nesta série foi de 10 ml/kg de rato. Esta série constou de 6 grupos experimentais, de acordo com o tempo transcorrido entre a indução da IRA e a coleta sanguínea para as dosagens laboratoriais:

1. grupo controle sem jejum, n=8.
2. grupo controle com jejum, n=8
3. grupo 3 horas, após IRA, n=8
4. grupo 6 horas, após IRA, n=8
5. grupo 12 horas, após IRA, n=8
6. grupo 24 horas, após IRA, n=8.

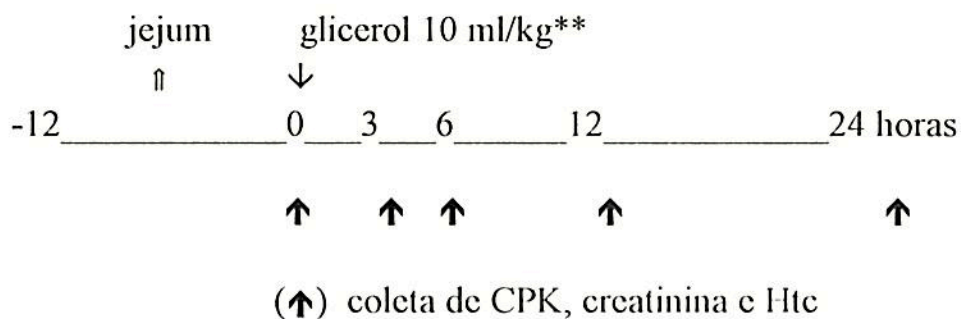


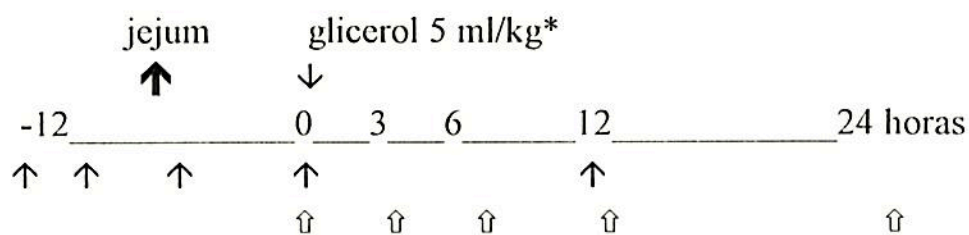
Diagrama 1. Protocolo de estudo da série I.

Série II. Estudo sequencial da função renal e tubular na IRA-GLI

Estudo funcional com o intuito de avaliar sequencialmente as alterações da filtração glomerular (através do clearance de creatinina) e função tubular (através do clearance de lítio e sódio) na IRA-GLI. Nesta série a dose utilizada de glicerol a 50% foi de 5 ml/kg de rato. Esta série constou de 5 grupos experimentais, de acordo com o tempo transcorrido entre a indução da IRA e o início do estudo funcional:

1. grupo controle, estudado após jejum, n=9
2. grupo 3 horas, após IRA, n=7
3. grupo 6 horas, após IRA, n=9
4. grupo 12 horas, após IRA, n=10
5. grupo 24 horas, após IRA, n=9

Após estudo funcional amostras de urina e soro foram encaminhadas para as dosagens de creatinina, sódio e lítio. O rim esquerdo foi removido e pesado em balança de precisão eletrônica Marte®, Brasil.



(↑) estudos funcionais (precedidos H₂O 10% peso)
 (↑) LiCl 0.06 mEq/100 g

Diagrama 2. Protocolo de estudo da série II.

Série III. Efeitos da nifedipina e do BN 52021 sobre a função renal e tubular na IRA-GLI

Estudo do efeito do bloqueador de canal de cálcio (nifedipina) e do bloqueador de receptor de PAF (BN 52021) sobre a função renal

(clearance de creatinina) e função tubular (clearance de lítio e de sódio) na IRA-GLI. A dose de glicerol a 50% utilizada nesta série foi de 5 ml/kg de rato. Todos os estudos funcionais nesta série foram realizados 24 horas após a indução da IRA. Esta série constou de 5 grupos experimentais, de acordo com o tipo de tratamento utilizado:

1. grupo controle, estudado 24 horas após jejum, n=10
2. grupo glicerol, sem tratamento, n=9 (mesmo grupo 24 horas da série II)
3. grupo glicerol + nifedipina (gli+nife), n=9
4. grupo glicerol + BN 52021 (gli+BN), n=10
5. grupo glicerol + nifedipina + BN 52021 (gli+nife+BN), n=9

A dose utilizada de nifedipina foi de 20 mg/Kg de rato. A nifedipina foi diluída em água, na concentração de 2 mg/ml, sendo infundida por gavagem 1ml/100 g de rato, imediatamente após a injeção de glicerol. A dose utilizada de BN 52021 foi de 1mg/kg de rato, injetada intraperitoneal, imediatamente após o glicerol. O BN 52021 foi diluído na concentração de 200 µg/ml, sendo injetado volume de 0.5 ml/100 g de rato. Os animais do grupo glicerol receberam infusão de volume de água equivalente ao volume da infusão de nifedipina, por gavagem.

Após estudo funcional amostras de urina e soro foram encaminhados para a dosagem de creatinina, sódio e lítio. O rim esquerdo foi removido e pesado em balança de precisão eletrônica Marte®, Brasil.

As doses e concentrações de glicerol, nifedipina e BN 52021, assim como a maneira de aplicá-los aos ratos foi idêntica à empregada na série III.

Vinte e quatro horas após a injeção de glicerol, o rim esquerdo de cada animal foi retirado e fixado em formol a 10% para posterior estudo histológico.

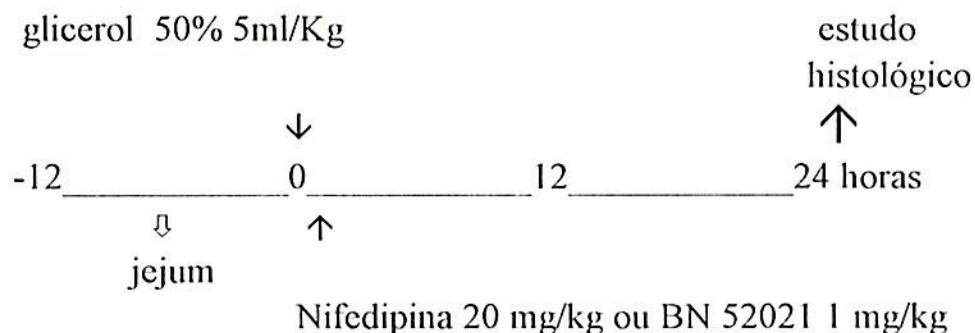


Diagrama 4. Protocolo de estudo da série III A.

Série III B. Efeitos da nifedipina e do BN 52021 em ratos normais desidratados

Estudo do efeito intrínseco da nifedipina e do BN 52021 sobre a função renal e tubular de ratos normais, submetidos a jejum noturno de 12 horas. Após o período de jejum, no momento que seria injetado o glicerol, apenas as drogas testadas foram infundidas na mesma dose, concentração e via de aplicação utilizada na série III. O estudos funcionais foram realizados 3 horas após a administração das drogas. Esta série foi composta de 3 grupos experimentais, de acordo com o tratamento empregado:

1. grupo controle com jejum, n=9 (mesmo grupo controle da série II)
2. grupo nifedipina, n=10
3. grupo BN 52021, n=10

Após estudo funcional amostras de urina e soro foram encaminhadas para dosagem de creatinina, lítio e sódio.

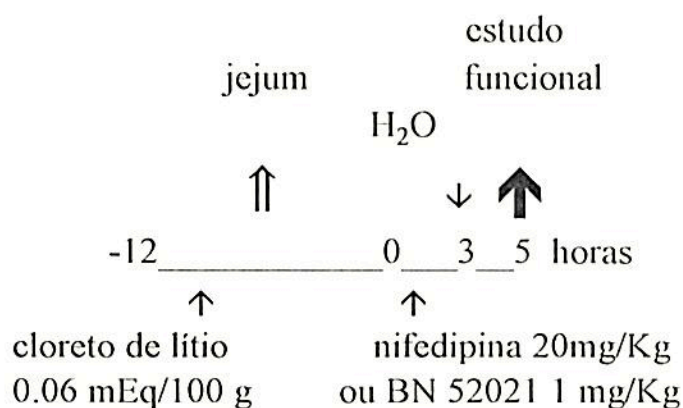


Diagrama 5. Protocolo de estudo da série III B.

Série III C. Efeito da nifedipina e do BN 52021 sobre a lesão muscular na IRA-GLI

Para determinar o efeito da nifedipina e do BN 52021 sobre a lesão muscular provocada pela injeção de glicerol, avaliamos o nível sérico de CPK 6 horas após a indução de IRA. A dose de glicerol a 50% utilizada nesta série foi de 5 ml/kg de rato. Esta série constou de 3 grupos experimentais, de acordo com o tratamento empregado:

1. grupo glicerol, n=5
2. grupo glicerol + nifedipina (gli+nife), n=5
3. grupo glicerol + BN 52021 (gli+BN), n=5

A dose, concentração e via de administração das drogas foi idêntica à utilizada na série III. A coleta sanguínea foi feita através de punção cardíaca, após anestesia com éter e amostra de soro foi encaminhada para dosagem de CPK.

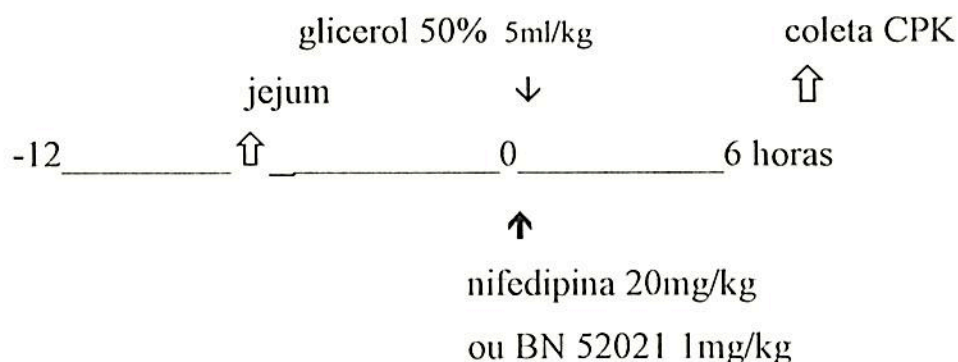


Diagrama 6. Protocolo de estudo da série III C.

5. Dosagens laboratoriais

As concentrações de sódio e lítio, plasmática e urinária, foram determinadas por fotometria de chama, através de fotômetro Micronal®, modelo 262. As concentrações de creatinina plasmática e urinária, foram determinadas por método colorimétrico com picrato alcalino (Jaffé modificado) utilizando aparelho de automação Cobas-Mira®. A medida de creatina-fosfoquinase (CPK), foi obtida através de método cinético, em ultravioleta, utilizando aparelho de automação Cobas-Mira®. O "kit" de CPK foi o Granutest® da Merck. O hematócrito, foi determinado em centrífuga para microhematócrito.

6. Cálculo dos parâmetros funcionais

As seguintes fórmulas foram utilizadas para calcular parâmetros funcionais, a partir das dosagens e medidas obtidas:

1. Clearance de creatinina (CCr) e de lítio (CLi) :

$$\text{Clear. creat. ou Clear lítio} = U/P \times V' \text{ (}\mu\text{l/min/100 g de peso)}$$

U = concentração urinária de creatinina (mg/dl) ou lítio (mEq/l)

V' = volume urinário ($\mu\text{l/min/100 g}$)

P = concentração plasmática de creatinina (mg/dl) ou lítio (mEq/l)

2. Fração de excreção de sódio e lítio :

$$\text{FeNa ou FeLi} = U / P \times P_{\text{cr}} / U_{\text{cr}} \times 100 (\%)$$

U = concentração urinária de sódio ou lítio (mEq/l)

P = concentração plasmática de sódio ou lítio (mEq/l)

P_{cr} = concentração plasmática de creatinina (mg/dl)

U_{cr} = concentração urinária de creatinina (mg/dl).

3. Carga filtrada de sódio :

$$\text{C.F. Na} = P_{\text{Na}} \times \text{CCr} \text{ (}\mu\text{Eq/min/100 g de peso)}$$

P_{Na} = concentração plasmática de sódio (mEq/l)

CCr = clearance de creatinina ($\mu\text{l/min/100 g de peso}$).

4. Aporte distal de sódio :

$$A.D.Na = PNa \times CLi \text{ (} \mu\text{Eq/min/100 g de peso)}$$

PNa = concentração plasmática de sódio (mEq/l)

CLi = clearance de lítio ($\mu\text{l/min/100 g de peso}$).

5. Excreção urinária de sódio:

$$\text{Exc. Urin.} = UNa \times V' \text{ (} \mu\text{Eq/min/100 g de peso)}$$

UNa = concentração urinária de sódio (mEq/l)

V' = volume urinário ($\mu\text{l/min/100 g de peso}$)

6. Reabsorção fracional proximal de sódio :

$$R.Fr.Prox.(\text{Reab.Fr.Prox.}) = C.F.Na - A.D.Na / A.D.Na \times 100 \text{ (\%)}$$

C.F.Na = carga filtrada de sódio ($\mu\text{Eq/min/100 g de peso}$)

A.D.Na = aporte distal de sódio ($\mu\text{Eq/min/100 g de peso}$).

7. Reabsorção fracional distal de sódio :

$$\text{R.Fr. Dist. (Reab.Fr. Dist.)} = \text{A.D. Na} - \text{Exc. Urin.} / \text{AD} \times 100 \text{ (\%)}$$

AD = aporte distal de sódio ($\mu\text{Eq/min/100 g}$ de peso)

Exc. Urin. = excreção urinária de sódio ($\mu\text{Eq/min/100g}$ de peso)

8. Fluxo fracional urinário durante máxima diurese :

$$\text{F.Fr. Urin.} = V' / \text{CCr}$$

V' = volume urinário ($\mu\text{l/min/100 g}$) após expansão aquosa com 10 % do peso corporal (V_{max})

CCr = clearance de creatinina ($\mu\text{l/min/100 g}$ de peso).

Como estudamos modelo de insuficiência renal aguda e, portanto, ratos com redução da filtração glomerular, obviamente obtivemos redução na carga filtrada dos solutos. Assim sendo, tanto na série II, como na série III, apresentaremos os dados de massa filtrada e excretada, ou clearance de eletrólitos que em valores absolutos não se aplicam para o estudo da função tubular neste modelo. Com este objetivo, analisaremos as frações de excreção de solutos, corrigidos para o clearance de creatinina, ou a fração de reabsorção, que é relativa ao aporte de soluto para determinado segmento tubular.

7. Avaliação histológica

Todos os rins esquerdos dos ratos da série III A foram cortados sagitalmente e corados com hematoxilina-eosina. A análise do patologista foi cega, isto é, não tinha conhecimento a que grupo pertenciam os rins encaminhados para laudo. A análise histológica foi semi-quantitativa, através da seleção aleatória de 10 campos corticais de cada lâmina, com aumento máximo sem imersão (400 vezes). Em cada campo, cada um dos seguintes eventos foram contados:

- a) descamação celular tubular, identificado pela presença de células epiteliais íntegras ou lesadas, dentro da luz tubular. Cada luz tubular contendo tais células constituiu um evento
- b) focos de necrose tubular, identificados como áreas tubulares eosinofílicas, com comprometimento intersticial, e ausência de núcleos, ou debris nucleares
- c) cilindros proteicos pigmentados, identificáveis como depósitos intraluminais eosinofílicos
- d) cilindros granulares, distinguidos dos pigmentados pela aparência granular, compostos por proteínas misturadas com restos celulares.

8. Análise estatística

A análise dos resultados dos parâmetros funcionais obtidos nos vários grupos foi realizada aplicando-se teste de análise de variância (ANOVA) "one way". Quando a ANOVA mostrava diferença significativa, aplicava-se o teste de Student Newman Keuls, para análise dos contrastes.

A comparação de 2 grupos independentes foi feita através do teste "t" não pareado.

Os resultados da análise histológica semi-quantitativa foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, com análise de contraste de Dunn.

A correlação entre variáveis foi avaliada através de regressão linear de Pearson.

Os resultados de cada parâmetro são apresentados através da média e desvio padrão para cada grupo experimental.

As diferenças foram consideradas significantes quando a probabilidade de casualidade foi inferior a 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

Apresentamos nesta seção os valores médios e desvios padrões dos resultados obtidos nos grupos estudados na forma de tabelas ou gráficos. Os resultados dos valores individuais destas tabelas, assim como a concentração sérica e urinária dos eletrólitos, estão discriminados na seção Apêndice.

Série I. Níveis séricos de creatinina, creatina-fosfoquinase e hematócrito na IRA-GLI.

Comparamos inicialmente a creatinina sérica e o hematócrito nos grupos controles, com e sem jejum de 12 horas. Notamos hematócrito significativamente maior no grupo submetido a jejum ($51.6 \pm 1.06\%$ vs $48.1 \pm 1.80\%$, $p < 0.001$, teste T não pareado) enquanto a creatinina foi respectivamente de 0.48 ± 0.05 mg/dl e 0.49 ± 0.13 mg/dl, diferença não significativa. O hematócrito sofreu aumento adicional, nas primeiras horas após a injeção de glicerol, sendo que o valor às 3 horas, $54.1 \pm 2.47\%$, foi maior que o controle pós jejum ($p < 0.05$, teste T não pareado).

O peso dos ratos utilizados na série 1, não diferiram entre si, controle pós jejum: 238.7 ± 24.7 gramas, 3 horas: 228.7 ± 18.5 gramas, 6 horas 229.5 ± 22.1 gramas, 12 horas: 249.6 ± 16.7 gramas e 24 horas : 251.2 ± 10.3 gramas (não significativo, ANOVA).

Os valores sequenciais nos grupos controle (pós jejum) e nos diferentes horários estudados após o glicerol (10 ml/kg a 50%), para a creatinina, hematócrito e CPK são apresentados na tabela 1 e figuras 1 e 2.

TABELA 1. Série I. Níveis séricos de creatinina, CPK e hematócrito (Htc) na IRA induzida por glicerol (10ml/kg)

	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
creatinina mg%	0.49 ± 0.13	0.90 ± 0.33	1.48 ± 0.21	2.09 ± 0.63*	4.75 ± 1.65**
Htc %	51.6 ± 1.06	54.1 ± 2.47	53.2 ± 9.75	51.6 ± 6.39	40.1 ± 5.43**
CPK UI	321 ± 121	20431 ± 10553'	28602 ± 16834'	18586 ± 7056'	1790 ± 3252

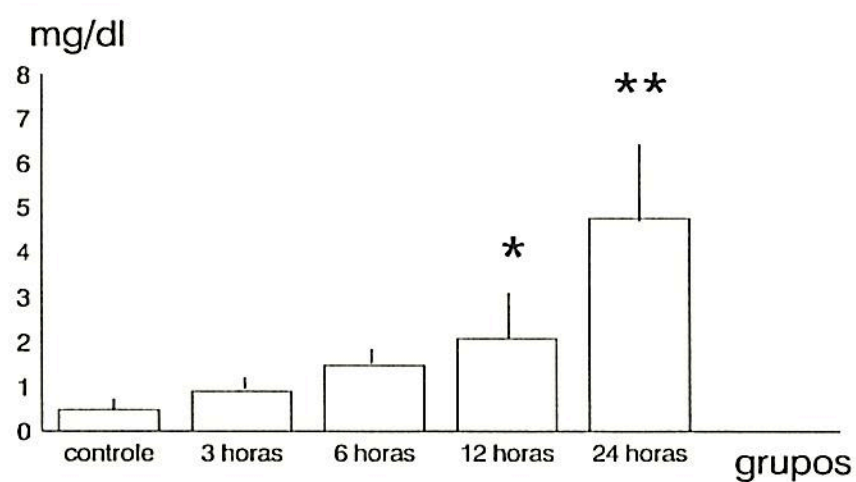
* p < 0.05 vs controle, 3, 6 e 24 horas

** p < 0.05 vs controle, 3, 6 e 12 horas

' p < 0.05 vs controle e 24 horas

A creatinina sérica às 24 horas foi superior a todos os outros grupos, enquanto às 12 horas foi maior que o grupo controle e 3 horas ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls). O hematócrito às 24 horas foi menor que todos os outros grupos ($p < 0.01$, ANOVA-Student Newman Keuls). Os valores encontrados para o CPK sérico às 3, 6 e 12 horas foram superiores aos encontrados para os grupos controle e 24 horas ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls).

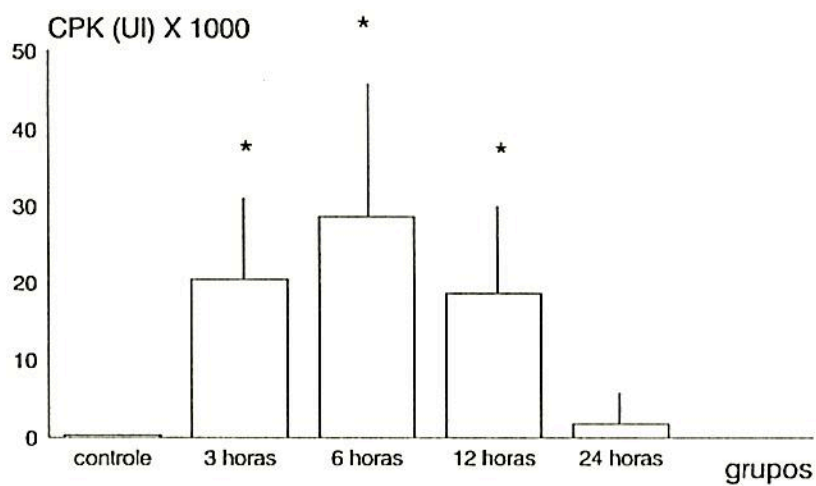
FIGURA 1. Série I. Níveis séricos de creatinina na IRA induzida por glicerol (10ml/kg)



* $p < 0,05$ vs controle e 3 horas

** $p < 0,05$ vs controle, 3, 6 e 12 horas

FIGURA 2. Série I. Níveis séricos de CPK na IRA induzida por glicerol (10ml/kg)



* $p < 0,05$ vs controle e 24 horas

Série II . Estudo sequencial da função renal e tubular na IRA-GLI.

