

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica
Mestrado e Doutorado

**TGF- β_1 : participação
no desenvolvimento da
Nefropatia Diabética Experimental**

Estudo prospectivo de 10 meses

Marcello Casaccia Bertoluci

Orientadora: Profa. Dra. Helena Schmid

Co-Orientadora: Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra

*Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Medicina.*

Porto Alegre, 16 de fevereiro de 1995

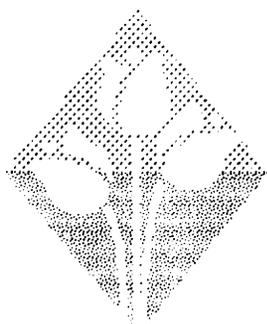
Ficha Catalográfica

Bertoluci, Marcello Casaccia

TGF- β_1 : Participação no desenvolvimento
da nefropatia diabética experimental.

Estudo prospectivo de 10 meses. Porto Alegre, 1995.

**Nefropatia Diabética, Glomerulosclerose diabética,
TGF- β , Transforming Growth factor-beta.**



À Andrea, Mirella e Mariana,
por serem o motivo de tudo.

Orientadores

Orientadora:

Professora Dra. **Helena Schmid**

Professora adjunta do Departamento de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da UFRGS / Porto Alegre / RS.

Co-orientadora:

Professora Dra. **Terezila Machado Coimbra**

Professora adjunta do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da USP / Ribeirão Preto / SP.

Banca Examinadora:**Titulares**

Prof. Dr. Roberto Zatz - Universidade de São Paulo

Prof^a.Dra. Maria Tereza Zanella - Escola Paulista de Medicina

Prof^a. Dra. Poli Mara Spritzer- UFRGS

Suplente:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo - PUC-RS

* Este estudo foi realizado nos laboratórios de fisiologia renal e de morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

Apoio financeiro da FAPESP

Colaboração: FAPERGS e CAPES.

Agradecimentos

À professora *Dra. Helena Schmid*, por ter aberto as portas para que este se iniciasse, por todo o incentivo e pela nossa grande amizade.

À professora *Dra. Terezila Machado Coimbra*, em especial, por toda a orientação e ajuda pessoal que recebi, pelo seu permanente entusiasmo e pragmatismo, pela convicção de estar no caminho certo e especialmente pela nossa amizade.

Ao professor *Dr. João-José Lachat*, em especial, pela sua inestimável contribuição na parte de imunohistoquímica, cujos dados foram obtidos na totalidade em seu laboratório, sob sua supervisão, no departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo seu entusiasmo neste projeto, e principalmente pela nossa amizade.

Ao professor *Dr. Wamberto Varanda* pelas profícuas discussões em fisiologia, pela revisão de textos, pela gentileza de abrir seu laboratório para utilização de seu equipamento de informática entre outros, e pela nossa amizade.

À *Cleonice Alves da Silva* (Departamento de Fisiologia Renal da USP) pelo seu imprescindível suporte técnico e pela sua dedicação incansável, durante todas as fases do trabalho.

À *Juelmir Antonio Malafatti* (Departamento de Morfologia da USP) pelo suporte técnico com a imunohistoquímica.

À *Marcelo Gonçalves* (departamento de morfologia da USP) pelo suporte técnico com a densitometria óptica.

Índice

Resumo.....	7
Summary.....	9
Introdução.....	11
Objetivo do estudo.....	29
Material e métodos.....	30
Resultados.....	43
Discussão.....	69
Conclusões.....	83
Referências bibliográficas.....	84

Resumo

O *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β_1) é uma citocina cuja principal ação é a de estimular a síntese de matriz extra-celular por diversos tipos celulares. A nefropatia diabética caracteriza-se pelo acúmulo de matriz extra-celular no glomérulo, especialmente ao nível da região mesangial. Estudos recentes têm demonstrado que o TGF- β_1 é produzido no glomérulo de modelos experimentais de ratos com diabetes mérito de início recente, mas o seu papel na patogênese e na evolução da glomerulosclerose diabética não está totalmente estabelecido. O objetivo do presente trabalho foi o de investigar a produção e a distribuição do polipeptídeo do TGF- β_1 no rim de ratos durante a evolução da nefropatia diabética experimental e as possíveis correlações entre a produção deste polipeptídeo e a glomerulosclerose diabética.

Foi avaliada a distribuição intra-renal do polipeptídeo do TGF- β_1 através de imunohistoquímica e a sua produção renal através dos níveis de mRNA-TGF- β_1 no córtex e no glomérulo de ratos Wistar com diabetes mérito induzido pela estreptozotocina antes e após o início da nefropatia diabética. Estudou-se ainda, seriadamente, a excreção urinária de albumina, a taxa de filtração glomerular, a medida do volume glomerular, imunohistoquímica para colágeno tipo I e a histologia renal com coloração para colágeno total.

Os resultados mostraram a presença de marcada reação imunohistoquímica para TGF- β_1 , sendo que esta foi progressivamente mais intensa nos glomérulos de ratos com 24 e 40 semanas de diabetes

a qual se correlacionou com a albuminúria ($r=0.905$, $p<0.01$), e associou-se temporalmente à presença de colágeno total e tipo I nos glomérulos. O conteúdo glomerular de mRNA-TGF- β_1 foi maior em ratos diabéticos 20 semanas após o início da hiperglicemia, enquanto que o mRNA-TGF- β_1 no córtex foi 30% menor nestes ratos, quando comparado a seus respectivos controles de 1 semana ($p<0.01$), 8 e 40 semanas ($p<0.05$). Estes dados sugerem que o polipeptídeo TGF- β_1 possa ter um papel importante na patogênese da glomerulosclerose diabética.