Nesta série a dose de glicerol a 50% injetada nos ratos foi de 5ml/kg . Na tabela 2 apresentamos o peso corporal dos ratos e o peso renal ao fim dos estudos funcionais.

TABELA 2. Série II. Peso corporal e renal dos ratos com IRA induzida por glicerol (5ml/kg).

	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
peso corporal(g)	236,4±11,0	233,1±16,8	254,5±21,7	268,6±30,8*	260,0±14,4
peso renal (g/100g)	295,9±16,2	389,3±38,3**	391,8±5,0**	364,1±46,8**	382,0±54,4**

* p < 0.05 vs controle e 3 horas

** p < 0.05 vs controle

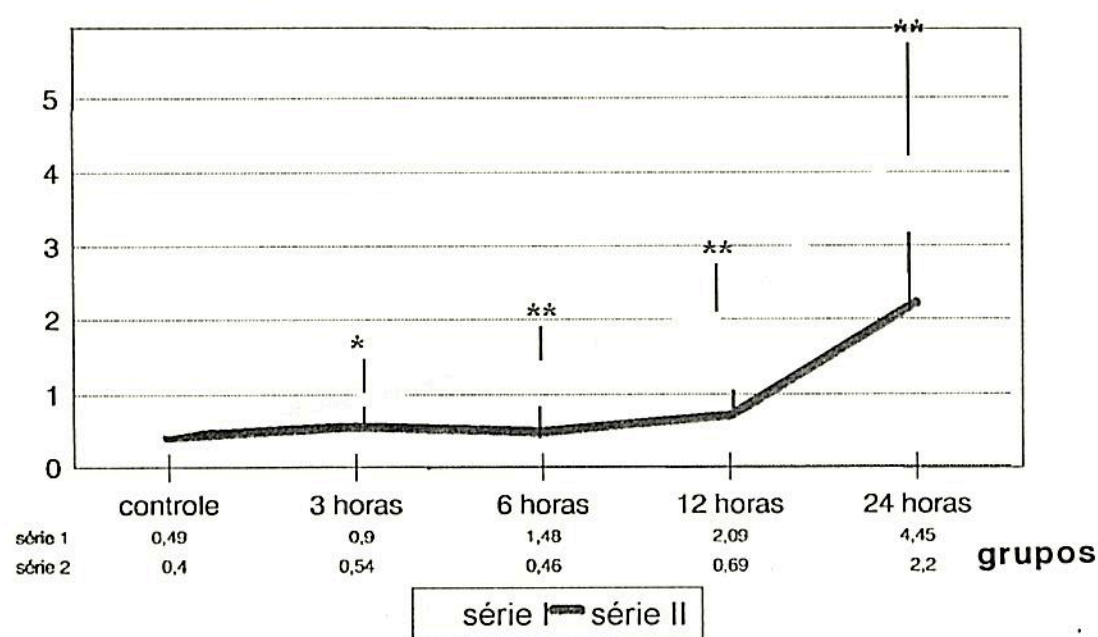
O peso corporal dos ratos estudados 12 horas após a injeção de glicerol foi superior aos grupos controle e 3 horas ($p < 0.05$, ANOVA-Student Newman Keuls). Como, dentro dos limites estabelecidos de aceitação de peso dos ratos para os experimentos, podem ocorrer discretas mas significativas variações, todos os resultados seguintes foram corrigidos para 100 g de peso corporal. O pesos renais de todos os grupos estudados após a injeção de glicerol foram superiores ao grupo controle ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls) e não diferiram entre si.

Na figura 3 apresentamos a comparação da evolução da creatinina sérica dos ratos da série I com os ratos da série II. Na série I utilizamos a dose de 10 ml/kg de glicerol a 50%, enquanto na série II a dose foi de 5 ml/kg. A creatinina sérica dos animais da série I foi significativamente maior em todos os

tempos analisados (teste "t" não pareado, 3 horas $p < 0.05$; 6, 12 e 24 horas $p < 0.001$)

FIGURA 3. Comparação da creatinina sérica em ratos com IRA induzida por glicerol nas doses 10ml/kg (série I) e 5 ml/kg (série II).

creatinina sérica (mg/dl)



* $p < 0.05$ série I vs série II

** $p < 0.001$ série I vs série II

Os resultados obtidos nos estudos funcionais da série II serão apresentados nas tabelas e gráficos que se seguem. Na tabela 3, mostramos o volume urinário após expansão hídrica, o clearance de creatinina e o clearance de lítio.

TABELA 3. Série II. Volume urinário, clearance de creatinina e clearance de lítio de ratos com IRA induzida por glicerol (5ml/kg)

	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
vol. urin. $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$	47.3 \pm 8.2	19.8 \pm 10.1*	34.6 \pm 13.2**	19.8 \pm 12.2*	28.1 \pm 11.4***
clear.creat $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$	331.3 \pm 100.0	302.3 \pm 125.6	230.5 \pm 74.1'	138.2 \pm 61.5''	96.7 \pm 43.8'''
clear. lítio $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$	74.6 \pm 25.1	57.4 \pm 21.1	131.6 \pm 46.5'''	100.8 \pm 42.0	65.5 \pm 26.3

* p< 0.05 vs controle e 6 horas

** p< 0.05 vs controle, 3 e 12 horas

*** p <0.05 vs controle

' p < 0.05 vs controle e 24 horas

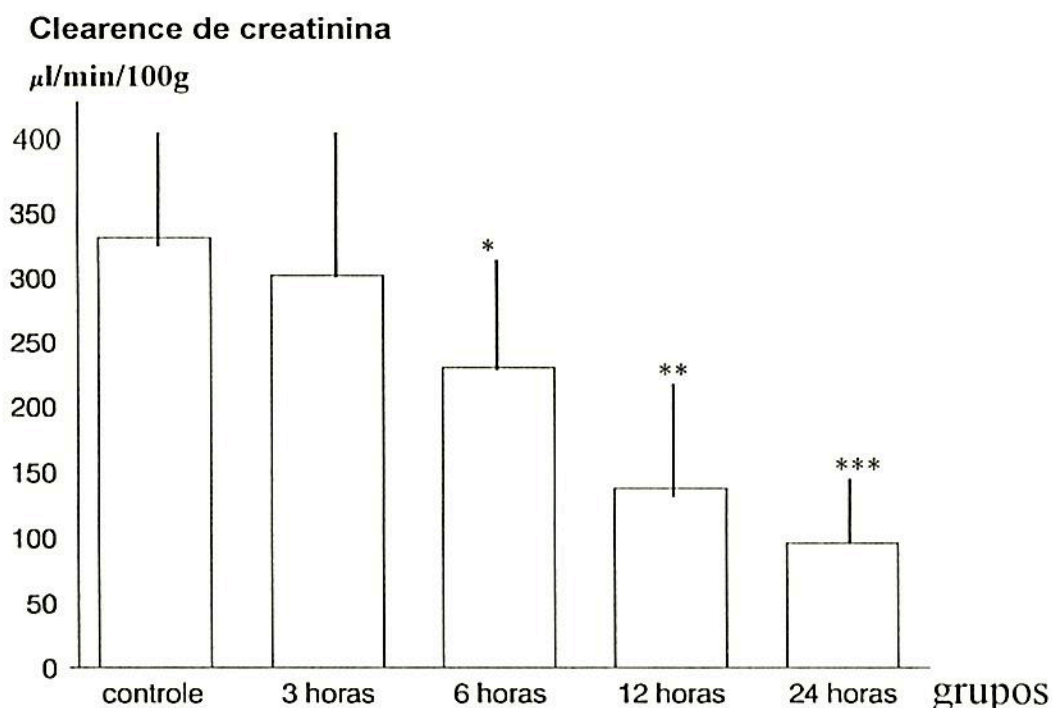
'' p< 0.05 vs controle e 3 horas

'''p< 0.05 vs controle, 3 e 6 horas

''''p< 0.05 vs controle, 3 e 24 horas

Observamos queda significativa da diurese em todos os grupos após a injeção de glicerol, embora esta redução seja menor às 6 horas do que às 3 e 12 horas. (p<0.001, ANOVA- Student Newman Keuls). O clearance de creatinina reduziu-se significativamente em relação ao controle, a partir das 6 horas (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls). Os grupos 12 e 24 horas apresentaram clearance de creatinina inferior ao grupo 3 horas e, apenas no grupo 24 horas, o clearance de creatinina foi inferior também ao grupo 6 horas (figura 4).

FIGURA 4. Série II. Clearance de creatinina em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)



* $p < 0.05$ vs controle

** $p < 0.05$ vs controle e 3 horas

*** $p < 0.05$ vs controle, 3 horas e 6 horas

Notamos aumento do clearance de lítio no grupo 6 horas, em relação aos outros grupos, exceto o grupo 12 horas. Os demais não diferem do controle ou entre si. ($p < 0.01$, ANOVA-Student Newman Keuls).

Na tabela 4 apresentamos o transporte de sódio ao longo do néfron, através dos valores de carga filtrada de sódio (C.F.Na), aporte distal de sódio (A.D.Na), e excreção urinária de sódio (Exc.Urin.).

TABELA 4. Série II. Carga filtrada, aporte distal e excreção urinária de sódio em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
C.F.Na $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$	48.1 \pm 14.3	41.3 \pm 17.5	32.4 \pm 10.7*	13.1 \pm 5.3**	14.1 \pm 6.5**
A.D.Na $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$	10.8 \pm 3.7	7.7 \pm 2.8	18.5 \pm 6.8***	13.1 \pm 5.3	11.8 \pm 5.6
Exc. Urin. $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$	0.114 \pm 0.047	0.169 \pm 0.098	0.295 \pm 0.219	0.363 \pm 0.173'	0.322 \pm 0.190

* $p < 0.05$ vs controle, 12 e 24 horas

** $p < 0.05$ vs controle, 3 e 6 horas

*** $p < 0.05$ vs controle, 3, 12 e 24 horas

' $p < 0.05$ vs controle

A carga filtrada de sódio foi menor às 6, 12 e 24 horas em relação ao controle ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls). A redução adicional que ocorre entre o grupo 6 horas e os posteriores, é significativa. O aporte distal no grupo 6 horas foi superior a todos outros grupos ($p < 0.01$, ANOVA-Student Newman Keuls) e a excreção urinária às 12 horas foi superior ao controle ($p < 0.05$, ANOVA-Student Newman Keuls). Como notamos, o aporte distal ou a excreção urinária de sódio não acompanham obrigatoriamente as variações na carga filtrada.

Na tabela 5 apresentamos a excreção fracional de sódio e lítio (FeNa e FeLi), o fluxo fracional de urina durante máxima diurese aquosa (expansão equivalente a 10% do peso corporal) e a relação U/P (urinária-plasmática) de creatinina.

TABELA 5. Série II. Fração de excreção de sódio, lítio, fluxo fracional urinário em máxima diurese e U/P de creatinina em ratos com IRA induzida por glicerol (5ml/kg)

	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
FeNa (%)	0.26±0.13	0.42±0.17	1.07±0.94	2.64±1.57	4.48±6.03*
FeLi (%)	24.8±12.8	20.8±6.5	59.6±14.3**	76.9±18.0***	71.0±14.0****
F.Fr. urin. max. (%)	16.0±7.0	6.5±3.1	15.1±5.0	13.4±6.6	32.4±12.4'
U/P creat.	6.8±3.1	17.0±5.3"	7.2±2.6	9.1±4.4	3.4±1.1

* p < 0.05 vs controle, 3 e 6 horas

** p < 0.05 vs controle, 3 e 12 horas

*** p < 0.05 vs controle, 3 e 6 horas

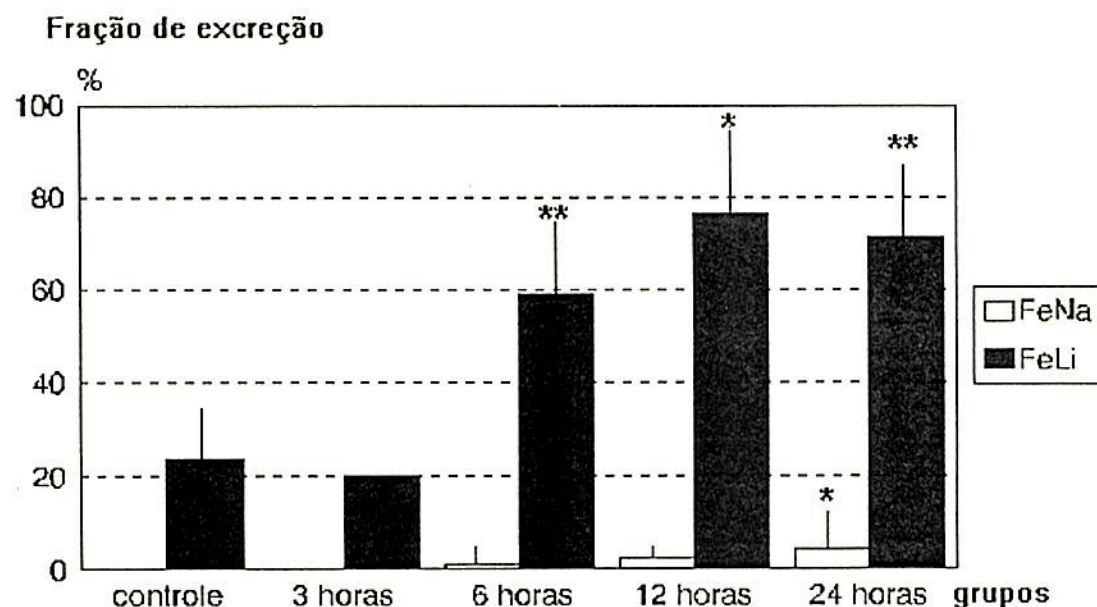
**** p < 0.05 vs controle e 3 horas

' p < 0.05 vs controle, 3, 6 e 12 horas

" p < 0.05 vs controle, 6, 12 e 24 horas

Durante a evolução da lesão renal neste modelo houve progressivo aumento da FeNa que só tornou-se significativo 24 horas após a lesão (p<0.05, ANOVA-Student Newman Keuls). Por outro lado, a FeLi sofreu aumento significativo a partir do grupo 6 horas (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls), mantendo nível semelhante às 12 e 24 horas, levemente superior a 6 horas (figura 5). O fluxo fracional urinário durante máxima diurese aumentou somente no grupo 24 horas (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls). A relação U/P de creatinina sofreu aumento significativo 3 horas após a injeção de glicerol (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls), retornando a níveis semelhantes ao controle nos grupos posteriores.

FIGURA 5. Série II. Fração de excreção de sódio e lítio em ratos com IRA induzida por glicerol (5ml/kg)



* $p < 0.05$ vs controle, 3 e 6 horas

** $p < 0.05$ vs controle e 3 horas

Na tabela 6, apresentamos os dados referentes à reabsorção fracional de sódio nos túbulos proximais e distais.

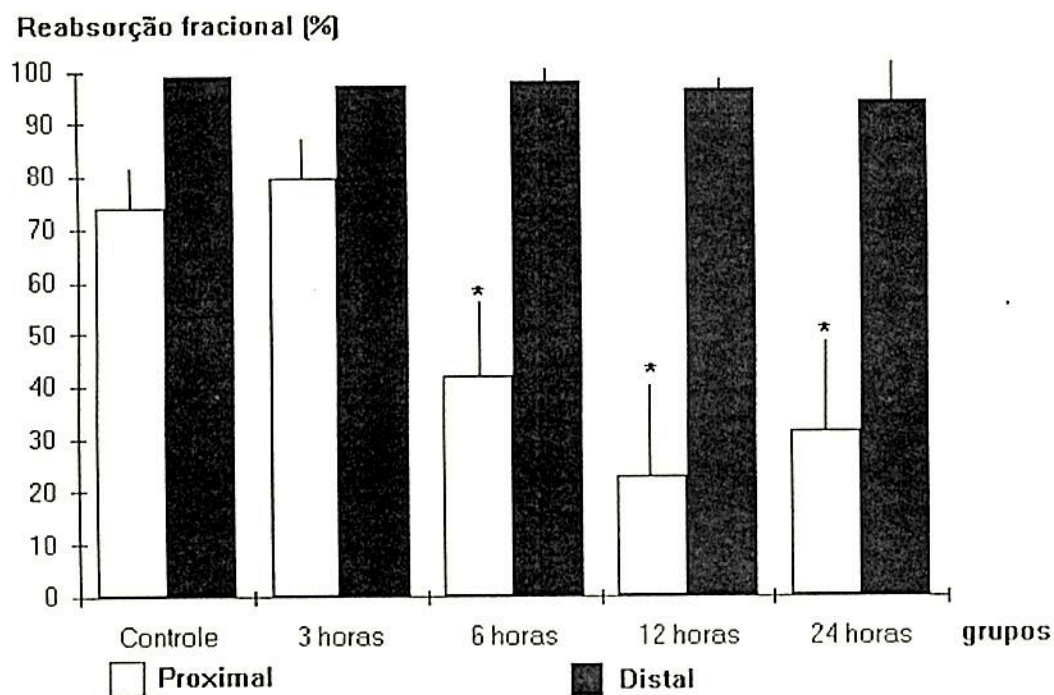
TABELA 6. Série II. Reabsorção fracional proximal e distal de sódio em ratos com IRA induzida por glicerol (5ml/kg)

	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
R.Fr.Prox. (%)	74,1±12,5	79,5±6,0	41,8±15,9*	22,9±17,9*	31,3±16,2*
R.Fr.Dist (%)	98,9±0,32	97,1±0,56	97,8±2,22	96,4±1,95	93,8±8,06

* $p < 0.05$ vs controle e 3 horas

A reabsorção fracional proximal de sódio reduziu-se intensamente nos grupos 6, 12 e 24 horas, apresentando valores significativamente inferiores aos grupos controle e 3 horas ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls). Por outro lado, a reabsorção fracional distal (relativa ao aporte distal) sofreu redução discreta, mais notória às 24 horas, quando é inferior ao grupo controle, mas a análise através de ANOVA não mostra diferença significativa entre os grupos (figura 6).

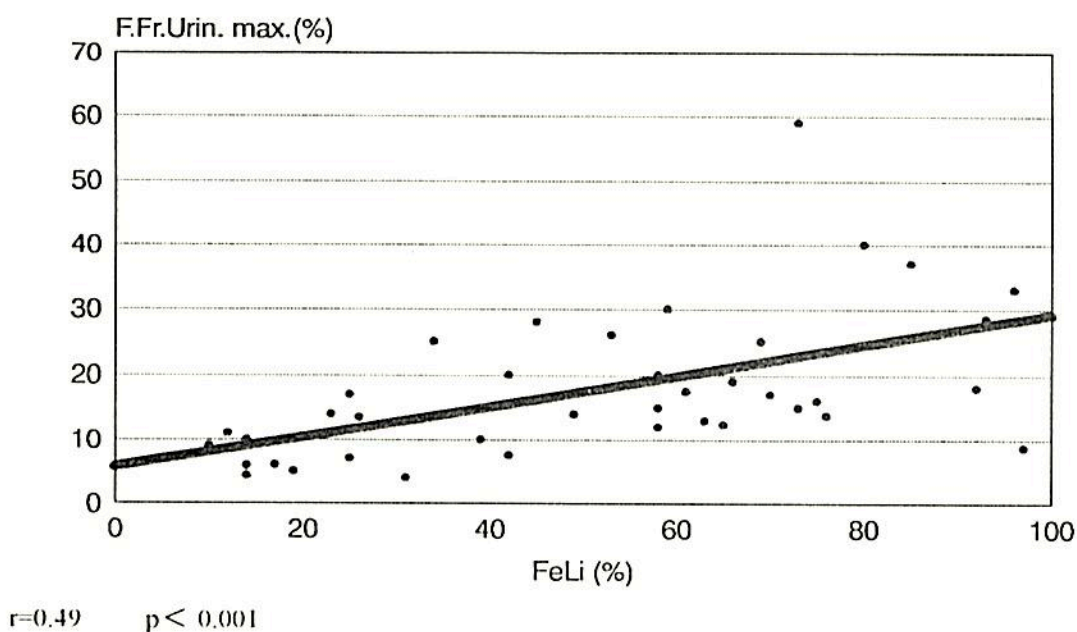
FIGURA 6. Série II. Reabsorção fracional tubular de sódio em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)



* $p < 0.05$ vs controle e 3 horas

O fluxo urinário pós-proximal pode ser estimado tanto pelo clearance de lítio quanto pelo fluxo urinário durante máxima diurese induzida por sobrecarga hídrica. Nos ratos com IRA-GLI encontramos correlação entre estas variáveis, corrigidas para a filtração glomerular, ou seja, entre a fração de excreção de lítio e fluxo fracional urinário durante máxima diurese aquosa (figura 7). O coeficiente de correlação nesta série foi 0.49, $p < 0.001$.

FIGURA 7. Série II. Correlação entre fração de excreção de lítio (FeLi) e fluxo fracional urinário em máxima diurese (F.Fr.urin.max.) em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg de peso)



Série III. Efeitos da nifedipina e do BN 52021 sobre a função renal e tubular na IRA-GLI.

Nesta série os grupos são identificados como : controle, glicerol, gli+nife (animais tratados com nifedipina após o glicerol), gli+BN (tratados com BN 52021 após o glicerol) e gli+nife+BN (receberam ambos tratamentos após o glicerol).

Na tabela 7 apresentamos o peso corporal e o peso renal dos ratos ao fim do estudo funcional.

TABELA 7. Série III. Peso corporal e renal de ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
peso corporal(g)	252.5±22.8	260.0±14.4	235.3±21.3	319.1±32.3*	245.1±18.9
peso renal (g/100g)	302.8±19.2	382.0±54.4**	324.2±24.0	315.0±33.7	347.6±16.0***

* $p < 0.05$ vs controle, glicerol, gli+nife e gli+nife+BN

** $p < 0.05$ vs controle, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

*** $p < 0.05$ vs controle

O grupo tratado com BN 52021 apresentava ratos com peso corporal superior aos demais grupos ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls). O peso renal foi maior no grupo glicerol, tanto em relação ao grupo controle como comparado com os animais tratados. Entre os ratos tratados, apenas o grupo gli+nife+BN mostrou peso renal superior ao controle ($p < 0.01$, ANOVA-Student Newman Keuls).

Na tabela 8 iniciamos a apresentação dos resultados dos estudos funcionais. Nesta tabela constam os valores do volume urinário, creatinina sérica, clearance de creatinina e clearance de lítio.

TABELA 8. Série III. Volume urinário, creatinina sérica, clearance de creatinina e clearance de lítio de ratos com IRA induzida por glicerol (5ml/kg)

	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
vol.urin. $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$	49.5 \pm 6.7	28.2 \pm 11.6*	46.7 \pm 11.9**	38.8 \pm 7.6**	43.1 \pm 13.5**
creat.sérica mg/dl	0.41 \pm 0.08	2.20 \pm 0.80*	0.68 \pm 0.23**'	1.44 \pm 0.77***	0.89 \pm 0.24**'
clear creat $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$	431.8 \pm 108.2	96.7 \pm 43.8*	264.9 \pm 103.5***	188.9 \pm 69.8***	227.0 \pm 41.8***
clear lítio $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$	90.5 \pm 21.9	65.5 \pm 26.3'	101.7 \pm 32.1**	103.7 \pm 25.9**	109.5 \pm 28.1**

* p < 0.05 vs controle, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

**p < 0.05 vs glicerol

***p < 0.05 vs controle e glicerol

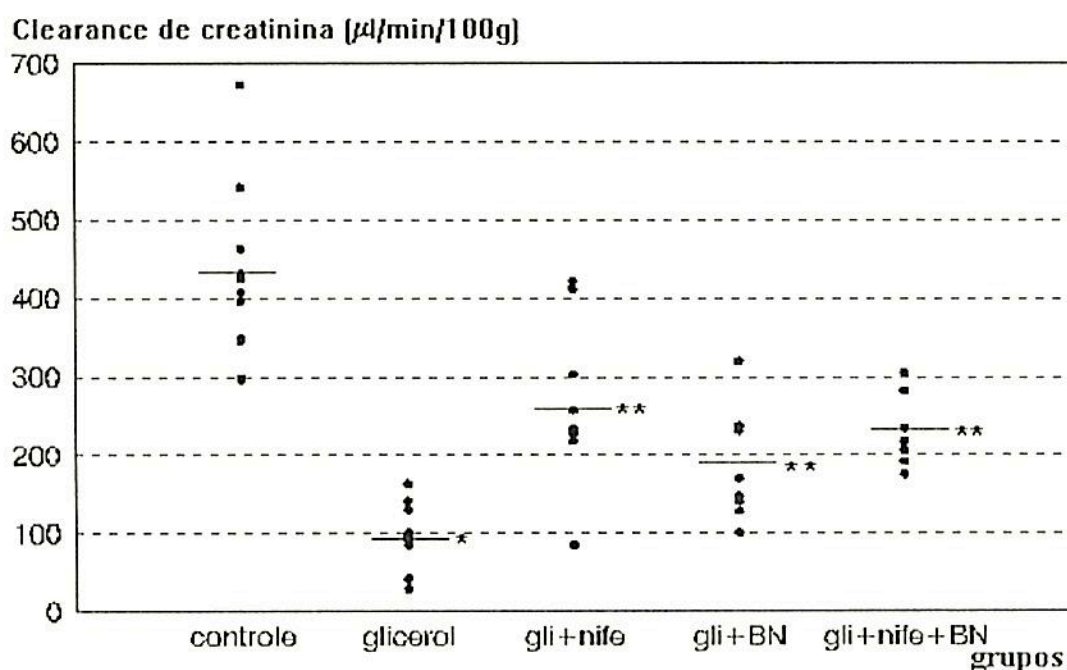
' p < 0.05 vs gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

*** p < 0.05 vs glicerol e gli+BN

O volume urinário no grupo glicerol foi inferior a todos os outros grupos (p < 0.001, ANOVA-Student Newman Keuls) que, por sua vez, não diferiram entre si. A creatinina sérica observada nos animais do grupo glicerol foi superior a todos os demais grupos (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls). Entre os animais tratados, apenas os que receberam BN 52021 apresentaram creatinina superior ao controle. O clearance de creatinina mostrou severa redução no grupo glicerol, sendo menor quando comparado tanto ao controle quanto a todos grupos tratados (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls). Os animais tratados (grupos gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN) apresentaram redução menos acentuada do clearance de creatinina porém, ainda assim, valores significativamente inferiores ao controle (figura 8). O clearance de lítio não diferiu

entre o controle e os demais grupos, porém, foi menor no grupo glicerol em relação aos ratos tratados ($p < 0.05$, ANOVA-Student Newman Keuls).

FIGURA 8. Série III. Clearance de creatinina em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)



* $p < 0.05$ vs controle, glicerol, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

** $p < 0.05$ vs controle e glicerol

Na tabela 9, apresentamos os valores observados de transporte de sódio ao longo do néfron, através dos valores de carga filtrada (C.F.Na), aporte distal (A.D.Na) e excreção urinária de sódio (Exc. Urin.).

TABELA 9. Série III. Carga filtrada, aporte distal e excreção urinária de sódio em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
C.F.Na $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$	61.2 \pm 16.3	14.1 \pm 6.5*	39.2 \pm 15.4**	27.9 \pm 10.5**	33.2 \pm 7.2**
A.D.Na $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$	12.9 \pm 3.1	9.0 \pm 4.0*	14.9 \pm 4.6	15.4 \pm 3.8	15.7 \pm 3.9
Exc.Urin. $\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$	0.132 \pm 0.08	0.322 \pm 0.19'	0.214 \pm 0.17	0.210 \pm 0.13	0.154 \pm 0.12

* $p < 0.05$ vs controle, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

** $p < 0.05$ vs controle e glicerol

' $p < 0.05$ vs controle

A carga filtrada de sódio reduziu significativamente no grupo glicerol, em relação ao controle e aos animais tratados ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls). Os grupos tratados apresentaram carga filtrada inferior ao grupo controle. Porém, o aporte distal equiparou-se entre os animais tratados e os controles, persistindo inferior a todos os outros grupos apenas nos ratos do grupo glicerol ($p < 0.01$, ANOVA-Student Newman Keuls). Apenas os animais do grupo glicerol mostram excreção urinária de sódio superior ao controle ($p < 0.05$, ANOVA-Student Newman Keuls).

Na tabela 10 apresentamos os valores da fração de excreção de sódio, fração de excreção de lítio, fluxo fracional de urina durante máxima diurese aquosa (induzida por sobrecarga de 10% do peso corporal) e relação U/P (urinária/plasmática) de creatinina.

TABELA 10. Série III. Fração de excreção de sódio, lítio, fluxo fracional urinário durante máxima diurese e U/P de creatinina em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
FeNa (%)	0.23±0.16	4.48±6.03*	0.88±1.34	0.90±0.89	0.47±0.33
FeLi (%)	21.9±6.6	71.0±14.0*	41.0±13.3**	57.3±15.8***	49.7±17.6'
F.Fr.urin. max.(%)	11.9±2.8	32.4±12.4*	18.7±4.0'	22.2±6.6'	19.4±7.1'
U/P creat.	8.8±2.7	3.4±1.1"	5.5±1.4'	4.8±1.3"	5.9±2.8"

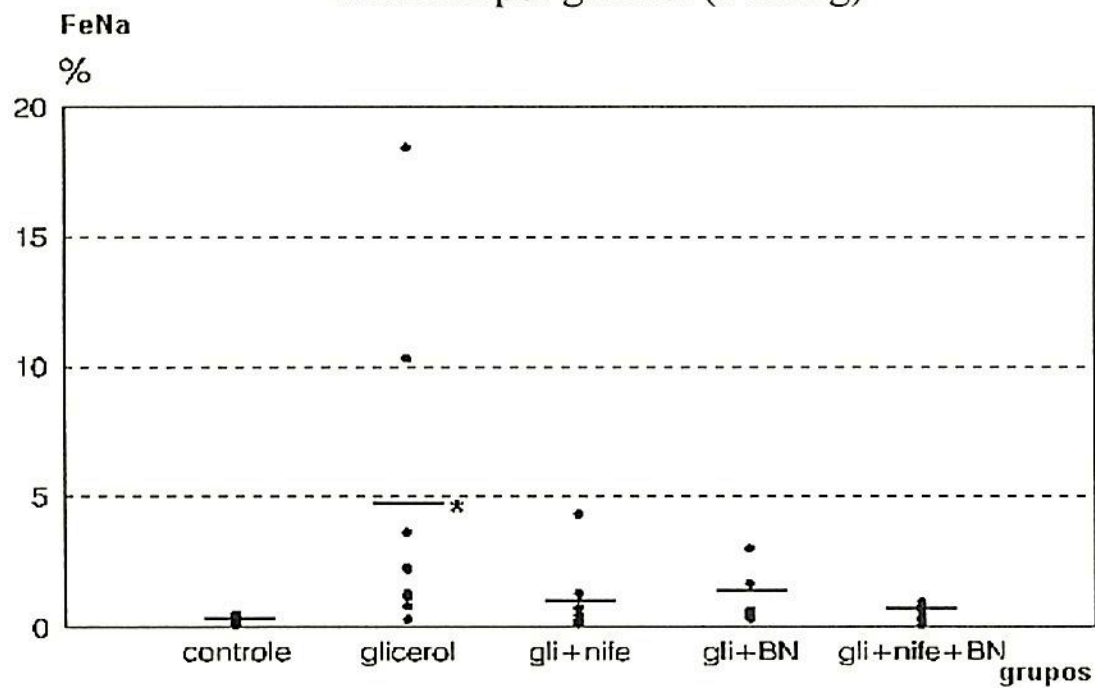
* p < 0.05 vs controle, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

** p < 0.05 vs controle, glicerol e gli+BN *** p < 0.05 vs controle, glicerol e gli+nife

' p < 0.05 vs controle e glicerol " p < 0.05 vs controle

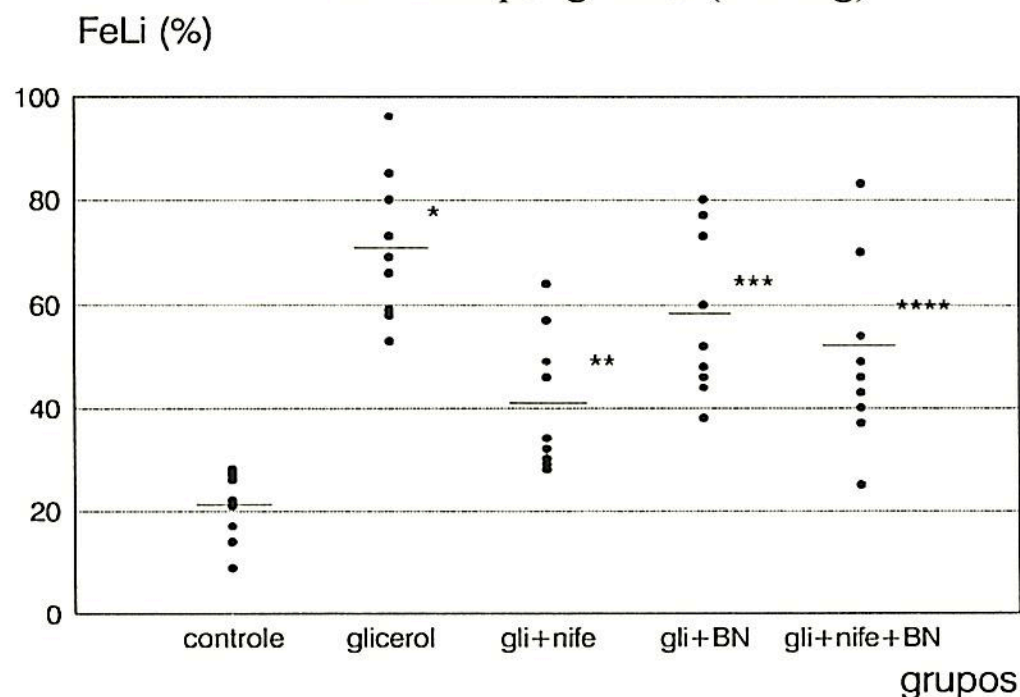
A fração de excreção de sódio estava aumentada no grupo glicerol em relação aos demais grupos (p<0.05, ANOVA-Student Newman Keuls, figura 9). Os animais tratados não diferiram do grupo controle. Por outro lado, a fração de excreção de lítio estava aumentada em relação ao controle em todos os grupos. O grupo glicerol mostrou valores de FeLi superiores aos grupos gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN. O grupo gli+BN teve FeLi superior ao grupo gli+nife (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls, figura 10). O fluxo fracional urinário, durante máxima diurese, estava aumentado em todos os grupos em relação ao controle. Os ratos tratados apresentaram fluxo fracional urinário inferior ao grupo glicerol (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls). A relação U/P de creatinina estava menor em todos os grupos experimentais, em relação aos valores observados no grupo controle (p<0.001, ANOVA-Student Newman Keuls).

FIGURA 9. Série III. Fração de excreção de sódio em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)



* $p < 0.05$ em relação ao controle, gli+nife, gli+BN, gli+nife+BN

FIGURA 10. Série III. Fração de excreção de lítio em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)



* $p < 0.05$ vs controle, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

** $p < 0.05$ vs controle, glicerol e gli+BN

*** $p < 0.05$ vs controle, glicerol e gli+nife

**** $p < 0.05$ vs controle e glicerol

Na tabela 11 apresentamos a reabsorção fracional de sódio nos túbulos proximais e distais.

TABELA 11. Série III. Reabsorção fracional proximal e distal de sódio em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
Reab.Fr.Prox.(%)	77.9±6.4	31.1±16.2*	58.3±13.2**	40.7±15.9***	49.6±17.5****
Reab.Fr.Distal(%)	98.9±0.5	93.8±8.0 '	98.1±2.3	98.3±1.7	99.0±0.6

* $p < 0.05$ vs controle, gli+nife e gli+nife+BN

** $p < 0.05$ vs controle, glicerol e gli+BN

*** $p < 0.05$ vs controle e gli+nife

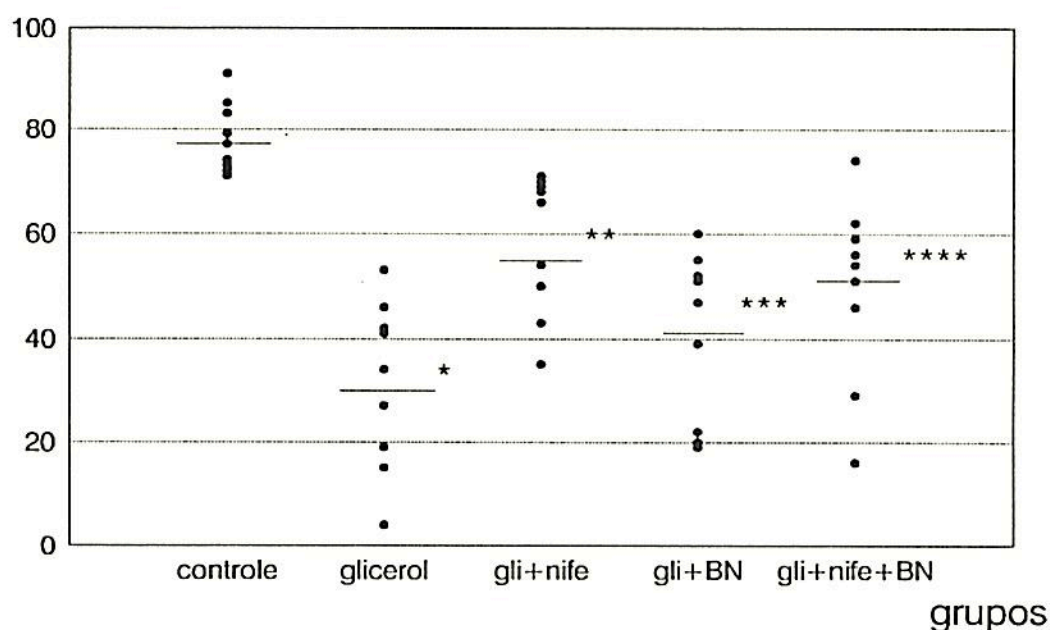
**** $p < 0.05$ vs controle e glicerol

' $p < 0.05$ vs controle, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

A reabsorção fracional proximal de sódio estava reduzida em todos os grupos experimentais em relação ao controle. Os grupos gli+nife e gli+nife+BN apresentaram reabsorção proximal superior ao grupo glicerol. O grupo gli+nife mostrou valores de reabsorção proximal superiores também ao grupo gli+BN ($p < 0.001$, ANOVA-Student Newman Keuls, figura 11). A reabsorção fracional distal estava significativamente reduzida apenas no grupo glicerol ($p < 0.05$, ANOVA-Student Newman Keuls).

FIGURA 11. Série III. Reabsorção fracional proximal de sódio em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

Reab.Fr.Prox. (%)



* $p < 0.05$ vs controle, gli+nife e gli+nife+BN

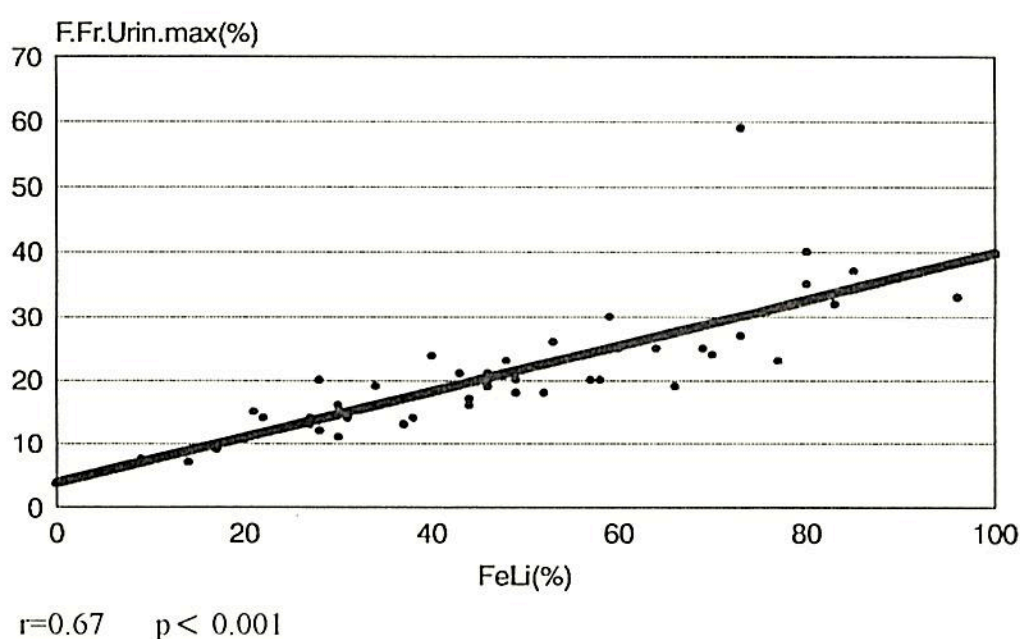
** $p < 0.05$ vs controle, glicerol e gli+BN

**** $p < 0.05$ vs controle e glicerol

*** $p < 0.05$ vs controle e gli+nife

Observamos nesta série correlação significativa ($r = 0.67$, $p < 0.001$) entre fração de excreção de lítio (FeLi) e fluxo fracional urinário em máxima diurese (Fl.Fr.Urin.max., figura 12).

FIGURA 12. Série III. Correlação entre fração de excreção de lítio (FeLi) e fluxo fracional urinário durante máxima diurese (F.Fr.Urin.max.) em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)



Série IIIA. Avaliação histológica dos animais com IRA-GLI tratados com nifedipina ou BN 5202.

Os ratos do grupo controle não apresentaram alterações histológicas. Por isso, restringimos a comparação aos grupos glicerol, glicerol+nifedipina (gli+nife) e glicerol+BN 52021 (gli+BN). Apresentaremos os resultados da análise semi-quantitativa na tabela 12.

TABELA 12. Série III A. Avaliação histológica semi-quantitativa em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

	glicerol	gli+nife	gli+BN
cel.epit.descam.	3.17 +/- 2.35	4.37 +/- 1.77 *	5.10 +/- 2.62 *
focos necrose	1.47 +/- 1.23	0.98 +/- 0.99	1.65 +/- 2.25
cilindros prot.	3.00 +/- 2.56	0.40 +/- 0.76 *	1.58 +/- 1.74 **
cilindros granul.	1.06 +/- 1.20	1.83 +/- 1.45 *	3.60 +/- 2.40 **

cel. epit. descam. : células epiteliais descamadas; cilindros prot. : cilindros proteicos; cilindros granul. : cilindros granulados

* $p < 0.05$ vs glicerol

** $p < 0.05$ vs glicerol e gli+nife

Os animais tratados apresentaram menor número de cilindros proteicos do que o grupo glicerol principalmente quando receberam nifedipina ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis e teste diferencial de Dunn). Por outro lado, apresentaram maior número de células epiteliais descamadas e cilindros granulados (respectivamente $p < 0.01$ e $p < 0.001$, Kruskal-Wallis e teste diferencial de Dunn). A quantidade de focos de necrose não foi diferente quando analisada pelo teste de Kruskal-Wallis-Dunn.

Série III B. Efeitos da nifedipina e do BN 52021 em ratos normais desidratados

Para avaliar a ação das drogas utilizadas na série III sobre a função renal de ratos submetidos a jejum noturno de 12 horas, realizamos estudos funcionais 3 horas após administração das drogas, na mesma dosagem anterior, sem a injeção prévia de glicerol e comparamos a resposta ao grupo controle da série 2.

Na tabela 13 apresentamos o peso corporal dos ratos, o peso renal após o estudo funcional, o volume urinário e o clearance de creatinina.

TABELA 13. Série III B. Peso corporal dos ratos, peso renal, volume urinário e clearance de creatinina de ratos normais desidratados tratados com nifedipina ou BN 52021

	controle	nifedipina	BN 52021
peso ratos(g)	236.4 \pm 11.0	242.1 \pm 11.3	247.1 \pm 16.1
peso renal (g/100g)	295.8 \pm 16.1	287.4 \pm 15.3	302.0 \pm 20.2
vol.urin.(μ l/min/100g)	47.3 \pm 8.2	57.4 \pm 7.5 *	40.3 \pm 5.4
clear.creat(μ l/min/100g)	331.3 \pm 100.0	490.3 \pm 155.5*	301.8 \pm 87.3

* $p < 0.05$ vs controle e BN52021

Os pesos dos ratos e renais foram semelhantes em todos os grupos desta série. Os ratos que receberam nifedipina, após jejum de 12 horas, mostraram maior diurese e maior clearance de creatinina quando comparados tanto ao grupo controle, quanto aos animais tratados com BN 52021 ($p < 0.01$, ANOVA, Student Newman Keuls).

Na tabela 14, apresentamos os dados referentes ao manuseio tubular de sódio: carga filtrada de sódio, aporte distal de sódio, excreção urinária de sódio, fração de excreção de sódio, fração de excreção de lítio, reabsorção fracional proximal de sódio e reabsorção fracional distal de sódio.

TABELA 14. Série III B. Manuscio tubular de sódio em ratos normais desidratados tratados com nifedipina ou BN 52021

	controle	nifedipina	BN 52021
C F Na(μ Eq/min/100g)	48.1 \pm 14.3	69.1 \pm 23.0*	41.9 \pm 12.9
A D Na(μ Eq/min/100g)	10.8 \pm 3.7	11.8 \pm 4.3	7.0 \pm 1.9**
Exc. Urin. Na(μ Eq/min/100g)	0.11 \pm 0.05	0.15 \pm 0.06	0.06 \pm 0.02**
FeNa(%)	0.26 \pm 0.13	0.24 \pm 0.13	0.14 \pm 0.05
FeLi(%)	24.9 \pm 12.8	19.0 \pm 10.5	18.4 \pm 7.0
Rcab.Fr.Prox.(%)	74.1 \pm 12.5	80.7 \pm 10.5	81.5 \pm 6.9
Rcab.FR.Dist.(%)	98.9 \pm 0.32	98.6 \pm 0.49	99.1 \pm 0.17

* p < 0.05 vs controle e BN52021

** p < 0.05 vs controle e nifedipina

Observamos aumento na carga filtrada de sódio no grupo tratado com nifedipina, tanto em relação ao controle quanto ao grupo BN ($p < 0.05$, ANOVA, Student Newman Keuls). O aporte distal e a excreção urinária de sódio foram significativamente menores no grupo BN quando comparado aos outros ($p < 0.05$, ANOVA, Student Newman Keuls). As frações de excreção de sódio e lítio, assim como a reabsorção fracional proximal e distal de sódio nos grupos tratados não diferiram em relação ao controle.

Série III C. Efeito da nifedipina e do BN 52021 sobre a lesão muscular na IRA-GLI

A lesão muscular após a injeção de glicerol foi comparada entre os ratos tratados com glicerol, BN e ratos não tratados. A rabdomiólise foi

estimada através da dosagem de CPK sérica 6 horas após a injeção do glicerol e das drogas testadas.

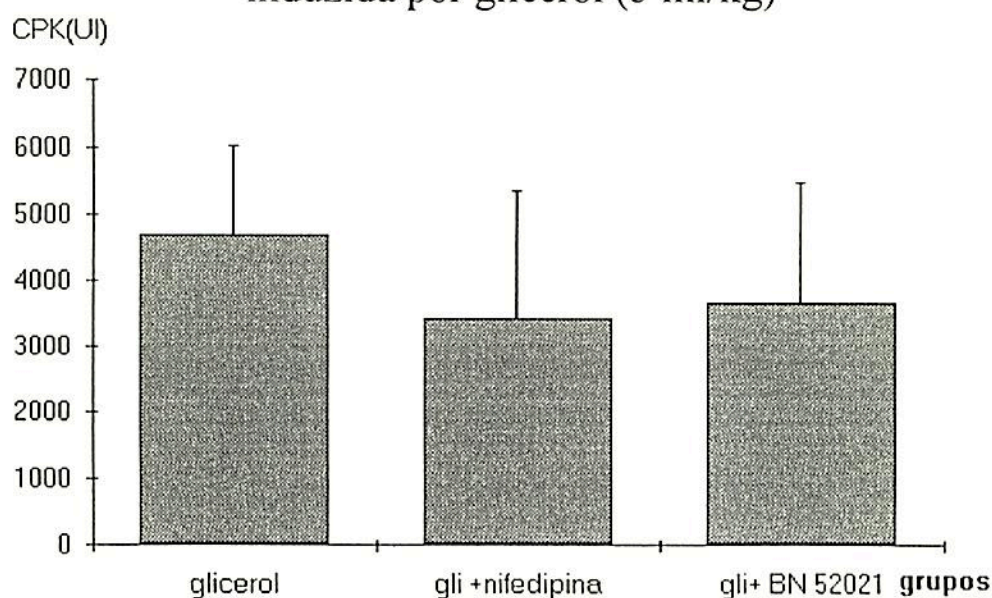
Na tabela 15 e figura 11 apresentamos o peso corpóreo e o CPK sérico dos ratos desta série.

Tabela 15. Série III C. Peso corporal e CPK sérico de ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)

	glicerol	gli+nifedipina	gli+BN 52021
peso corporal (g)	197,3±10,8	198,4±13,3	190,4±10,7
CPK (UI)	4696±1789	3420±2827	3665±2303

Não houve diferença significativa entre os ratos que receberam apenas glicerol, ou glicerol associado às drogas testadas em relação tanto ao peso dos ratos quanto em relação aos níveis de CPK sérico (ANOVA).

Figura 11. Série III C. Níveis séricos de CPK em ratos com IRA induzida por glicerol (5 ml/kg)



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Série I

O modelo glicerol assemelha-se à insuficiência renal aguda pós-traumática humana. A mioglobínúria participa da patogênese da IRA, na prática clínica, em 5 a 10 % dos casos (100). Tanto no modelo experimental quanto durante a rabdomiólise traumática humana há grande sequestro do volume intravascular na musculatura lesada e liberação na circulação de substâncias intracelulares como a mioglobina, enzimas e eletrólitos (101).

O aumento súbito do hematócrito em nossos ratos, de 51.6% para 54.1% três horas após a injeção de glicerol, é uma indicação indireta da redução da volemia na fase precoce do modelo. Cabe ressaltar que este aumento do hematócrito incidiu em animais já hemoconcentrados, após uma noite em jejum e, portanto, com o hematócrito significativamente superior aos controles hidratados (48.1%). Estes dados são compatíveis com os estudos que demonstraram redução da volemia na fase precoce da IRA-GLI (6,18,19). Após a injeção de glicerol os ratos tiveram livre acesso à água e quando sacrificados, 24 horas após o glicerol, notamos redução significativa do hematócrito em relação ao controle (40.1%). Esta queda tardia do hematócrito pode ser decorrente da recomposição da volemia, obtida através de ingestão de água, assim como da ocorrência de hemólise induzida pelo glicerol(6), que pode inclusive aumentar a pigmentúria e participar da nefrotoxicidade.

A concentração sérica de creatina-fosfoquinase (CPK) atinge altos níveis com pico, em nosso estudo, cerca de 6 horas após a lesão muscular. Nos pacientes com suspeita de rabdomiólise, com ou sem IRA, a

forma mais simples de se confirmar o diagnóstico se faz através da dosagem da CPK sérica, que atinge pico no primeiro dia após a lesão e, apresenta redução gradual ao longo de vários dias, permitindo o diagnóstico nos dias subsequentes à rabdomiólise (102).

Todos os animais submetidos à injeção de glicerol na dose de 10 ml/kg, precedida de jejum de 12 horas, desenvolveram IRA. Porém vários animais faleceram nas primeiras horas após a lesão e necessitamos utilizar mais animais para compor os grupos, principalmente 12 e 24 horas. Por esta razão e também por pretendemos estudar clearances em gaiolas metabólicas (portanto estudar preferencialmente forma não oligúrica de IRA), resolvemos utilizar nos estudos funcionais, das séries seguintes, a dose de 5 ml/kg de glicerol a 50%, após jejum de 12 horas.

A maior gravidade da IRA induzida por 10 ml/kg de glicerol pôde ser notada quando comparamos a creatinina sérica dos ratos da série I e II (figura 3). Dessa forma, a redução da dose provocou forma mais atenuada de insuficiência renal e como veremos adiante, forma não oligúrica, que possibilitou maior confiabilidade nos resultados obtidos em gaiolas metabólicas.

Estudo da função tubular

A lesão tubular na IRA isquêmica é salpicada e focal, podendo ser encontrada em qualquer segmento tubular, mas acometendo principalmente a pars reta do túbulo proximal e a porção espessa medular da alça de Henle e, secundariamente, porções do túbulo contornado proximal e distal, conforme observado em estudos de cultura de células tubulares e análise morfológica de néfrons microdissecados (75,103,104). Na IRA

nefrotóxica a lesão é mais uniforme, englobando a pars reta e o túbulo contornado proximal da maioria dos néfrons (103).

Na patogênese da IRA induzida por glicerol participam tanto a isquemia renal quanto a nefrotoxicidade da mioglobina e os segmentos tubulares acometidos podem ser variáveis. São escassos os trabalhos da literatura focalizando a função tubular no modelo glicerol. Westenfelder e col.(97) demonstraram que apenas as funções proximais estavam comprometidas no modelo glicerol, enquanto, Scherzer e col.(98) encontraram redução da atividade da bomba de sódio apenas em segmentos distais.

A análise da função tubular, em nosso trabalho, foi baseada na técnica de clearance de lítio. O clearance de lítio é a técnica indireta que melhor permite estimar a reabsorção proximal de sódio (106,107). A excreção fracional de urina durante máxima diurese induzida por expansão hídrica e, portanto, diurese independente da ação do hormônio antidiurético também permite avaliar a reabsorção proximal embora com menor fidelidade, pois mesmo com o ADH suprimido, cerca de 50 a 60% do fluxo pós-proximal continua sendo reabsorvido nos segmentos distais (108). A técnica de micropunção tubular permite a medida direta da reabsorção proximal de sódio e água, porém, apenas os túbulos dos néfrons superficiais são acessíveis e não representam bem a função global renal. Além disso, a pars reta do túbulo proximal é inacessível à micropunção impedindo a determinação da reabsorção de sódio em toda a extensão do túbulo proximal.

Para a técnica de clearance de lítio permitir uma avaliação confiável da reabsorção proximal de sódio, algumas condições fisiológicas devem ser respeitadas. Em primeiro lugar a sobrecarga de lítio não deve

levar a concentrações séricas superiores a 0.4 mEq/l, pois níveis séricos superiores podem afetar a função renal e a reabsorção renal de eletrólitos (109). A sobrecarga de lítio, antes do estudo, é necessária, pois a concentração habitual de lítio no soro é da ordem de 0.2 μ Eq/l, tornando difícil a sua dosagem. Em nosso estudo a concentração sérica de lítio não ultrapassou 0.4 mEq/l (tabelas 21, 29 e 37). Outra condição necessária para a eficiência do método é que o lítio seja filtrado livremente pelo glomérulo. Estudo farmacocinético demonstrou que o íon lítio não se liga às proteínas plasmáticas e é filtrado livremente pelo glomérulo (110). Finalmente, durante o manuseio tubular do lítio é fundamental que ele seja reabsorvido à mesma taxa que o sódio no túbulo proximal e que não seja nem reabsorvido, nem secretado, nos segmentos pós-proximais dos túbulos.

Hayslett e col (111) em estudo de micropunção tubular determinaram que a reabsorção proximal de lítio é proporcional à de sódio e água, pois encontraram no fim do túbulo contornado proximal relação entre a concentração de lítio no fluido tubular e plasma igual a 1. Neste nível havia ocorrido reabsorção de 57% da carga filtrada destes íons. No início do túbulo distal mais 18% do lítio havia sido reabsorvido, que poderia ter ocorrido tanto na pars reta do túbulo proximal quanto na alça de Henle, ou em ambos. Considerando que a capacidade reabsortiva da pars reta de néfrons superficiais corresponde a 20 ou 25% da reabsorção proximal, seria possível que a reabsorção de lítio entre o fim do túbulo contornado proximal e início do distal tivesse ocorrido apenas na pars reta.

Estudo recente de micropunção (112) demonstrou que ratos tratados com furosemide apresentaram aumento intenso da carga de lítio no início do túbulo distal, sem modificar a carga no fim do túbulo contornado proximal, sugerindo que quantidade significativa de lítio é reabsorvida na

alça de Henle. Imai e col.(113) sugeriram que na alça descendente e na porção fina da ascendente de néfrons profundos haja alta permeabilidade ao lítio. Taniguchi e col.(114) mediram a concentração de lítio e outros eletrólitos no fluido intersticial da região papilar, em ratos controle e tratados com furosemide. A partir destes dados, utilizando simulação em computador, determinaram o padrão de transporte de lítio ao longo da alça de Henle e concluíram que ocorre reabsorção substancial de lítio nesta região. Os ratos tratados com furosemide e, portanto, com redução do gradiente de concentração osmótica cortico-medular apresentaram redução evidente da reabsorção de lítio na alça de Henle.

Outras drogas como a indometacina (115) e a vasopressina (116) provocam aumento do gradiente osmótico medular e facilitam a reabsorção de lítio na alça de Henle. Por outro lado, estudos prévios demonstraram que a sobrecarga hídrica não interfere com a excreção urinária de lítio (116,117), nem com a reabsorção fracional de sódio (118). Este dado parece contrastar com uma ação facilitadora do ADH sobre a reabsorção de lítio na alça de Henle, mas esta ação do ADH só é observado em condições extremas, quando o volume urinário é muito baixo. Em nossos experimentos, submetemos os ratos a sobrecarga hídrica equivalente a 10% do peso corporal, antes dos estudos funcionais, visando bloquear a secreção de hormônio anti-diurético e manter alto volume urinário, dessa forma minimizando a participação da alça de Henle na reabsorção de lítio.

Os estudos de micropunção tubular (111,112) demonstraram que a carga de lítio que chega no início do túbulo distal não difere da excreção urinária e que, portanto, em néfrons superficiais de ratos normossódicos não ocorre reabsorção de lítio nos túbulos distais e coletores. Porém, em animais submetidos a dieta hipossódica há grande queda na

fração de excreção de lítio (119), fato que não é observado em humanos (120). O amiloride, diurético com ação apenas em canais de eletrólitos na membrana luminal do túbulo distal e do túbulo coletor, reverte quase totalmente a redução da fração de excreção de lítio induzida pela dieta hipossódica (119), demonstrando a importância da reabsorção distal nesta circunstância. Estudo prévio em nosso laboratório (117) com ratos submetidos à mesma dieta utilizada em nosso trabalho e com fração de excreção de sódio um pouco menor que por nós observada, demonstrou que o amiloride não alterou excreção urinária de lítio, apesar de provocar natriurese, descartando a possibilidade de reabsorção distal de lítio em nossas condições experimentais.

Apesar dos cuidados que tivemos em minimizar o potencial de reabsorção pós-proximal de lítio, não é possível excluir pequena participação da alça de Henle na reabsorção deste íon. Estima-se que em condições que não propiciem aumento na reabsorção de lítio pela alça de Henle, assim como em nosso estudo, cerca de 10% da reabsorção tubular ocorra neste segmento (107) e, ao extrapolarmos a reabsorção proximal de sódio baseado no clearance de lítio, devemos considerar que estamos englobando esta participação no cálculo e superestimando levemente esta medida.

Observamos correlação significativa entre a fração de excreção de lítio e diurese fracional durante expansão hídrica, tanto nos experimentos da série II quanto nos da série III. Este achado, em ratos com IRA induzida por glicerol, assemelha-se com as correlações descritas entre os dois métodos em humanos normais, com diferentes ingestas de sal (121,122) e dá sustentação ao emprego da técnica de clearance de lítio no modelo experimental que estudamos.

Série II

A maioria dos ratos, tanto controles quanto lesados, que participaram dos estudos funcionais da série II e III, apresentaram poliúria decorrente da expansão hídrica aplicada nos 80 minutos que precederam os estudos. O volume urinário habitual destes animais é de cerca de 3 $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ de rato, enquanto em nosso estudo a maioria dos animais apresentou diurese entre 10 e 50 $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{ g}$. A utilização da dose de glicerol de 5ml/kg, associada à expansão, resultou em modelo de IRA não oligúrica e permitiu maior acurácia no cálculo dos clearances, reduzindo o erro implícito na coleta em gaiola metabólica. Apesar de poliúricos, todos os ratos lesados na série II, apresentaram diurese significativamente menor que o grupo controle.

Em estudos com ratos anestesiados, utilizando 10 ml/kg de glicerol precedido de jejum, nota-se queda acentuada da taxa de filtração glomerular 3 horas após a lesão (13,15,66). Em nosso estudo o clearance de creatinina, 3 horas após o glicerol, não foi diferente do controle. Entendemos que a menor dose de glicerol utilizada, assim como o efeito hemodinâmico da expansão hídrica antes do estudo funcional, foram responsáveis pela manutenção da filtração glomerular neste momento. Nos demais grupos, mesmo aplicando-se igualmente a expansão hídrica, observamos redução da filtração glomerular, que foi mais acentuada nos grupos mais tardios, isto é, 12 e 24 horas. Este resultado coincide com os dados de Reineck e col.(15) que mostraram proteção da função renal com expansão salina, na fase precoce do modelo glicerol. Obviamente, a capacidade de expansão volêmica da salina é muito superior à da água,

porém o grande volume de água que utilizamos poderia compensar sua baixa capacidade expansora.

Na fase precoce da IRA-GLI (3 horas) notamos preservação do clearance de creatinina, queda do volume urinário, redução da fração de excreção de sódio, discreto e não significativo aumento da reabsorção fracional proximal de sódio e aumento significativo na relação U/P de creatinina ($U/P=17$), quando comparamos ao grupo controle. Este padrão de resposta fisiológica é semelhante à observada na fase inicial da resposta renal à hipoperfusão (123). A filtração glomerular é mantida graças ao mecanismo de auto-regulação renal, provavelmente às custas de aumento na fração de filtração, estimulando a reabsorção tubular de sódio e água ao nível proximal por gradiente oncótico no capilar peri-tubular.

Nas fases seguintes surgem sinais claros de lesão tubular e a filtração glomerular cai progressivamente durante todo o período de observação. No grupo 24 horas a filtração glomerular corresponde a 29% do observado no grupo controle.

A fração de excreção de sódio e a diurese fracional máxima aumentaram significativamente apenas 24 horas após a indução da IRA, correspondendo ao momento em que o grau de necrose tubular é mais intenso na análise histológica do modelo (3,105). Por outro lado, a fração de excreção de lítio sofreu aumento significativo bem mais precoce. Este aumento surgiu no grupo 6 horas e manteve-se nos grupos posteriores. O incremento na fração de excreção de lítio chega a ser de 50% nos grupos tardios e, portanto, é decorrente primariamente de acometimento dos túbulos proximais, já que apenas 10% da reabsorção pode ocorrer na alça de Henle. Este dado é bastante interessante, visto que a fração de excreção de lítio comportou-se como um marcador precoce da disfunção tubular, neste

modelo de IRA, precedendo alterações da fração de excreção de sódio, assim como as manifestações histológicas de necrose tubular aguda (3).

A análise do comportamento da reabsorção tubular segmentar de sódio mostra comprometimento mais precoce e intenso da função proximal. Observamos queda acentuada da reabsorção fracional proximal, a partir de 6 horas após a indução da IRA. A reabsorção fracional proximal dos grupos controle e 3 horas é de cerca de 75% e cai para 20 a 40% nos grupos posteriores. Já, a queda na reabsorção fracional distal só é notada no grupo 24 horas, caindo de cerca de 99% no grupo controle para 94% às 24 horas, sem atingir significância estatística. Esses dados demonstram que o segmento proximal é o mais lesado funcionalmente no modelo glicerol.

A maior sensibilidade do lítio, em acusar distúrbio da reabsorção tubular, pode decorrer do tipo de manuseio que este íon sofre nos néfrons. Como sua reabsorção é basicamente proximal e, em pequena parte na alça de Henle, sua excreção estará aumentada em patologias que afetem primariamente estes segmentos. Por sua vez, o sódio tem a regulação fina de sua reabsorção no túbulo distal e coletor. O menor comprometimento funcional dos túbulos distais com preservação da reabsorção fracional distal poderia manter equilibrada a excreção urinária de sódio, apesar de maior aporte distal nas fases iniciais da lesão renal deste modelo. O grupo 6 horas exemplifica bem este raciocínio, pois apresenta aporte distal de sódio maior que os demais grupos e excreção urinária de sódio semelhante à deles.

Nossos dados são compatíveis aos do estudo, já citado, de Westenfelder e col. (97), que demonstraram várias funções tubulares proximais comprometidas e distais preservadas, no modelo glicerol. Por outro lado, Scherzer e col.(98) demonstraram redução da atividade da

bomba de sódio apenas em segmentos distais do néfron. Em todos estes estudos a avaliação da função tubular foi feita 24 horas após a injeção de glicerol e o tempo de evolução não explica a discrepância dos resultados. A atividade de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ após transplante renal em humanos (124), que evoluíram com IRA, mostra padrão semelhante ao encontrado por Scherzer e col. na IRA-GLI, enquanto na IRA nefrotóxica, induzida por folato (125), a atividade proximal de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ cai a zero e a atividade distal está mantida. Estes dados sugerem que o insulto renal isquêmico altera mais a reabsorção distal enquanto as substâncias nefrotóxicas alteram predominantemente a reabsorção proximal de sódio. No modelo glicerol temos participação tanto da isquemia como da nefrotoxicidade. Em nosso trabalho, submetemos os ratos a jejum de 12 horas, mas aplicamos dose reduzida de glicerol, que possivelmente atenuou a queda da volemia dos ratos. Westenfelder e col.(97) mantiveram a dose de 10 ml/kg de glicerol, mas não submeteram os ratos a jejum antes da injeção de glicerol, também potencialmente reduzindo a hipovolemia do modelo. Já, Scherzer e col.(98) mantiveram os ratos em jejum prolongado, de 18 a 24 horas, e utilizaram 10 ml/Kg de glicerol. Maior componente isquêmico no trabalho de Scherzer e col.(98) e, maior participação de nefrotoxicidade no presente trabalho e no de Westenfelder e col.(97) podem explicar a diferença observada em relação à região tubular (proximal ou distal) preferencialmente acometida.

O estudo sequencial da função tubular no modelo glicerol, utilizando a técnica de clearance de lítio, permitiu-nos demonstrar comprometimento funcional mais intenso e precoce dos túbulos proximais. A fração de excreção de lítio mostrou-se um marcador de lesão tubular mais sensível do que a fração de excreção de sódio, comumente utilizada como índice discriminatório na análise de pacientes com oligúria. Em

concordância com este dado, Steinhauslin e col.(126) publicaram recentemente trabalho clínico, em que compararam a capacidade das frações de excreção de sódio e lítio em discriminar pacientes com IRA pré-renal ou necrose tubular aguda, encontrando maior sensibilidade diagnóstica nas variações da fração de excreção de lítio.

Série III

1. Alterações funcionais e histológicas

Várias medidas terapêuticas, utilizadas precocemente, mostraram-se eficientes em proteger a lesão renal no modelo glicerol. A expansão salina (19), diuréticos (21), derivados de xantinas (47-51), bloqueador adrenérgico (39), prostaglandina E2 (42), antagonista de serotonina (127), são exemplos de drogas capazes de beneficiar a evolução da IRA-GLI.

Os estudos de Lee e col.(34) e de Lopez- Farre e col. (66), demonstraram, respectivamente, a ação protetora do diltiazem e do antagonista de receptor de PAF (BN 52021) sobre a função renal no modelo glicerol. Ambos os trabalhos avaliaram o efeito das drogas sobre a hemodinâmica renal e filtração glomerular, através da avaliação do fluxo plasmático renal, clearance de creatinina ou de inulina, nos dias que se sucederam à injeção do glicerol. Da mesma forma, ambos os autores avaliaram as lesões histológicas renais através de análise semi-quantitativa.

Em nosso trabalho, utilizamos tanto um agente bloqueador de canal de cálcio, a nifedipina, quanto o antagonista de receptor de PAF (BN 52021) e, procuramos estender o estudo funcional, para avaliar além da proteção sobre a filtração glomerular também a ação destas drogas sobre a

função tubular, utilizando a técnica de clearance de lítio. Os estudos funcionais e histológicos foram realizados 24 horas após a administração do glicerol, quando as alterações funcionais são mais evidentes nos estudos de clearance em gaiola metabólica, como demonstramos nos estudos da série II.

Em animais com IRA-GLI sem tratamento (nifedipina ou BN 52021) notamos aumento significativo do peso renal, possivelmente decorrente de transudação intersticial ou congestão venosa. Na fase precoce da insuficiência renal aguda ocorre edema das células tubulares proximais e distais (128). Na região externa da medula as vênulas da vasa recta, que drenam os plexos capilares da região medular interna, estão em íntimo contato com os túbulos, principalmente a pars reta do túbulo proximal, a porção espessa da alça de Henle e o túbulo coletor. As células tubulares edemaciadas, principalmente após isquemia renal, comprimem estas vênulas, que são muito distensíveis e provocam congestão medular com piora do suprimento de oxigênio para esta região (129). O edema intersticial e a congestão venosa medular acarretam aumento do peso renal na IRA. Os ratos tratados com nifedipina ou BN 52021 mostraram peso renal semelhante ao controle, possivelmente por terem apresentado menor congestão venosa e edema intersticial.

O fluxo urinário dos ratos tratados com nifedipina ou BN 52021 foi semelhante ao controle, enquanto o grupo glicerol apresentou diurese inferior a todos os grupos. Por outro lado, todos os ratos que receberam glicerol, tratados ou não, apresentaram filtração glomerular inferior aos controles. Apesar de inferior ao controle, a filtração glomerular dos ratos tratados foi significativamente superior à do grupo glicerol. A proteção mais nítida foi obtida com nifedipina, embora o clearance de creatinina deste

grupo (264 $\mu\text{l/min/100g}$) não seja significativamente maior que o obtido com BN 52021 (188 $\mu\text{l/min/100g}$).

A análise da fração de excreção de lítio, mais uma vez, mostrou maior sensibilidade do que a fração de excreção de sódio em acusar diferenças no manuseio tubular de íons. Assim, todos os grupos que receberam glicerol apresentaram aumento significativo da fração de excreção de lítio em relação ao controle. Os animais tratados com nifedipina apresentaram FeLi menor que os ratos que receberam apenas o BN 52021. Por outro lado, a fração de excreção de sódio foi maior apenas nos animais não tratados. Não observamos diferença na FeNa entre o grupo controle e os ratos tratados, ou entre os ratos tratados com nifedipina ou antagonista de PAF.

Baseado no clearance de lítio, calculamos a taxa de reabsorção fracional proximal e distal de sódio. Como esperado, frente aos resultados de FeLi , observamos queda acentuada da reabsorção fracional proximal nos ratos não tratados e nos tratados com BN 52021. Os animais tratados com nifedipina mantiveram parcialmente a capacidade reabsortiva proximal. A reabsorção fracional distal de sódio foi menor apenas no grupo glicerol e os animais tratados não diferiram do grupo controle.

Resumindo os achados referentes à função renal, notamos que houve uma diferença qualitativa na proteção renal obtida com a nifedipina e com o BN 52021. Embora ambos os tratamentos tenham atenuado, de maneira semelhante, a queda na filtração glomerular, apenas a nifedipina foi capaz de preservar parcialmente a função reabsortiva proximal, mostrando maior proteção sobre as células deste segmento. A proteção distal foi obtida com ambas as drogas.

Este achado funcional é compatível com as análises histológicas semi-quantitativas em ratos com IRA-GLI. Os ratos tratados com diltiazem (34) e não com o antagonista de PAF (66), mostraram redução significativa do índice de necrose tubular.

Em nossa avaliação histológica, semi-quantitativa, não observamos diferença significativa em relação à presença de necrose tubular, quando comparamos os 3 grupos analisados conjuntamente (glicerol, glicerol+nifedipina e glicerol+BN 52021). Porém, em análise comparativa direta com o grupo glicerol sem tratamento, apenas o grupo tratado com nifedipina apresentou menor incidência de necrose ($p < 0.05$, teste Mann-Whitney). Em ambos trabalhos citados da literatura, a comparação do grupo tratado foi feita diretamente com o grupo glicerol. Portanto, se considerarmos o mesmo tipo de análise estatística, nossos dados coadunam com os anteriores (34, 66), mostrando que a nifedipina diminuiu a quantidade de células tubulares necrosadas e que o BN 52021 não alterou a lesão histológica. Ambos os tratamentos conseguiram reduzir a deposição de cilindros proteicos intratubulares, quando comparados ao grupo glicerol. Oken e col. (4) notaram que os cilindros proteicos, que surgem no modelo glicerol, são consequentes à redução da filtração glomerular nos néfrons mais afetados e não a causa da queda da filtração glomerular, pois o retorno do fluxo por estes túbulos desloca com facilidade estes cilindros. A redução de cilindros proteicos em nossos animais tratados pode decorrer de um maior número de néfrons filtrantes, com maior fluxo intratubular e redução no depósito de cilindros proteicos. Surpreendentemente, notamos que a quantidade de células epiteliais descamadas e cilindros granulados (celulares) tenderam a aumentar, principalmente nos ratos tratados com BN 52021.

2. Mecanismos de ação das drogas

Na patogênese da IRA-GLI interagem mecanismos hemodinâmicos e nefrotóxicos. As alterações hemodinâmicas iniciam-se por redução da volemia e consequente queda da perfusão renal. Na evolução do modelo, há recuperação do fluxo sanguíneo renal, mas persistem alterações hemodinâmicas glomerulares, caracterizadas por aumento da resistência aferente, compensada por queda da resistência eferente, de forma que a resistência vascular renal total está pouco alterada. A pressão hidrostática no capilar glomerular e a filtração glomerular estão reduzidas. A nefrotoxicidade da mioglobina decorre da liberação do ferro e potencialização das reações iniciadas pela isquemia, que produzem radicais hiperativos de oxigênio lesivos às células. As drogas que podem prevenir a insuficiência renal neste modelo devem, portanto, atuar sobre as alterações hemodinâmicas glomerulares, ou sobre os eventos que conduzem à necrose das células tubulares.

O efeito hemodinâmico renal dos bloqueadores de canal de cálcio depende do tônus vascular renal, isto é, em situações em que há estímulo à produção de hormônios, autacóides ou neurotransmissores, com consequente vasoconstrição renal, pode ser observada ação vasodilatadora renal destes agentes, com melhora do fluxo plasmático renal e da filtração glomerular (130,131). Por outro lado, em situações em que o tônus vascular renal está equilibrado (por exemplo em humanos normais

(132,133) ou rim normal de rato perfundido isolado (134,135)) não se observam quaisquer modificações da hemodinâmica renal induzida pelos bloqueadores de cálcio. A ação dos bloqueadores de cálcio ocorre após o processo de interação entre os agentes vasoconstrictores e seus receptores, portanto, o efeito de diferentes hormônios podem ser bloqueados. Mesmo assim, a resposta hemodinâmica renal ao bloqueador de cálcio varia de acordo com o vasoconstrictor envolvido.

Em estudo de perfusão em rim isolado, em que KCl, norepinefrina e angiotensina II foram administrados em concentração suficiente para reduzir o fluxo renal em 50%, a adição nitrendipina em doses crescentes provocou recuperação total do fluxo renal durante infusão de KCl e parcial durante infusão de angiotensina II e norepinefrina (respectivamente 80% e 60% do controle) (136). A diferença na resposta aos agentes vasoconstrictores depende da importância dos canais de cálcio voltagem-dependentes no mecanismo de contração produzido pelas substâncias vasoativas.

Estudo utilizando perfusão em rim isolado, infundido com norepinefrina, demonstrou que a nisoldipina proporcionou recuperação leve do fluxo de perfusato, ao lado de quase completa recuperação da filtração glomerular (133). Já o manganês, um bloqueador inespecífico de canais de cálcio, que bloqueia vários processos de translocação de cálcio, levou à recuperação uniforme da filtração glomerular e do fluxo de perfusato (137). O aumento preferencial da filtração glomerular, obtido com a nisoldipina (133) e também com outros agentes bloqueadores de canal de cálcio voltagem-dependente (134,135,138), sugere ação mais intensa destas drogas sobre a resistência pré-glomerular, com aumento da fração de filtração.

Para confirmar esta hipótese, foram utilizados modelos que permitem a visualização direta do diâmetro das arteríolas renais. Fleming e col. (139) utilizando técnica de visualização da microcirculação de rim hidronefrótico de ratos, "in vivo", observou o efeito do diltiazem aplicado topicamente sobre a superfície de corte renal e notou aumento preferencial no diâmetro dos vasos pré-glomerulares (artéria arqueada, interlobular e aferente). O efeito na arteríola eferente foi mínimo. Carmines e col. (140) utilizando técnica "in vitro", de perfusão de néfron justamedular, mostraram o efeito do verapamil e do diltiazem sobre o diâmetro arteriolar após vasoconstricção induzida por angiotensina II. Ambos os bloqueadores de cálcio reverteram totalmente a redução do diâmetro da arteríola aferente e não interferiram no diâmetro da arteríola eferente. Loutzenhiser e Epstein, utilizando visualização microscópica da microcirculação, em perfusão de rim isolado hidronefrótico, observaram a ação da nifedipina sobre o diâmetro arteriolar em rins submetidos à perfusão com angiotensina (141) ou endotelina (142). Em ambos os casos, o bloqueador de cálcio proporcionou recuperação do diâmetro apenas das arteríolas aferentes e não das eferentes.

A interpretação destes dados leva a conclusão que nos vasos aferentes predominam canais voltagem-dependentes. Em outras palavras, a resposta vasodilatadora renal aos bloqueadores de cálcio é heterogênea, com vasodilatação aferente e resistência ao efeito vasodilatador na circulação eferente. Esta resposta hemodinâmica permite aos bloqueadores de cálcio aumentar a pressão hidrostática do capilar glomerular e apresentar efeito renoprotetor eficaz.

Os estudos de hemodinâmica glomerular no modelo glicerol conduzidos por Wolfert e col.(18), demonstraram vasoconstricção pré-

glomerular e queda da resistência eferente, como causa básica da manutenção da redução da filtração glomerular. A ação hemodinâmica dos bloqueadores de cálcio opõem-se à do glicerol e, portanto, podem interferir no mecanismo que mantém a reduzida filtração glomerular neste modelo.

Além de sua ação vascular, o aumento do cálcio citosólico desempenha papel importante no processo de necrose celular, através da estimulação de fosfolipases, proteases, geração de radicais hiperativos de oxigênio e lesão mitocondrial. Portanto, além de sua ação hemodinâmica benéfica, é possível que os bloqueadores de canal de cálcio desempenhem também uma ação protetora na IRA, através da redução do transporte de cálcio para dentro das células tubulares agredidas.

Para determinar o efeito protetor dos bloqueadores de cálcio sobre a célula tubular isquêmica, experimentos têm sido realizados em cultura de células, já que os efeitos hemodinâmicos e celulares não podem ser distinguidos nos estudos "in vivo". Snowdone e col.(143) demonstraram aumento do cálcio intracelular, após anóxia e retirada de glicose do meio de cultura de células renais de macacos. Wilson e Schrier (104) estudaram em cultura, a sobrevivência de células tubulares de coelho, de diferentes segmentos, submetidas à anóxia. Independente do segmento estudado, a sobrevivência celular era sempre maior quando era permitido às células se recuperarem em meio livre de cálcio. Em estudo adicional (144), demonstraram que tanto a nifedipina quanto o verapamil, melhoraram a sobrevivência das células submetidas à anóxia, mesmo quando o cálcio era mantido no meio de cultura. Embora, até o momento, não tenha ainda sido isolado canal de cálcio voltagem-dependente em célula tubular, existem evidências da ação de bloqueadores de canal de cálcio em células epiteliais (145,146). Em estudo recente, em cultura de células, Friedman e col.(147)

apresentaram evidência de redução da entrada de cálcio em células tubulares distais, estimuladas por PTH (paratohormônio), quando eram tratadas previamente com nifedipina. Rose e col.(148), utilizando técnica de microscopia digital fluorescente para medir o cálcio intracelular, demonstraram que células tubulares proximais frescas isoladas, submetidas a 60 minutos de anóxia, apresentaram aumento da concentração de cálcio intracelular, decorrente de aumento de fluxo de cálcio do extracelular para o intracelular. Demonstraram, também, que o metoxiverapamil impediu a elevação da concentração do cálcio intracelular durante a anóxia e aumentou a porcentagem de células viáveis ao fim do experimento. Todas estas evidências experimentais sugerem que os bloqueadores de canal de cálcio, voltagem dependente, possam promover parte de seu efeito protetor renal através de ação sobre o transporte de cálcio nas membranas das células tubulares.

Outras possíveis ações farmacológicas dos antagonistas de cálcio, quando empregados em altas doses como em nosso trabalho, são estabilização de membrana celular (149) e inativação de radicais livres de oxigênio (150). No modelo glicérol muitos estudos demonstraram a importância da lesão por radicais de oxigênio, assim como a capacidade de sequestradores destes radicais proteger a lesão renal (84-87). Não temos conhecimento, no momento, de qualquer estudo que procurou avaliar o efeito de bloqueadores de cálcio sobre a produção de radicais livres de oxigênio no modelo glicérol.

Em nosso trabalho a melhor preservação da função tubular proximal e o menor grau de necrose tubular observada histologicamente nos ratos tratados com nifedipina, comparados aos tratados com BN 52021, podem resultar tanto de proteção local da nifedipina sobre a necrose celular

epitelial, quanto de resposta hemodinâmica mais efetiva à nifedipina, com manutenção mais adequada da perfusão renal e menor exposição tubular à isquemia. Os estudos "in vivo", como o nosso, não permitem dissociar estas ações dos bloqueadores de cálcio e, portanto, determinar o real mecanismo responsável pela diferença na resposta funcional às drogas que utilizamos.

A infusão intra-renal de PAF leva a aumento da resistência arteriolar aferente e eferente, sendo o efeito aferente mais intenso, com redução do fluxo plasmático glomerular. Produz queda da filtração glomerular por néfron, da fração de filtração e queda intensa do Kf (151). Embora no modelo glicerol a redução do Kf pareça exercer efeito pequeno (18), o PAF certamente participa das alterações hemodinâmicas. Lopez Farre e col.(66) demonstraram aumento na produção de PAF glomerular nos ratos com IRA-GLI e melhora da filtração glomerular e fluxo plasmático renal, quando trataram estes animais com antagonistas de PAF. A resposta ao BN 52021, em nosso trabalho, mostrando melhora da filtração glomerular, confirma a participação do PAF na IRA-GLI.

O grupo de animais tratados com a associação de nifedipina e BN 52021, visou avaliar se os efeitos protetores destes agentes seriam somatórios e, portanto decorrentes de ação sobre diferentes mecanismos. Assim, o antagonista de PAF poderia ter ação sobre o Kf e o bloqueador de cálcio sobre a vasoconstrição aferente. Não observamos somação de efeitos. O resultado obtido com a associação das 2 drogas foi semelhante ao observado com a nifedipina isoladamente.

Na biossíntese do PAF participam a fosfolipase 2, que atua sobre os fosfolipídios da membrana celular liberando ácido aracdônico e liso-PAF e a enzima acil-transferase que transforma o liso-PAF em PAF. Ambas enzimas são ativadas pelo aumento na concentração de cálcio citosólico.

Tolins e col.(152) demonstraram que o diltiazem e o verapamil inibiram a produção de PAF, em cultura de células endoteliais, estimulada por trombina. Avaliaram a concentração de cálcio citosólico nestas células e demonstraram que as culturas tratadas com os antagonistas de cálcio apresentavam menor acúmulo de cálcio intracelular, após estímulo com a trombina. Lopez Farre e col.(66) mediram a produção de PAF glomerular após glicerol e notaram redução na liberação de PAF após verapamil. Estes dados demonstram a capacidade dos antagonistas de cálcio bloquearem a síntese de PAF e, parte de sua ação farmacológica, pode decorrer desta propriedade. Portanto, nos ratos tratados com nifedipina, a associação de BN 52021 não é eficiente, pois a produção de PAF está bloqueada.

Séries III B e C

Na série III B avaliamos o efeito da nifedipina e do BN 52021, nos ratos submetidos a jejum por 12 horas, com a finalidade de analisar a ação renal destas drogas, nas mesmas condições volêmicas que empregamos no modelo glicerol. Nesta circunstância, o bloqueador de canal de cálcio levou a um aumento da filtração glomerular. Efeito semelhante foi observado com a infusão intra-arterial de nifedipina e verapamil em cães anestesiados (153), ou em rins perfundidos isolados, pré-infundidos com agentes vasoconstrictores (133, 135). Já, tanto em humanos normais (132,133) quanto em ratos sem jejum, com dieta livre em sal (154), ou em rim perfundido isolado (133), os bloqueadores de canal de cálcio não alteraram a filtração glomerular, confirmando as observações de que a resposta renal varia em diferentes condições experimentais. Vários estudos experimentais (154,155) e clínicos (156,157,158) demonstraram ação natriurética dos

bloqueadores de canal de cálcio. O mecanismo desta ação não está completamente elucidado. Em nosso estudo não observamos ação natriurética da nifedipina e a reabsorção proximal, a reabsorção distal, a fração de excreção de sódio e a excreção urinária de sódio mantiveram-se iguais ao grupo controle. Julgamos que a contração volêmica dos nossos ratos, após o período de jejum, impediu o efeito natriurético da nifedipina.

Estudos prévios utilizando tanto micropunção glomerular (159), como clearance global (66) demonstraram que o BN 52021 não altera filtração glomerular em ratos normais. Nossos dados confirmaram que o BN 52021 não altera a filtração glomerular. Friedlander e col (62) demonstraram que a infusão de PAF, em dose que não altera a função renal, induziu aumento da reabsorção de sódio. A ação tubular do BN 52021, observada em nosso estudo, não reitera este efeito anti-natriurético do PAF, pois notamos discreta redução da excreção urinária de sódio após infusão do antagonista de PAF.

A nifedipina e o BN 52021 não apresentaram efeito natriurético intrínseco, quando testados nas mesmas condições experimentais utilizadas por nós no modelo glicerol. Portanto, as reduções da reabsorção tubular de sódio, em nosso estudo, dependem somente da lesão tubular induzida pela injeção de glicerol.

Na série III C, demonstramos que a lesão muscular, avaliada pelo nível sérico de CPK, foi semelhante nos animais tratados ou não. Dessa forma, podemos admitir que a proteção parcial da IRA decorreu apenas do efeito farmacológico renal da nifedipina e do BN 52021 e não de menor grau de lesão muscular após a injeção de glicerol nos animais tratados.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

No modelo glicerol :

1. A fração de excreção de lítio mostrou ser um marcador mais sensível de lesão tubular que a fração de excreção de sódio.
2. O comprometimento funcional dos túbulos proximais é mais intenso e mais precoce que o observado nos túbulos distais.
3. Tanto a nifedipina quanto o BN 52021 foram capazes de atenuar a gravidade da IRA. Diminuíram a queda da filtração glomerular e preservaram a diurese, a fração de excreção de sódio e a reabsorção tubular distal de sódio.
4. Apenas a nifedipina preservou parcialmente a função tubular proximal e, portanto, reduziu a lesão celular neste segmento. Nosso estudo não permite esclarecer o mecanismo de proteção que mediou o efeito proximal da nifedipina.
5. O Fator Ativador Plaquetário (PAF) participa da patogênese da IRA induzida por glicerol na dose de 5 ml/kg de rato.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. BYWATERS, E.G.L.; BEAL, D. Crush injuries with impairment of renal function. **Brit. Med. J.** 1:427-432, 1941.
2. BYWATERS, E.G.L.; STEAD, J.K. The production of renal failure following injection of solutions containing myohaemoglobin. **Quart. J. Exp. Physiol.** 33:53, 1944.
3. FINCKH, E.S. Experimental acute tubular nephrosis following subcutaneous injection of glycerol. **J. Path. Bact.** 73:69-84, 1957
4. OKEN, D.E.; ARCE, M.L.; WILSON, D.R. Glycerol-induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat. Micropuncture study of the development of oliguria. **J. Clin. Invest.** 43:724-735, 1966.
5. ZAGER, R.A. Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal failure. **Lab. Invest.** 60:619-629, 1989.
6. THIEL, G.; WILSON, M.L.; ARCE, M.L.; OKEN, D.E. Glycerol induced hemoglobinuric acute renal failure in the rat. The experimental model, predisposing factors, and pathophysiologic features. **Nephron** 4:276-297, 1967.
7. BRAUN, S.R.; WEISS, F.R.; KELLER, A.I.; CICCONE, J.R. PREUSS, H.G. Evaluation of the renal toxicity of heme proteins and their derivatives: a role in the genesis of acute tubule necrosis. **J. Exp. Med.** 131:443-460, 1970.
8. HSU, C.H.; KURTZ, T.W.; WALDINGER, T.P. Cardiac output and renal blood flow in glycerol-induced acute renal failure in the rat. **Circ. Res.** 40:178-182, 1977.
9. KISHIMOTO, T.; SAKAMOTO, W.; NAKATANI, T.; ITO, T.; KIM, T.; ABE, Y. Cardiac output, renal blood flow and hepatic blood flow in rats with glycerol-induced acute renal failure. **Nephron** 53: 353-357, 1989.
10. AYER, G.; GRANDCHAMP, A.; WYLER, T.; TRUNIGER, B. Intrarenal hemodynamics in glycerol-induced myohemoglobinuric acute renal failure in the rat. **Circ. Res.** 29:128-135, 1971.
11. CHEDRU, M.F.; BAETHKE, R.; OKEN, D.E. Renal cortical blood flow and glomerular filtration in myoglobinuric acute renal failure. **Kidney Int.** 1:232-239, 1972.

12. HSU, C.H.; KURTZ, T.W.; GOLDSTEIN, J.R.; KEINATH, R.D.; WELLER, J.M. Intrarenal hemodynamics in acute myoglobinuric renal failure. **Nephron** 17:65-72, 1976.
13. KURTZ, T.W.; MALETZ, R.M.; HSU, C.H. Renal cortical blood flow in glycerol-induced acute renal failure in the rat. **Circ. Res.** 38:30-35, 1976.
14. CHURCHILL, S.; ZARLENGO, M.D.; CARVALHO, J.S.; GOTTLIEB, M.N.; OKEN, D.E. Normal renocortical blood flow in experimental acute renal failure. **Kidney Int.** 11:246-255, 1977.
15. REINECK, H.J.; O'CONNOR, G.J.; LIFSCHITZ, M.D.; STEIN, J.H. Sequential studies on the pathophysiology of glycerol-induced acute renal failure. **J. Lab. Clin. Med.** 96:356-362, 1980.
16. CUSHNER, H.M.; BARNES, J.L.; STEIN, J.H.; REINECK, H.J. Role of volume depletion in the glycerol model of acute renal failure. **Am. J. Phys.** 250:F315-F31, 1986.
17. OKEN, D.E.; DIBONA, G.F.; MCDONALD, F.D. Micropuncture studies of the recovery phase of myoglobinuric acute renal failure in the rat. **J. Clin. Invest.** 49:730-737, 1970.
18. WOLFERT, A.I.; OKEN, D.E. Glomerular hemodynamics in established glycerol-induced acute renal failure in the rat. **J. Clin. Invest.** 84:1967-1973, 1989.
19. WILKES, B.M.; HOLLENBERG, N.K. Saline and glycerol-induced acute renal failure: protection occurs after insult. **Nephron** 30:352-356, 1982.
20. BIDANI, A.B.; CHURCHILL, P.; FLESCHMANN, L. Sodium-chloride-induced protection in nephrotoxic acute renal failure: independence from renin. **Kidney Int.** 16:481-490, 1979.
21. ZAGER, R.A.; FOERDER, C.; BREDL, C. The influence of mannitol on myoglobinuric acute renal failure: functional, biochemical, and morphological assessments. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2:848-855, 1991.
22. BIDANI, A.; AL-HAWASLI, A.B.D.; CHURCHILL, P. The effect of denervation diuresis on the severity of glycerol-induced acute renal failure in rats. **J. Lab. Clin. Med.** 102:1000-1009, 1983.
23. ARENDSHORST, W.J.; FINN, W. F.; GOTTSCHALK, C.W. Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. **Circ. Res.** 558-568, 1975.

24. HONDA, N.; HISHIDA, A. Pathophysiology of experimental nonoliguric acute renal failure. **Kidney Int.** 43:513-521, 1993.
25. OLBRICHT, C.; NASON, J.; TAKABATAKE, T.; HOHLBRUGGER, G.; THURAU, K. The early phase of experimental acute renal failure. Tubular leakage and the reliability of glomerular markers. **Pflugers Arch.** 372:251-258, 1977.
26. HSU, C.H.; KURTZ, T.W.; SANDS, C.E. Intrarenal vascular resistance in glycerol-induced acute renal failure in the rat. **Circ. Res.** 45:583-587, 1979.
27. DACH, J.L.; KURTZMAN, N.A. A scanning electron microscopic study of the glycerol model of acute renal failure. **Lab. Invest.** 34:406-414, 1976.
28. MCDONALD, F.D.; THIEL, G.; WILSON, D.R.; DIBONA, G.F.; OKEN, D.E. The prevention of acute renal failure in the rat by long-term saline loading: a possible role of the renin-angiotensin axis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 131: 610-614, 1969.
29. CABILI, S.; CHARNEY, A.N. Lack of an effect of saline loading on glycerol-induced acute renal failure. **Nephron** 20:47-53, 1978.
30. CARVALHO, J.S.; PAGE, L.B. Serial studies of the renin system in rats with glycerol-induced renal failure. **Nephron** 20:47-53, 1978.
31. BARANOWSKI, R.L.; WESTENFELDER, C.; KURTZMAN, N.A. Intrarenal renin and angiotensins in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney Int.** 14:76-584, 1978.
32. ISHIKAWA, I.; HOLLENBERG, N.K. Pharmacologic interruption of the renin-angiotensin system in myohemoglobinuric acute renal failure. **Kidney Int.** 10:S183-S190, 1976.
33. BAUREISS, K.; HOFBAUER, K.G.; KONRADS, A.; GROSS, F. Effect of saralasin and serum in myohaemoglobinuric acute renal failure in rats. **Clin. Sci. Mol. Med.** 54:55-560, 1978.
34. LEE, S.M.; HILLMAN, B.J.; CLARK, R.L.; MICHAEL, U.F. The effects of diltiazem and captopril on glycerol-induced acute renal failure in the rat. **Invest. Radiol.** 20:961-970, 1985.
35. BARANOWSKI, R.L.; WESTENFELDER, C. In vivo renal angiotensin converting enzyme activity decreases in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney Int.** 34:321-326, 1988.
36. HOFBAUER, K.G.; KONRADS, A.; BAUREISS, K.; MOHRING, B.; MOHRING, J.; GROSS, F. Vasopressin and renin in glycerol-induced acute renal failure in the rat. **Circ. Res.** 41:424-428, 1977.

37. WILSON, D.R.; THIEL, G.; ARCE, M.L.; OKEN, D.E. The role of the concentration mechanism in the development of acute renal failure: micropuncture studies using diabetes insipidus rats. **Nephron** 6:128-139, 1969.
38. KONRADS, A.; HOFBAUER, K.G.; BAUREI, E.; HACKENTHAL, E.; MOHRING, J.; MOHRING, B.; GROSS, F. Systemic vasoconstriction in glycerol-induced acute renal failure of rats. **Pflugers Arch.** 365:R-13, 1976
39. MCLEAN, D.; THOMSON, A.E. Effect of phenoxybenzamine on glycerol-induced acute renal failure in the rat. **Fed. Proc.** 29:478, 1970.
40. CHENG, J.T.; SHEN, D.L.; HUANG, J.J. Decrease of catecholamine and neuropeptide Y-like immunoreactivity in the glycerol-induced acute renal failure of rats. **Res. Exp. Med.** 190:315-322, 1990.
41. TORRES, V.E.; STRONG, C.G.; ROMERO, J.C.; WILSON, D.M. Indomethacin enhancement of glycerol-induced acute renal failure in rabbits. **Kidney Int.** 7:170-178, 1975.
42. WERB, R.; CLARK, W.F.; LINDSAY, R.M.; JONES, E.O.P.; TURNBULL, D.I.; LINTON, A.L. Protective effect of prostaglandin (PG E₂) in glycerol-induced acute renal failure in the rats. **Clin. Sci. Mol. Med.** 55:505-507, 1978.
43. HASANOGLU, E.; ULUOGLU, O.; ERCAN, Z.S. The protective effects of Iloprost and thromboxane synthetase inhibitor, UK 38485, against glycerol-induced acute renal failure in rats. **Prostaglan. Leukotri. Essen. Fatty Acids** 43:99-102, 1991.
44. BENABE, J.E.; KLAHR, S.; HOFFMAN, M.K.; MORRISON, A.R. Production of thromboxane A₂ by the kidney in glycerol-induced acute renal failure in the rabbit. **Prostaglandins** 19:333-347, 1980.
45. WATSON, A.J.; STOUT, R.L.; ADKINSON N.F.; SOLEZ, K.; WHELTON, A. Selective inhibition of thromboxane synthesis in glycerol-induced acute renal failure. **Am. J. Kidney Dis.** 8:26-30, 1986.
46. OSWALD, H.; SCHMITZ, H.J.; HEIDENREICH, O. Adenosine response of the rat kidney after saline loading, sodium restriction and hemorrhagia. **Pflugers Arch.** 357:323-33, 1975.
47. BIDANI, A.K.; CHURCHILL, P.C. Aminophylline ameliorates glycerol-induced acute renal failure in rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 61:567-71, 1983.

48. BOWMER, C.J.; COLLIS, M.G.; YATES, M.S. Amelioration of glycerol-induced acute renal failure in the rat with 8-phenyltheophylline: timing of intervention. **J. Pharm. Pharmacol.** 40:733-735, 1988.
49. VADIEI, K.; BRUNNER, L.J.; LUKE, D.R. Effects of pentoxifylline in experimental acute renal failure. **Kidney Int.** 36:466-470, 1989.
50. LUKE, D.R.; BERENS, K.L.; VERANI, R.R. Benefit of vascular decongestion in glycerol-induced acute renal failure. **Renal Failure** 13:61-68, 1991.
51. OKEN, D.E.; REILLY, K.M.; Total prevention of glycerol-induced acute renal failure with an adenosine-receptor blocker. **Kidney Int.** 35:415, 1989.
52. SHULMAN, L.M.; YUHAS, Y.; FROLKIS, I.; GAVENDO, S.; KNECHT, A.; ELIAHOU, H.E. Glycerol induced ARF in rats is mediated by tumor necrosis factor. **Kidney Int.** 43:1397-1401, 1993.
53. MICHIE, H.R.; MANOGUE, D.R.; SPRIGGS, D.R.; REVHOUG, A.; ODWYER, S.; DINARELLO, C.A.; CERAMI, A.; WOLFF, S.M.; WILMORE, D.W. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **N. Engl. J. Med.** 318:1481-1486, 1988.
54. GIROIR, B.P.; JOHNSON, J.H.; BROWN, T.; ALLEN, G.L.; BEUTLER, B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. **J. Clin. Invest.** 90:693-698, 1992.
55. NOLAN, J.P.; VENUTO, R.C.; GOLDMAN, G. S. Role of endotoxin in glycerol-induced acute renal failure in the rat. **Clin. Sci. Mol. Med.** 54:615-620, 1978.
56. BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. **N Engl. J. Med.** 316:379-385, 1987.
57. DAYER, J.M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin / Tumor Necrosis Factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by synovial cells and dermal fibroblasts. **J. Exp. Med.** 162:2163-2168, 1985.
58. CAMUSSI, G.; BUSSOLINO, F.; SALVIDIO, G.; BAGLIONI, C. Tumor Necrosis Factor / cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. **J. Exp. Med.** 166:1390-1404, 1987.
59. RENESTO, P.; CHIGNARD, M. Tumor necrosis factor enhances platelet activation via cathepsin G released from neutrophils. **J. Immunol.** 146:2305-2309, 1991.

60. KOLTAI, M.; HOSFORD, D.; BRAQUET, P. Role of PAF and cytokines in microvascular tissue injury. **J. Lab. Clin. Med.** 119:461-466, 1992.
61. LOPEZ-FARRE, A.; GOMEZ-GARRE, D.; BERNABEU, F.; MONTANES, I.; MILLAS, I.; LOPEZ-NOVOA, J.M. Renal effects and mesangial cell contraction induced by endothelin are mediated by PAF. **Kidney Int.** 39:624-630, 1991.
62. PIROTZKY, E.; COLLIEZ, P.; GUILMARD, C.; SCHAEVERBEKE, J.; MENCIA-HURETA, J.M.; BRAQUET, P. Protection of platelet-activating factor-induced acute renal failure by BN 52021. **Br. J. Exp. Path.** 69:291-299, 1988.
63. HEBERT, R.L.; SIROIS, P.; BRAQUET, P.; PLANTE, G.E. Hemodynamic effects of PAF-acether on the dog kidney. **Prostaglandins Leukotrienes and Medicine** 26:189-202, 1987.
64. WANG, J.; DUNN, M.J. Platelet-activating factor mediates endotoxin-induced acute renal insufficiency in rats. **Am. J. Physiol.** 253:F1283-F1289, 1987.
65. PLANTE, G.E.; SIROIS, P.; BRAQUET, P. Platelet activating factor antagonism with BN 52021 protects kidney against acute ischemic injury. **Prostaglandin Leukotriene and Fatty Acids** 34:53-60, 1988.
66. LOPEZ-FARRE, A.; GOMEZ-GARRE, D.; BERNABEU, F.; CAJAL, S.R.; PEREZ-RODRIGO, P.; BRAQUET, P.; LOPEZ-NOVOA, J.M. Platelet-activating factor mediates glycerol-induced acute renal failure in rats. **Clin. Sci.** 79:551-558, 1990.
67. LUSCHER, T.F.; OCK, H.A.; YANG, Z.; DIEDRICH, D. S. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: perspectives in nephrology. **Kidney Int.** 39:575-590, 1991.
68. YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature** 337:411-415, 1988.
69. NUCCI, G.; THOMAS, R.; D'ORLEANS, P.; ANTUNES, E.; WALDER, C.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:9797-900, 1988.

70. MARTIN, L.; VILLANI, G.M.; JOTHIANANDAN, D.; FURCHGOTT, R.F. Blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoproteins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 233:679-685, 1985.
71. MAREE, A.; PEER, G.; SCHWARTZ, D.; SERBAN, I.; BLUM, M.; CALIBI, S.; IAINA, A. Endothelial derived relaxation factor (EDRF) in glycerol acute renal failure in rats. **Abstracts XII International Congress of Nephrology**, p. 283.
72. SHIBOUTA, Y.; SUZUKI, N.; SHINO, A.; MATSUMOTO, H.; TERASHITA, Z.; KONDO, K.; NISHIKAWA, K. Pathophysiological role of endothelin in acute renal failure. **Life Sci.** 46:1611-1618, 1990.
73. FOGO, A.; HELLING, S.E.; INAGAMI, T.; KON, V. Endothelin receptor antagonism is protective in in vivo acute cyclosporine toxicity. **Kidney Int.** 42:770-774, 1992.
74. BADR, K.F. Sepsis-associated renal vasoconstriction; potential targets for future therapy. **Am. J. Kidney Dis.** 20:207-213, 1992.
75. BREZIS, M.; ROSEN, S.; SILVA, P.; EPSTEIN, F.H. Renal ischemia: a new perspective. **Kidney Int.** 26:375-383, 1984.
76. SCHRIER, R.W.; HENSEN, J. Cellular mechanism of ischemic acute renal failure: role of Ca^{++} and calcium entry blockers. **Klin. Wochenschr.** 66:800-807, 1988.
77. CHEUNG, J.Y.; CONSTANTINE, J.M.; BONVENTRE, J.V. Regulation of cytosolic free calcium concentration in culture renal epithelial cells. **Am. J. Physiol.** 251:F690-F701, 1986.
78. WILSON, D.R.; ARNOLD, P.E.; BURKE, T.J.; SCHRIER, R.W. Mitochondrial calcium accumulation and respiration in ischemic acute renal failure in the rat. **Kidney Int.** 25:519-526, 1984.
79. CONGER, J.D.; ROBINETTE, J.B.; SCHRIER, R.W. Smooth muscle calcium and endothelium-derived relaxing factor in the abnormal vascular response of acute renal failure. **J. Clin. Invest.** 82:532-537, 1988.
80. NAKAMURA, H.; NEMENOFF, R.A.; GRONICH, J.H.; BONVENTRE, J.V. Subcellular characteristics of phospholipase A 2 activity in the rat kidney. **J. Clin. Invest.** 87:1810-1818, 1991.
81. BONVENTRE, J.V.; SWIDER, M. Calcium dependency of prostaglandin E 2 production in rat glomerular mesangial cells. **J Clin. Invest.** 82:168-172, 1988.

82. MCCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N. Engl. J. Med.** 312:168-176, 1988.
83. ZAGER, R.A. Combined mannitol and deferoxamine therapy for myoglobinuric renal injury and oxidant tubular stress. **J. Clin. Invest.** 90:711-719, 1992.
84. PALLER, M.S. Hemoglobin-and-myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. **Am. J. Physiol.** 255:F539-F544, 1988.
85. SHAH, S.V.; WALKER, P.D. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol.** 255:F438-F433, 1988.
86. SALAHUDEEN, A.K.; CLARK, E.C.; NATH, K.A. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. **J. Clin. Invest.** 88:1886-1893, 1991.
87. ABUL-EZZ, S.R.; WALKER, P.D.; SHAH, S.V. Role of glutathione in an animal model of myoglobinuric acute renal failure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88:9833-9837, 1991.
88. MALIS, C.; CHEUNG, J.Y.; LEAF, A.; BONVENTRE, J.V. Effects of verapamil in models of ischemic acute renal failure in the rat. **Am. J. Physiol.** 245:F735-F742, 1983.
89. WAGNER, K.; SCHULTZE, G.; MOLZAHN, M.; NEUMAYER, H. The influence of long-term infusion of the calcium antagonist diltiazem on postischemic acute renal failure in conscious dogs. **Klin. Wochenschr.** 64:135-140, 1986.
90. BURKE, T.J.; ARNOLD, P.E.; GORDON, J.A.; BULGER, R.E.; DOBYAN, D.C.; SCHRIER, R.W. Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischemia. **J. Clin. Invest.** 74:1830-1841, 1984.
91. NEUMAYER, H.H.; WAGNER, K. Prevention of delayed graft function in cadaver kidney transplants by diltiazem: outcome of 2 prospective randomized protocols. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 10(suppl 10):S110-S117, 1987.
92. BAKRIS, G.; BURNETT, J.C. A role for calcium in radiocontrast-induced reductions in renal hemodynamics. **Kidney Int.** 27:465-468, 1985.
93. LEE, S.M.; MICHAEL, U.F., The protective effect of nitrendipine on gentamicin acute renal failure in rats. **Exp. Mol. Pathol.** 43:107-114, 1985.

94. WATSON, A.J.; GIMENEZ, L.F.; KLASSEN, D.K.; STOUT, R.L.; WHELTON, A. Calcium channel blockade in experimental aminoglycoside nephrotoxicity. **J. Clin. Pharmacol.** 27:625-627, 1987.
95. IAINA, A.; HERZOG, D.; COHEN, D.; GAVENDO, S.; KAPULER, S.; SERBAN, I.; SCHIBY, G.; ELIAHOU, H.E. Calcium entry-blockade with verapamil in cyclosporine A plus ischemia induced acute renal failure in rats **Clin. Nephrol.** 25(suppl 1):S168-S170, 1986.
96. BARROS, E. J.G.; BOIM, M.A.; AJZEN, H.; RAMOS, O.L.; SCHOR, N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney Int.** 32:19-25, 1987.
97. WESTENFELDER, C.; AREVALO, G.J.; CRAWFORD, P.W.; ZERWER, P.; BARANOWSKI, R.L.; BIRCH, F.M.; EARNEST, W.R.; HAMBURGER, R.K.; COLEMAN, R.D.; KURTZMAN, N.A. Renal tubular function in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney Int.** 18:432-444, 1980.
98. SCHERZER, P.; WALD, H.; POPOVTZER, M. M. Reduced Na-K ATPase in distal nephron in glycerol-induced acute renal failure. **Kidney Int.** 37:870-874, 1990.
99. GARCIA, E.G.; GONTIJO, J.A.; FIGUEIREDO, J.F. Clearance de lítio como método de avaliação do manuseio tubular de sódio em ratos acordados, estudados em gaiolas metabólicas. **J. Bras. Nefrol.** 13:89-94, 1991.
100. DUBROW, A.; FLAMENBAUN, W. Acute renal failure associated with myoglobinuria and hemoglobinuria. In: **Acute Renal Failure** (ed. B. Brenner and J.M. Lazarus) Churchill Livingstone, pp. 279-293, 1988.
101. BETTER, O.S.; STEIN, J.H. Early management of shock and prophylaxis of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis. **N. England. J. Med.** 322:825-829, 1990.
102. GABOW, P.A.; KAEHNY, W.D.; KELLEHER, S.P. The spectrum of rhabdomyolysis. **Medicine** 61:141-152, 1982.
103. OLIVER, J.; MACDOWELL, M.; TRACY, A. The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury, renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. **J. Clin. Invest.** 30:1307-1351, 1951.
104. WILSON, P.D.; SCHRIER, R.W. Nephron segment and calcium as determinants of anoxic cell death in renal cultures. **Kidney Int.** 29:1172-1179, 1986.

105. SOLEZ, K.; MOREL-MAROGER, L.; SRAER, J.D. The morphology of acute tubular necrosis in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. **Medicine**, 58:362-376, 1979.
106. THOMSEN, K.; HOLSTEIN-RATHLOU, H.; LEYSSAC, P.P. Comparison of three measures of proximal tubular reabsorption: lithium clearance, occlusion time, and micropuncture. **Am. J. Physiol.** 241: F348-F355, 1981.
107. KOOMANS, H.A.; BOER, W.H.; MEES, E.J.D. Evaluation of lithium clearance as a marker of proximal tubule sodium handling. **Kidney Int.** 36:2-12, 1989.
108. THOMSEN, K. Lithium clearance as a measure of sodium and water delivery from the proximal tubules. **Kidney Int.** 37:S10-S16, 1990.
109. HECH T, B.; KASHGARIAN, M.; FORREST, J. N.; HAYSLETT, J. Micropuncture study on the effects of lithium on proximal and distal tubule function in the rat kidney. **Pflugers Arch.** 377:69-74, 1978.
110. TALSO, P.J.; CLARKE, R.W. Excretion and distribution of lithium in the dog. **Am. J. Physiol.** 166:202-208, 1951.
111. HAYSLETT, J.P.; KASHGARIAN, M. A micropuncture study of the renal handling of lithium. **Pflugers Arch.** 380:159-163, 1979.
112. SHIRLEY, D.G.; WALTER, S.J.; SAMPSON, B. A micropuncture study of the renal reabsorption effects of amiloride and furosemide. **Am. J. Physiol.** 263:F1128-F1132, 1992.
113. IMAI, M.; ISOZAKI, T.; YASOSHIMA, K.; YOSHITOMI, K. Permeability characteristics and probability of lithium transport in the thin limbs of Henle's loop. **Kidney Int.** 37(suppl 28):s31-s35, 1990.
114. TANIGUSHI, J.; SHIRLEY, D.G.; WALTER, S.J.; IMAI, M. Simulation of lithium transport along the thin segments of Henle's loop. **Kidney Int.** 44:337-343, 1993.
115. FROLICH, F.C.; LEFTWICH, R.; RAGHEB, M.; OATES, J.A.; REIMANN, I.; BYCHANAN, D. Indomethacin increases plasma lithium. **Br. Med. J.** 1:1115-1116, 1979.
116. BOER, W.H.; KOOMANS, H.A.; MEES, E.J.; Renal lithium handling during water loading and subsequent d-AVP antidiuresis. **Eur. J. Clin. Invest.** 18:273-278, 1988.
117. GARCIA, W.E. Estudo do manuseio tubular de íons durante a hipertrofia renal compensatória. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1992.

118. HADJ-AISSA, A. H.; BANKIR, L.; FRAYSSE, M.; BICHET, D.G.; LAVILLE, M.; ZECH, P.; POZET, N. Influence of the level of hydration on the renal response to a protein meal. **Kidney Int.** 42:1207-1216, 1992.
119. KIRCHNER, K.A. Lithium as a marker for proximal tubular delivery during low salt intake and diuretic infusion. **Am. J. Physiol.** 253:F118-F196, 1987.
120. BOER, W. H.; KOOMANS, H.A. MESS, E.J.; GAILLARD, C.A.; RABELINK, A.J. Lithium clearance during variations in sodium intake in man: effects of sodium restriction and amiloride. **Eur. J. Clin. Invest.** 18:279-283, 1988.
121. THOMSEN, K.; OLESEN, O.V. Renal lithium clearance as a measure of the delivery of water and sodium from the proximal tubule in humans. **Am. J. Med. Sci.** 288:158-161, 1984.
122. ROOS, F.C.; KOOMANS, H.A.; MEES, E.J.; DELWI, I.M.K. Renal sodium handling in normal humans subjected to low, normal, and extremely high sodium supplies. **Am. J. Physiol.** 249:F941-947, 1985.
123. BADR, K.F.; ICHIKAWA, I. Prerenal failure: a deleterious shift from renal compensation to decompensation. **N. Engl. J. Med.** 319:623-629, 1988.
124. SCHIMDT, H.; MALL, A.; BACKHORN, H. Altered distribution pattern of Na-K ATPase and succinate dehydrogenase activities along the nephron in human acute post-transplant renal failure. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 23:27-34, 1985.
125. SCHIMDT, U.; DUBACH, U.C. Acute renal failure in the folate-treated rat: early metabolic changes in various structures of the nephron. **Kidney Int.** (suppl) 10:539-545, 1976.
126. STEINHAUSLIN, F.; BURNIER, M.; MAGNIN, J.L.; MUNAFO, A.; BUCLIN, T.; DIEZI, J.; BIOLLAZ, J. Fractional excretion of trace lithium and uric acid in acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.** 4:1429-1437, 1994.
127. BARRET, R.J. TAYLOR, D.R.; WRIGHT, K.F. Protective effect of p-chlorophenylalanine in glycerol-induced acute renal failure in rats. **Clin. Sci.** 77:145-147, 1989.
128. FLORES, J.; DIBONA, D.R.; BECK, C.H.; LEAF, A. The role of cell swelling in ischemic renal damage. **J. Clin. Invest.** 51:118-126, 1972.

129. CANAVESE, C.; STRATTA, P.; VERCELLONE, A. The case for oxygen free radicals in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. **Nephron** 49:9-15, 1988.
130. HUELSEMANN, J.L.; STERZEL, B.; mCKENZIE,D.E.; WILCOX, C.S. Effects of a calcium entry blocker on blood pressure and renal function during angiotensin-induced hypertension. **Hypertension** 7:374-379, 1985.
131. BROWN, B.; CHURCHILL,P.; Renal effects of methoxyverapamil in anesthetized rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 225:372-377, 1983.
132. WALLIA, R.; GREENBERG, A.; PUSCHETT, J.B. Renal hemodynamics and tubular transport effects of nitrendipine. **J. Lab. Clin. Med.** 105:498-503, 1985.
133. LEONETTI, G.; CUSPIDI, C.; SAMPIERI, L.; TERZOLI, L.; ZANCHETTI, A. Comparison of cardiovascular, renal, and humoral effects of acute administration of two calcium channel blockers in normotensive and hypertensive subjects. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 4:S319-S324, 1982.
134. LOUTZENHIZER, R.; EPSTEIN, M.; HORTON, C.; SONKE, P. Reversal by calcium antagonist nisoldipine of norepinephrine-induced reduction of GFR: evidence for preferential antagonism of preglomerular vasoconstriction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 232:382-387, 1985.
135. LOUTZENHISER, R.; HORTON, C.; EPSTEIN, M. Effects of diltiazem and manganese on renal hemodynamics: studies in the isolated perfused rat kidney. **Nephron** 39:382-388, 1985.
136. LOUTZENHISER, R.; EPSTEIN, M.; HORTON,C.; Modification by dihydropyridine type calcium antagonists of the renal hemodynamic response to vasoconstrictors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 9(suppl1):S70-S75, 1987.
137. STEELE, T.; CHALLONER-HUE, L.; Glomerular response to verapamil by isolated spontaneously hypertensive rat kidney. **Am. J. Physiol.** 248-F668-F673, 1985.
138. STEELE, T.H.; CHALLONER-HUE, L. Renal interactions between norepinephrine and calcium antagonists. **Kidney Int.** 26:719-724, 1984.
139. FLEMING, J.T.; PAREKH, N.; STEINHAUSEN, M. Calcium antagonists preferentially dilate preglomerular vessels of hydronephrotic kidney. **Am. J. Physiol.** 253:F1157-F1163, 1987.
140. CARMINES, P.K.; NAVAR, G. Disparate effects of Ca channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to ANG II. **Am. J. Physiol.** 256.F1015-F020, 1989.

141. LOUTZENHISER, R.; HAYASHI, K.; EPSTEIN, M. Calcium antagonists augment filtration rate (GFR) of angiotensin II-vasoconstricted isolated perfused rat kidney (IPRK) by dilating afferent but not efferent arterioles. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** S149, 1988.
142. LOUTZENHISER, R.; EPSTEIN, M.; HAYASHI, K.; HORTON, C. Direct visualization of effects of endothelin on the renal microvasculature. **Am. J. Physiol.** 258:F61-F68, 1990.
143. SNOWDONE, K.W.; FREUDENRICH, C.C.; BORLE, A.B. The effects of anoxia on cytosolic free calcium, calcium fluxes, and cellular ATP levels in cultured cells. **J. Biol. Chem.** 260:11619-11626, 1985.
144. SCHWERTSCHLAG, U.; SCHRIER, R.W.; WILSON, P. Beneficial effects of calcium channel blockers and calmodulin binding drugs on in vitro renal cell anoxia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 238:119-124, 1986.
145. WROBEL, J.; MICHALSKA, L. The effect of verapamil on intestinal calcium transport. **E. J. Pharmacol.** 45:385-387, 1977.
146. HUMES, H.D.; SIMMONS, C.F.; BRENNER, B.M. Effect of verapamil on the hydroosmotic response to antidiuretic hormone in toad urinary bladder. **Am. J. Physiol.** 239:F250-F253, 1980.
147. FRIEDMAN, P.F.; GESEK, F.A. Hormone-responsive Ca^{++} entry in distal convoluted tubules. **J. Am. Soc. Nephrol.** 4:1396-1404, 1994.
148. ROSE, U.M.; BINDELS, R.J.M.; JANSEN, J.W.C.M.; VAN OS, C.H. Effects of Ca^{++} channel blockers, low Ca^{++} and glycine on cell Ca^{++} and injury in anoxic rabbit proximal tubules. **Kidney Int.** 46:223-229, 1994.
149. KATZ, A.M. Basic cellular mechanisms of action of the calcium-channel blockers. **Am. J. Cardiol.** 55:2B-9B, 1985.
150. EPSTEIN, M. Calcium antagonists and renal hemodynamics: implications for renal protection. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2(suppl 1):S30-S36, 1991.
151. DEBOER, D.K.; TAKAHASHI, K.; JACOBSON, H.R.; BADR, K.F. Glomerular microcirculatory responses to platelet activating factor (PAF) in the rat. **Kidney Int.** 33:260, 1988.
152. TOLINS, J.P.; MELEMED, A.; SULCINER, D.; GUSTAFSON, K.S.; VERCELLOTTI, G.M. Calcium channel blockade inhibits platelet activating factor production by human umbilical vein endothelial cells. **Lipids** 26:1218-1222, 1991.

153. BELL, A.J.; LINDNER, A. Effects of verapamil and nifedipine on renal function and hemodynamics in the dog. **Renal Physiol.** 7:329-343, 1984.
154. DIBONA, G.F.; SAWIN, L.L. Renal tubular site of action of felodipine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 228:420-424, 1984.
155. LAROCHELLE, P. Renal tubular effects of calcium antagonists. **Kidney Int.** 41(Suppl.36):S49-S53,1992.
156. ENE, M.D.; WILLIAMSON, P.J.; ROBERTS, J.C. The natriuresis following oral administration of the calcium antagonists - nifedipine and nitrendipine. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 19:423-427, 1985.
157. KATZMAN, P.L.; DIBONA, G.F.; HOKFELT, B.; HULTHEN, L.H. Acute renal tubular and hemodynamic effects of the calcium antagonist felodipine in healthy volunteers. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2:1000-1006, 1991.
158. KRUSEL, L.R.; CHRISTENSEN, C.K.; PEDERSEN, O.L. Acute natriuretic effect of nifedipine in hypertensive patients and normotensive controls - a proximal tubular effect ? **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 332:121-126, 1987.
159. SANTOS, O.F.P.; BOIM, M.A.; BREGMAN, R.; DRAIBE, S.A.; BARROS, E.J.G.; PIROTZKY, E.; SCHOR, N. BRAQUET, P. Effect of platelet-activating factor antagonist on cyclosporine nephrotoxicity. **Transplantation** 47:592-595, 1989.

APÊNDICE

APÊNDICE

A comparação entre os grupos submetidos a análise de variância (ANOVA), realizada através do teste de Student Newman Keuls, é apresentada nos RESULTADOS (exceto eletrólitos).

TABELA 16. SÉRIE I. COMPARAÇÃO DO HEMATÓCRITO (%) E CREATININA SÉRICA EM RATOS NORMAIS (mg/dl) ANTES E APÓS JEJUM DE 12 HORAS.

ratos	Htc antes	Htc após	Creatinina antes	Creatinina após
1	48	52	0.58	0.42
2	46	51	0.52	0.44
3	49	53	0.50	0.37
4	50	51	0.44	0.44
5	45	52	0.44	0.74
6	49	50	0.50	0.45
7	48	51	0.44	0.67
8	50	53	0.44	0.45
média	48.1	51.6	0.48	0.49
desvio padrão	1.80	1.06	0.05	0.13

Htc antes vs Htc após: $p < 0.001$, teste T não pareado.

Creatinina antes vs Creatinina após: não significativo, teste T não pareado.

TABELA 17. SÉRIE I. HEMATÓCRITO (%) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (10ml/kg peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	52	53	46	48	38
2	51	52	47	57	45
3	53	55	60	48	40
4	51	58	58	56	48
5	52	51	73	45	36
6	50	56	50	62	42
7	51	52	46	53	32
8	53	56	46	44	
média	51.6	54.1	53.2	51.6	40.1
DP	1.06	2.47	9.75	6.39	5.43

ANOVA : $p < 0.01$

Controle vs 3 horas: $p < 0.05$, teste T não pareado.

TABELA 18. SÉRIE I. NÍVEIS SÉRICOS DE CREATININA (mg/dl) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (10 ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	0.42	1.16	1.92	2.20	4.20
2	0.44	1.09	1.57	1.07	4.60
3	0.37	0.45	1.40	2.80	5.80
4	0.44	0.47	1.35	2.50	6.80
5	0.74	0.63	1.53	1.40	2.38
6	0.45	1.07	1.19	2.18	2.65
7	0.67	1.29	1.42	2.77	4.95
8	0.45	1.02	1.44	1.83	6.60
média	0.49	0.90	1.48	2.09	4.75
DP	0.13	0.33	0.21	0.63	1.65

ANOVA : $p < 0.001$

TABELA 19. SÉRIE I. NÍVEIS SÉRICOS DE CPK (U l) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (10 ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	390	28450	30150	24930	390
2	510	2350	57200	9120	271
3	210	20150	34100	29620	480
4	240	34000	36300	24030	2280
5	450	29000	33700	19200	390
6	280	20610	7410	12810	9750
7	160	19880	25670	14610	1590
8	330	9010	4290	14370	270
média	331	20431	28602	18586	1790
DP	121	10553	16834	7056	3252

ANOVA : $p < 0.001$

TABELA 20. SÉRIE II. PESO DOS RATOS (g) / E PESO DOS RINS (mg/100g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	248/295	250/348	274/350	276/443	256/383
2	226/296	220/366	263/399	301/392	256/342
3	237/282	215/390	244/437	268/296	277/348
4	228/300	228/456	235/448	226/342	271/453
5	245/301	218/418	256/453	261/386	274/363
6	247/266	256/353	280/333	325/361	264/468
7	244/288	245/391	265/361	262/324	230/365
8	237/305		264/370	228/361	262/413
9	216/325		210/370	251/418	250/299
10				288/313	
média	236.4/295.9	233.1/389.3	254.5/391.8	268.6/364.1	260.0/382.0
DP	11.1/16.2	16.8/38.3	21.7/45.0	30.8/46.8	14.4/54.4

Peso ratos : ANOVA $p < 0.05$ Peso renal : ANOVA $p < 0.001$

TABELA 21. SÉRIE II. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E URINÁRIAS DE LÍTIO E SÓDIO EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
lítio sérico (mEq/l)	0.13±0.03	0.11±0.02	0.30±0.06*	0.27±0.10*	0.28±0.09*
lítio urinário (mEq/l)	0.21±0.05	0.35± 0.17	1.25±0.38	2.18±2.02**	0.71±0.36
sódio sérico (mEq/l)	145.5±1.51	136.2±3.59'	140.8±3.62	130.9±7.36'	137.0±7.81'
sódio urin. (mEq/l)	2.39±0.76	9.31±3.94	13.47±18.3	31.4±20.9**	15.83±14.29

ANOVA $p < 0.001$ (exceto sódio urin. $p = 0.01$)* $p < 0.05$ vs controle e 3 horas ** $p < 0.05$ vs controle, 3,6 e 24 horas' $p < 0.05$ vs controle

TABELA 22. SÉRIE II. VOLUME URINÁRIO (ml/min./100 g de rato) / E CLEARANCE DE CREATININA (ml/min/100 g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	40.6/450.3	23.6/456.4	50.1/326.1	3.0/46.5	19.1/99.6
2	49.0/194.0	26.5/422.7	34.5/196.7	5.5/99.2	23.0/89.2
3	43.9/397.4	18.1/266.5	13.6/180.1	27.6/232.0	28.8/95.3
4	60.6/303.2	3.28/75.4	20.2/194.1	34.2/185.1	17.1/28.6
5	40.1/238.6	15.2/346.3	22.1/143.7	16.2/131.8	28.5/141.1
6	56.3/199.9	16.9/284.7	39.5/229.5	17.9/143.5	13.5/40.9
7	37.9/367.7	35.7/263.6	49.6/362.0	34.0/207.4	42.7/162.4
8	55.5/398.6		44.1/172.2	23.3/168.2	33.7/84.2
9	42.4/432.5		38.0/270.4	4.9/56.2	48.0/129.6
10				32.1/112.4	
média	47.3/331.3	19.8/302.2	34.6/230.5	19.8/138.5	28.1/96.7
DP	8.2/100.0	10.1/125.6	13.2/74.1	12.2/61.5	11.4/43.8

Volume urinário: ANOVA $p < 0.001$

Clearance de creatinina: ANOVA $p < 0.001$

TABELA 23. SÉRIE II. CLEARANCE DE LÍTIO (ml/min/100 g de rato) / E CARGA FILTRADA DE SÓDIO (mEq/min/100g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	48.7/65.2	85.0/62.1	140.5/46.3	36.0/4.6	65.1/13.5
2	67.5/28.3	71.5/58.3	120.5/28.7	91.5/11.1	62.6/18.1
3	48.3/57.2	65.4/35.7	76.3/25.5	96.7/13.1	56.3/13.4
4	127.3/45.1	23.0/9.9	76.8/26.3	171.2/20.7	20.9/3.6
5	61.3/34.8	48.8/49.5	106.0/19.9	76.2/10.8	81.4/19.7
6	90.0/29.1	40.5/38.1	162.2/31.9	93.2/11.6	38.7/4.9
7	73.1/52.9	67.8/36.1	228.3/52.4	156.4/21.1	87.1/22.7
8	92.4/57.7		141.2/24.6	128.5/16.8	67.4/11.9
9	63.6/62.7		133.3/36.7	54.7/7.0	110.4/19.1
10				104.3/14.6	
média	74.6/48.1	57.4/41.3	131.6/32.4	100.8/13.1	65.5/14.1
DP	25.1/14.3	21.1/17.5	46.5/10.7	42.0/5.3	26.3/6.5

Clearance de lítio : ANOVA $p < 0.01$

Carga filtrada de sódio : ANOVA $p < 0.001$

TABELA 24. SÉRIE II. APORTE DISTAL DE SÓDIO (mEq/min/100 g de rato)/ E EXCREÇÃO URINÁRIA DE SÓDIO (mEq/min/100 g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	7.0/0.040	11.5/0.328	19.9/0.205	4.6/0.180	8.8/0.318
2	9.8/0.068	9.8/0.212	17.5/0.170	11.0/0.275	8.5/0.441
3	6.9/0.096	8.7/0.137	10.8/0.816	13.1/0.535	7.9/0.155
4	18.9/0.175	3.0/0.052	10.4/0.303	20.7/0.670	2.6/0.673
5	8.9/0.108	6.9/0.109	14.7/0.426	10.8/0.320	11.3/0.259
6	13.1/0.140	5.4/0.092	22.5/0.235	11.6/0.186	4.7/0.521
7	10.5/0.094	9.2/0.253	33.1/0.052	21.1/0.255	12.1/0.192
8	13.3/0.188		20.1/0.242	16.8/1.398	9.5/0.272
9	9.2/0.122		18.1/0.209	7.0/0.245	16.3/0.072
				14.6/0.574	
média	10.8/0.114	7.7/0.169	18.5/0.295	13.1/0.363	11.8/0.322
DP	3.7/0.047	2.8/0.098	6.8/0.219	5.3/0.173	5.6/0.190

Aporte distal de sódio : ANOVA $p < 0.01$

Excreção urinária de sódio : ANOVA $p < 0.001$

TABELA 25. SÉRIE II. FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE SÓDIO (%) / E FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE LÍCIO (%) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	0.06/10	0.53/19	0.43/58	2.9/80	2.3/66
2	0.24/34	0.37/17	0.56/61	2.2/92	3.6/69
3	0.17/12	0.41/25	3.10/42	1.6/41	1.2/59
4	0.39/42	0.52/31	1.15/39	3.0/92	18.4/73
5	0.31/25	0.22/14	2.00/73	1.7/58	1.3/58
6	0.48/45	0.24/14	0.72/70	1.0/65	10.3/96
7	0.18/19	0.68/26	0.10/63	0.9/75	0.8/53
8	0.33/23		0.97/82	6.2/76	2.2/80
9	0.20/14		0.56/49	3.3/97	0.3/85
				3.6/93	
média	0.26/24.8	0.42/20.8	1.07/59.6	2.64/76.9	4.48/71.0
DP	0.13/12.8	0.17/6.5	0.94/14.3	1.57/18.0	6.03/14.0

Fração de excreção de sódio : ANOVA $p < 0.05$.

Fração de excreção de lítio : ANOVA $p < 0.001$.

TABELA 26. SÉRIE II. FLUXO FRACIONAL URINÁRIO DURANTE MÁXIMA DIURESE (%) / E RELAÇÃO U/P DE CREATININA EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso)

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	9.0/11.0	5.1/19.3	5.3/6.5	6.4/15.5	19.1/5.1
2	25.2/4.0	6.2/15.9	17.5/5.7	5.5/18.0	25.7/3.9
3	11.0/9.0	6.7/14.6	7.5/13.2	11.9/8.4	30.2/3.3
4	19.9/5.0	4.3/22.9	10.4/9.6	18.4/5.4	59.7/1.6
5	16.8/5.9	4.3/22.6	15.3/6.5	12.3/8.1	20.2/4.9
6	28.1/3.5	5.9/16.8	17.2/5.8	12.4/8.0	33.7/3.0
7	10.3/9.7	13.5/7.4	13.7/7.3	16.4/6.1	26.0/3.8
8	13.9/3.4		25.6/3.9	13.8/7.2	40.1/2.5
9	9.8/10.2		14.0/7.1	8.7/11.3	37.0/2.7
10				28.5/3.5	
média	16.0/6.8	6.5/17.0	15.1/7.2	13.4/9.1	32.4/3.4
DP	7.0/3.1	3.1/5.3	5.0/2.6	6.6/4.4	12.4/1.1

Fluxo fracional urinário máximo : ANOVA $p < 0.001$.

Relação U/P de creatinina : ANOVA $p < 0.001$.

TABELA 27. SÉRIE II. REABSORÇÃO FRACIONAL PROXIMAL DE SÓDIO (%) / E REABSORÇÃO FRACIONAL DISTAL DE SÓDIO (%) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
1	88/99.4	81/97.1	61/98.9	22/96.1	34/96.3
2	65/99.3	83/97.8	39/99.0	8/97.5	53/94.8
3	87/98.6	76/98.4	57/92.4	58/95.9	41/98.0
4	58/99.0	70/98.2	60/97.0	7/96.7	27/74.0
5	74/98.7	86/98.4	26/97.0	42/97.0	42/97.7
6	54/98.9	86/98.3	29/98.9	35/98.4	4/88.9
7	80/99.1	75/97.2	36/99.8	24/98.7	47/98.4
8	76/98.5		18/98.8	23/91.6	19/97.1
9	85/98.6		50/98.8	3/96.5	15/99.5
10				7/96.0	
média	74.1/98.9	79.5/97.1	41.8/97.8	22.9/96.4	31.3/93.8
DP	12.5/0.32	6.0/0.56	15.9/2.22	17.9/1.95	16.2/8.06

Reabsorção fracional proximal : ANOVA $p < 0.001$.

Reabsorção fracional distal : ANOVA não significativo.

TABELA 28. SÉRIE III. PESO DOS RATOS (gramas) / E PESO RENAL (miligramas/100 g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg).

ratos	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
1	238/311	256/383	249/289	346/331	231/375
2	270/293	256/342	249/295	321/270	268/364
3	276/278	277/348	237/309	310/300	278/347
4	282/319	271/453	218/324	315/392	227/375
5	225/282	274/363	235/325	357/291	245/323
6	273/292	264/468	222/354	333/306	252/340
7	218/327	230/365	197/324	347/309	232/340
8	262/295	262/413	245/334	340/316	250/344
9	237/296	250/299	270/360	302/316	223/334
10	244/335				
média	252.5/302.8	260.0/382.0	235.3/324.2	319.1/315.0	245.1/347.6
DP	22.8/19.2	14.4/54.4	21.3/24.0	32.3/33.7	18.9/16.0

Peso dos ratos : ANOVA $p < 0.001$

Peso renal : ANOVA $p < 0.01$

TABELA 29. SÉRIE III. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LÍTIO E SÓDIO EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
lítio sérico (mEq/l)	0.16±0.02	0.28±0.09*	0.24±0.06	0.30±0.09*	0.19±0.05
lítio urinário (mEq/l)	0.28±0.05	0.71±0.36**	0.59±0.25**	0.79±0.17**	0.54±0.22**
sódio sérico (mEq/l)	143.2±1.99	137.0±7.81'	147.2±9.08	147.7±4.06	144.3±1.66
sódio urin. (mEq/l)	2.67±1.53	15.8±14.29'	6.38±8.44	6.06±5.14	3.20±1.67

ANOVA $p < 0.001$ (exceto sódio sérico $p < 0.01$)

* $p < 0.05$ vs controle e gli+nife+BN ** $p < 0.05$ vs controle

' $p < 0.05$ vs controle, gli+nife, gli+BN e gli+nife+BN

TABELA 30. SÉRIE III. VOLUME URINÁRIO (ml/min/100 g de rato) / E CLEARANCE DE CREATININA (ml/min/100g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5ml/kg de peso).

ratos	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
1	49.3/348	19.1/99.6	46.8/232.2	35.6/140.0	49.0/206.0
2	60.3/424	23.0/89.2	49.8/256.1	51.6/147.6	52.8/216.6
3	57.3/430	28.8/95.3	48.9/421.1	39.7/168.6	39.5/205.7
4	51.4/406	17.1/28.6	50.4/302.7	23.4/99.1	42.2/232.1
5	39.6/296	28.5/141.1	58.1/411.5	34.5/127.4	18.6/233.6
6	43.6/462	13.5/40.9	46.1/226.2	39.5/230.0	28.1/191.0
7	47.7/672	42.7/162.4	17.3/84.4	38.9/235.7	61.0/280.7
8	53.4/395	33.7/84.2	57.7/232.9	42.3/234.1	56.0/173.6
9	52.3/345	48.0/129.6	45.9/217.4	44.1/318.3	41.1/303.9
10	40.9/540				
média	49.5/431.8	28.2/96.7	46.7/264.9	38.8/188.9	43.1/227.0
DP	6.7/108.2	11.6/43.8	11.9/103.5	7.6/69.8	13.5/41.8

Volume urinário : ANOVA $p < 0.001$

Clearance de creatinina : ANOVA $p < 0.001$.

TABELA 31. SÉRIE III. CLEARANCE DE LÍTIO (ml/min/100 g de rato) / E CARGA FILTRADA DE SÓDIO (mEq/min/100 g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
1	78.9/49.7	65.1/13.5	66.9/34.5	84.4/20.8	83.3/30.0
2	114.8/62.7	62.6/18.1	87.1/41.2	118.7/22.2	147.7/30.9
3	114.4/61.0	56.3/13.4	127.2/63.5	131.2/23.9	94.9/29.8
4	113.1/57.2	20.9/3.6	92.3/47.8	48.3/13.9	113.9/33.1
5	81.3/42.3	81.4/19.7	130.1/56.7	93.2/19.2	59.8/33.8
6	78.3/65.6	38.7/4.9	112.6/33.2	102.7/33.3	103.9/28.0
7	95.4/96.7	87.9/22.7	48.4/11.1	105.0/35.5	122.0/39.8
8	106.8/56.4	67.4/11.9	150.2/33.3	123.7/35.3	145.6/24.8
9	72.9/48.9	110.4/19.1	101.1/31.7	125.3/47.4	115.0/44.0
10	49.1/77.7				
média	90.5/61.2	65.5/14.1	101.7/39.2	103.6/27.9	109.5/33.2
DP	21.9/16.3	26.3/6.5	32.1/15.4	25.9/10.5	28.1/7.2

Clearance de lítio : ANOVA $p < 0.05$

Carga filtrada de sódio : ANOVA $p < 0.001$.

TABELA 32. SÉRIE III. APORTE DISTAL DE SÓDIO (mEq/min/100 g de rato) / E EXCREÇÃO URINÁRIA DE SÓDIO (mEq/min/100 g de rato) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controles	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
1	11.2/0.064	8.8/0.318	9.9/0.037	12.5/0.135	12.1/0.198
2	16.9/0.247	8.5/0.441	14.0/0.109	17.9/0.077	21.1/0.266
3	16.2/0.120	7.9/0.155	19.2/0.288	18.6/0.401	13.7/0.106
4	15.9/0.066	2.6/0.673	14.5/0.070	6.8/0.421	16.2/0.116
5	11.6/0.213	11.3/0.259	17.9/0.174	14.8/0.062	8.6/0.026
6	11.1/0.069	4.7/0.521	16.5/0.161	15.8/0.146	15.2/0.059
7	13.7/0.071	12.1/0.192	6.3/0.484	15.8/0.190	17.3/0.384
8	15.2/0.256	9.5/0.272	21.5/0.467	18.6/0.207	20.8/0.184
9	10.3/0.135	16.3/0.072	14.7/0.123	18.6/0.260	16.6/0.047
10	7.1/0.081				
média	12.9/0.132	9.0/0.322	14.9/0.214	15.4/0.210	15.7/0.154
DP	3.1/0.08	4.0/0.19	4.6/0.17	3.8/0.13	3.9/0.12

Aporte distal de sódio : ANOVA $p < 0.01$

Excreção urinária de sódio : ANOVA $p < 0.05$.

TABELA 33. SÉRIE III. FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE SÓDIO (%) / E FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE LÍTIO (%) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controles	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
1	0.13/22	2.3/66	0.10/28	0.65/60	0.64/40.4
2	0.40/26	3.6/69	0.25/34	0.35/80	0.85/70.7
3	0.19/26	1.1/59	0.45/30	1.67/77	0.35/46
4	0.11/29	18.4/73	0.15/30	3.0/48	0.35/49
5	0.49/27	1.3/58	0.31/31	0.32/73	0.08/25
6	0.10/17	10.3/96	0.74/49	0.43/44	0.21/54.4
7	0.07/14	0.8/53	4.3/57	0.53/44	0.96/43.4
8	0.45/27	2.2/80	1.3/64	0.59/52	0.74/83
9	0.27/21	0.3/85	0.3/46	0.54/38	0.09/37
10	0.10/9				
média	0.23/21.9	4.48/71.0	0.88/41.0	0.90/57.3	0.47/49.7
DP	0.16/6.6	6.03/14.0	1.34/13.3	0.89/15.8	0.33/17.6

Fração de excreção de sódio : ANOVA $p < 0.05$

Fração de excreção de lítio : ANOVA $p < 0.001$.

TABELA 34. SÉRIE III. FLUXO FRACIONAL URINÁRIO DURANTE MÁXIMA DIURESE (%) / E RELAÇÃO U/P DE CREATININA EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
1	14.1/7.0	19.1/5.1	20.1/4.9	25.4/3.9	23.8/4.2
2	14.2/7.0	25.7/3.9	19.4/5.1	35.1/2.8	24.3/4.1
3	13.0/7.5	30.2/3.3	11.6/8.6	23.6/4.3	19.2/5.2
4	12.6/7.9	59.7/1.6	16.6/6.0	23.6/4.2	18.2/5.5
5	13.3/7.5	20.2/4.9	14.1/7.0	27.1/3.6	7.9/12.5
6	9.4/10.6	33.7/3.0	20.3/4.4	17.1/5.8	14.7/6.8
7	7.1/14.1	26.0/3.8	20.2/4.8	16.5/6.0	21.7/4.6
8	13.5/7.4	40.0/2.5	25.0/4.0	18.0/5.5	32.2/3.1
9	15.1/6.	37.1/2.7	21.1/4.	13.8/7.2	13.5/7.4
10	7.5/13.2				
média	11.9/8.8	32.4/3.4	18.7/5.5	22.2/4.8	19.4/5.9
DP	2.8/2.7	12.4/1.1	4.0/1.4	6.6/1.3	7.1/2.8

Fluxo fracional urinário : ANOVA $p < 0.001$

Relação U/P de creatinina : ANOVA $p < 0.001$.

TABELA 35. SÉRIE III. REABSORÇÃO FRACIONAL PROXIMAL DE SÓDIO (%) / E REABSORÇÃO FRACIONAL DISTAL DE SÓDIO (%) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	controle	glicerol	gli+nife	gli+BN	gli+nife+BN
1	77/99.4	34/96.3	71/99.6	39/98.9	59/98.3
2	73/98.5	53/94.8	66/99.2	19/99.5	29/98.7
3	73/99.2	41/98.0	69/98.5	22/97.8	54/99.2
4	72/99.5	27/74.0	69/99.5	51/93.8	51/99.3
5	73/98.1	42/97.7	68/99.0	22/99.5	74/99.7
6	83/99.3	4/92.3	50/99.0	52/99.0	46/99.6
7	85/99.5	47/98.4	43/92.0	55/98.8	56/97.7
8	73/98.3	19.97.1	35/97.8	47/98.8	16/99.1
9	79/98.6	15/99.5	54/99.1	60/98	62/99.7
10	91/98.8				
média	77.9/98.9	31.3/93.8	58.3/98.1	40.7/98.3	49.6/99.0
DP	6.4/0.5	16.2/8.0	13.0/2.3	15.9/1.7	17.5/0.6

Reabsorção fracional proximal : ANOVA $p < 0.001$

Reabsorção fracional distal : ANOVA $p < 0.05$.

TABELA 36. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA SEMI-QUANTITATIVA EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg). NÚMERO DE EVENTOS POR CAMPO.

campos	focos de necrose			cil. proteicos			cil. granulosos			cel.epit.desc.		
	gli	gli+nife	gli+BN	gli	gli+nife	gli+BN	gli	gli+nife	gli+BN	gli	gli+nife	gli+BN
1	4	2	0	3	1	1	0	1	4	3	4	2
2	1	2	0	7	0	0	0	1	1	0	7	2
3	6	2	0	8	0	0	0	0	3	1	6	0
4	2	3	0	7	0	1	3	1	4	1	3	1
5	2	0	0	5	0	1	1	1	1	2	4	0
6	2	0	0	5	2	3	2	2	2	3	5	0
7	1	2	0	3	0	1	0	2	1	4	5	1
8	1	2	0	5	0	4	2	2	3	5	5	2
9	1	2	0	8	1	1	0	0	0	5	5	1
10	2	2	0	4	0	4	1	0	0	4	6	2
11	0	2	1	2	0	5	3	3	5	1	9	8
12	1	1	1	2	0	4	4	3	5	0	2	10
13	0	2	0	0	0	3	2	3	3	0	6	10
14	1	2	0	0	0	1	3	2	4	0	2	11
15	1	0	0	1	0	3	4	3	7	1	1	8
16	1	1	0	5	0	1	2	3	4	0	5	6
17	1	1	0	0	0	1	3	4	4	1	4	5
18	2	1	0	5	0	3	4	1	6	3	3	10
19	1	1	0	1	0	0	3	0	6	2	4	7
20	0	1	0	3	0	2	2	4	4	3	2	8
21	2	0	4	5	0	4	1	2	5	6	3	3
22	3	0	1	3	0	0	0	2	4	3	3	6
23	1	0	2	3	0	0	0	2	2	2	2	6
24	3	1	4	4	0	0	0	3	6	3	5	8
25	3	0	4	8	0	2	1	0	7	4	1	5
26	0	3	2	3	1	1	1	0	7	4	3	5
27	3	1	2	2	0	2	0	4	8	7	4	6
28	4	1	2	4	0	0	0	2	6	4	2	5
29	4	1	1	7	3	1	1	1	6	5	3	4
30	3	3	2	4	0	1	0	2	6	3	4	5
31	1	0	5	1	1	0	0	2	6	2	6	4
32	0	1	3	2	2	2	0	1	6	1	2	6
33	1	0	3	2	1	4	0	4	4	1	6	5
34	1	1	5	1	2	1	0	1	5	3	6	4
35	1	0	4	0	0	3	0	0	4	1	3	8
36	0	0	5	0	0	0	1	1	6	3	4	8
37	1	0	0	1	0	3	1	2	2	2	3	4
38	0	0	1	1	1	5	1	1	5	1	3	6
39	1	0	10	2	1	0	0	2	10	6	2	6
40	0	0	10	1	2	5	0	1	6	1	5	8
41	0	0	0	9	0	1	3	2	4	0	4	4
42	0	0	0	1	0	0	1	2	4	0	4	4
43	1	0	1	2	0	0	0	3	4	1	3	6
44	1	0	1	5	0	0	2	5	4	1	6	7
45	2	0	0	5	0	0	1	2	4	2	4	2
46	0	1	0	0	1	0	2	6	4	3	6	3
47	0	0	0	3	1	0	2	4	3	0	6	5
48	1	0	0	2	1	0	4	3	1	0	6	8
49	1	0	0	5	3	0	2	4	3	2	5	8
50	1	3	4	4	0	0	1	4	4	1	8	4

51	1	1	4	1	0	0	2	0	0	3	6	8
52	1	3	4	2	0	0	0	1	0	4	6	4
53	0	2	1	1	0	4	0	0	0	3	5	4
54	1	2	2	0	0	0	0	1	0	3	9	4
55	1	2	4	1	0	0	0	0	1	6	5	6
56	1	1	1	0	0	6	1	1	0	4	4	3
57	1	2	1	1	0	4	0	0	0	0	4	5
58	1	1	4	0	0	3	0	1	0	3	4	5
59	1	0	2	1	0	4	1	0	0	6	5	5
60	0	3	2	0	1	0	0	1	2	0	4	4
61	2			5			1			4		
62	1			2			0			4		
63	2			2			0			4		
64	3			0			0			4		
65	2			2			0			5		
66	3			6			0			6		
67	1			1			0			5		
68	0			0			0			2		
69	2			2			0			4		
70	1			1			0			5		
71	2			0			0			7		
72	4			5			3			9		
73	3			1			4			9		
74	2			3			1			8		
75	2			2			2			8		
76	3			6			2			6		
77	3			6			1			4		
78	2			3			0			4		
79	2			5			3			9		
80	1			2			0			4		

(CONTINUAÇÃO DA TABELA 36)

TABELA 37. SÉRIE III B .PESO DOS RATOS, PESO RENAL, VOLUME URINÁRIO E CLEARANCE DE CREATININA EM RATOS NORMAIS DESIDRATADOS CONTROLES E TRATADOS .

PESO DOS RATOS (g)/
PESO RENAL (gr/100 g de rato)

VOLUME URINÁRIO (ml/min/100g de rato) /
CLEARANCE DE CREATININA (ml/min/100g rato)

ratos	controle	nifedipina	BN 52021	controle	nifedipina	BN 52021
1	248/259	262/272	234/319	40.6/450.3	71.8/840	36.3/392.3
2	226/296	243/281	278/315	49.0/194.0	57.6/483	37.4/339.9
3	237/282	250/284	236/307	43.9/397.4	57.6/512	35.6/349.1
4	228/300	245/282	257/260	60.6/303.2	48.2/511	44.7/359.5
5	245/301	233/284	232/293	40.1/338.6	56.1/319	49.1/358.6
6	247/266	237/278	250/282	56.3/199.9	61.5/387	38.0/144.4
7	244/288	224/322	256/309	37.9/367.7	48.3/429	35.4/208.9
8	237/305	243/294	234/305	55.5/398.6	58.2/442	46.1/261.9
9	216/325			42.4/432.5		
média	236.4/295.8	242.1/287.4	247.1/302.0	47.3/331.3	57.4/490.3	40.3/301.8
DP	11.0/16.1	11.3/15.3	16.1/20.2	8.2/100.0	7.5/155.5	5.4/87.3

Peso ratos : ANOVA não significante
Peso renal : ANOVA não significante

Volume urinário: ANOVA $p < 0.001$
Clearance de creatinina: ANOVA $p < 0.01$

TABELA 38. SÉRIE III B. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS E URINÁRIAS DE LÍTIO E SÓDIO EM RATOS NORMAIS DESIDRATADOS CONTROLES E TRATADOS.

	controle	nifedipina	BN 52021
lítio sérico (mEq/l)	0.13±0.03	0.13±0.03	0.13±0.04
lítio urinário(mEq/l)	0.21±0.05	0.18±0.03	0.17± 0.05
sódio sérico(mEq/l)	145.5±1.5	140.6±2.62	138.7±6.45*
sódio urin.(mEq/l)	2.39±1.09	2.61±1.09	1.46±0.45**

ANOVA $p < 0.05$ (sódio sérico e urin.)

* $p < 0.05$ vs controle

** $p < 0.05$ vs controle e nifedipina

TABELA 39. SÉRIE III B. CARGA FILTRADA DE SÓDIO E EXCREÇÃO URINÁRIA DE SÓDIO EM RATOS NORMAIS DESIDRATADOS CONTROLES E TRATADOS.

CARGA FILTRADA DE SÓDIO/ APORTE DISTAL
DE SÓDIO (mEq/min/100 g de rato)EXCREÇÃO URINÁRIA DE SÓDIO
(mEq/min/100 g de rato)

ratos	controle	nifedipina	BN 52021	controle	nifedipina	BN52021
1	65.2/7.1	120.9/14.4	56.8/8.4	0.040	0.071	0.091
2	28.3/9.8	66.6/8.7	47.5/6.7	0.068	0.155	0.048
3	57.2/6.9	72.7/8.2	50.9/7.2	0.096	0.144	0.053
4	45.1/18.9	73.0/8.2	47.0/6.4	0.175	0.086	0.071
5	34.8/8.9	44.9/16.6	51.2/6.2	0.108	0.185	0.054
6	29.1/13.1	53.0/16.8	20.5/5.3	0.140	0.166	0.049
7	52.9/10.5	59.2/6.6	27.1/5.0	0.094	0.106	0.038
8	57.7/13.3	62.7/15.7	34.8/11.0	0.188	0.273	0.059
9	62.7/9.2			0.122		
média	48.1/10.8	69.1/11.8	41.9/7.0	0.11	0.15	0.06
DP	14.3/3.7	23.0/4.3	12.9/1.	0.05	0.06	0.02

Carga filtrada de sódio: ANOVA $p < 0.05$
Aporte distal de sódio: ANOVA $p < 0.05$ Excreção urinária de sódio: ANOVA
 $P < 0.05$

TABELA 40. SÉRIE III B. FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE SÓDIO, FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE LÍTIO, REABSORÇÃO FRACIONAL PROXIMAL E REABSORÇÃO FRACIONAL DISTAL EM RATOS NORMAIS DESIDRATADOS CONTROLES E TRATADOS.

FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE SÓDIO (%) /
FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE LÍTIO (%)REABS.FR. PROX. (%) /
REABS. FR. DIST. (%)

ratos	controle	nifedipina	BN 52021	controle	nifedipina	BN 52021
1	0.6/10	0.05/12	0.16/15	88/99.4	88/99.5	86/98.9
2	0.24/34	0.23/13	0.10/14.3	65/99.3	87/98.2	86/99.2
3	0.17/12	0.19/11	0.10/14.2	87/98.6	89/98.2	85/99.2
4	0.39/42	0.11/11	0.15/13.6	58/99.0	88/98.9	86/98.9
5	0.31/25	0.40/36	0.10/12.3	74/98.7	63/98.9	87/99.1
6	0.48/45	0.30/31	0.24/26.3	54/98.9	68/99.0	74/99.0
7	0.18/19	0.17/11	0.14/18.6	80/99.1	88/98.3	81/99.2
8	0.33/23	0.43/25	0.16/31.6	76/98.5	75/98.2	68/99.4
9	0.20/14			85/98.6		
média	0.26/24.9	0.24/19.0	0.14/18.4	74.1/98.9	80.7/98.6	81.5/9.1
DP	0.13/12.8	0.13/10.5	0.05/7.0	12.5/0.32	10.5/0.49	6.9/0.17

Fração de excreção de sódio: ANOVA não significativo.
Fração de excreção de lítio: ANOVA não significativo.Reabsorção fracional proximal de sódio:
ANOVA não significativo.
Reabsorção fracional distal de sódio:
ANOVA não significativo.

TABELA 41. SÉRIE III C. CREATINA-FOSFOQUINASE (UI)/ PESO DOS RATOS (gr) EM RATOS COM IRA INDUZIDA POR GLICEROL (5 ml/kg de peso).

ratos	glicerol	glicerol+nifedipina	glicerol+BN 52021
1	5520 / 188	1679 / 180	6750 / 208
2	5600 / 208	1122 / 204	2117 / 190
3	5820 / 210	8170 / 205	3246 / 180
4	5000 / 190	3722 / 200	5170 / 190
5	1541 / 190	2411 / 208	1043 / 184
média	4696.2 / 197.2	3420.8 / 198.4	3665.2 / 190.4
DP	1789.2 / 10.8	2827.7 / 13.3	2303.7 / 10.7

Creatina-fosfoquinase : ANOVA não significativo

Peso dos ratos : ANOVA não significativo