Summary

TGF- β_1 (Transforming Growth Factor- β_1) is a cytokine which has been demonstrated to increase extra-cellular matrix synthesis by many cells. Diabetic nephropathy is essentially characterized by extra-cellular matrix deposition in mesangial region. Recent studies have shown that the polypeptide TGF- β_1 is produced in glomeruli of experimental models of rats with untreated diabetes mellitus of recent onset, but its role in the genesis of diabetic glomerulosclerosis has not been established. The aim of the present study was to investigate the production and distribution of TGF- β_1 peptide in the kidney of rats during the evolution of experimental diabetic nephropathy and to evaluate the possible relationship of TGF- β_1 peptide and diabetic glomerulosclerosis.

We evaluated the intrarenal distribution of TGF- β_1 polypeptide and the mRNA-TGF- β_1 levels in glomeruli and renal cortex in Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes before and after the onset of diabetic nephropathy. Serial urinary albumin excretion, glomerular filtration rate, glomerular volume, renal histology with total collagen staining and immunohistochemical reaction for type I collagen were also studied. The results showed progressively higher glomerular immunohistochemical reaction for TGF- β_1 staining in the rats with diabetes of 24 and 40 weeks duration. It was correlated with albuminuria ($r=0.905$, $p<0,01$) and was temporally associated with the appearance of glomerular deposition of total and type I collagen. Glomerular content of

TGF- β_1 mRNA was increased in diabetic rats 20 weeks after injection, while cortical TGF- β_1 mRNA level was about 30% lower in diabetic rats when compared with time-paired controls at 1 week ($p < 0.01$), 8 and 40 weeks ($p < 0.05$). These data suggest that TGF- β_1 is an important mediator of diabetic glomerulosclerosis.

INTRODUÇÃO

Introdução

A importância do estudo da nefropatia diabética está relacionada ao fato de a mesma ser a patologia renal mais prevalente encontrada nos grandes centros de hemodiálise dos E.U.A e da Europa, sendo responsável por cerca de 33% de todas as novas entradas em programa de hemodiálise entre 1986 e 1989 [USRDS, 1991] e a maior causa isolada de insuficiência renal crônica nestes locais, estando presente em aproximadamente 35% dos pacientes diabéticos insulino-dependentes (DMID) [Andersen et al, 1983] e entre 15 e 60% dos pacientes com diabetes mérito não-insulinodependente (DMNID) [Fabre et al, 1982; Nelson et al 1989]. Seu mecanismo patogênético entretanto ainda está indefinido, especialmente aquele que regula o acúmulo de matriz extra-celular, que é a característica da glomerulosclerose diabética. Com o surgimento da biologia molecular, o papel de diversos peptídios de sinalização celular, conhecidos como citocinas, têm sido crescentemente investigado em diversas patologias renais. A motivação para este estudo surgiu do fato de que, entre estes peptídios, o *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) apresenta múltiplas funções, particularmente a de estimular a produção de matriz extra-celular, e seu papel ainda não é conhecido na nefropatia diabética. Assim, a abordagem das características estruturais e funcionais do rim antes e após o surgimento da nefropatia diabética, bem como das vias patogênicas que poderiam induzir o aparecimento da glomerulosclerose diabética e possível participação do TGF- β , são

essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese desta nefropatia.

Características da nefropatia diabética

A alteração estrutural mais precocemente observada no rim de pacientes com diabetes mérito (DM) é o aumento da massa renal que se surge às custas de hipertrofia glomerular e tubular, persistindo durante a evolução da nefropatia diabética, mesmo após o surgimento da insuficiência renal. Em ratos com DM induzido pela estreptozotocina, diversas evidências da presença de hipertrofia são encontradas desde o início da hiperglicemia. O rim apresenta um aumento da relação RNA/DNA [Seyer-Hansen et al, 1976] e da síntese protéica ribossomal renal [Peterson et al, 1971] nas primeiras 24h da hiperglicemia; o peso renal aumenta 15% em relação ao seu basal em 3 dias, e se estabiliza entre 70 e 90% acima do basal após 6 semanas [Seyer-Hansen et al, 1976] e o volume glomerular apresenta um crescimento progressivo nas primeiras 6 semanas após o início do diabetes, estabilizando-se em torno de 40% acima do basal [Seyer-Hansen et al, 1980].

Na medida em que a doença avança, a membrana basal glomerular apresenta um aumento progressivo de toda a sua espessura, o qual é detectado em pacientes diabéticos a partir de 2 anos de DMID [Østerby et al, 1975] e, no diabetes experimental, após 6 semanas da indução da hiperglicemia [Østerby et al, 1980]. Este espessamento ocorre principalmente às custas de um aumento da produção de colágeno tipo IV que se distribui por toda a espessura da membrana [Haneda et al 1991]. Concomitantemente a isto existe uma redução do

conteúdo da proteoglicana aniônica, heparan-sulfato, a qual normalmente confere eletronegatividade à membrana basal [Makino et al, 1993]. A perda desta eletronegatividade está associada ao surgimento da albuminúria no diabetes [Viberti et al, 1983].

A alteração mais marcante da nefropatia diabética é a presença de um acúmulo progressivo de matriz extra-celular (MEC) ao nível da região mesangial [Østerby et al, 1980]. Esta deposição de matriz extra-celular apresenta correlação inversa com a taxa de filtração glomerular em pacientes com nefropatia diabética [Mauer et al, 1984] e é responsável pela redução gradual da superfície capilar de filtração, e conseqüentemente pela perda progressiva de néfrons. O resultado é uma lenta e progressiva queda da taxa da filtração glomerular que culmina em insuficiência renal crônica [Hostetter et al, 1991].

A composição da matriz extra-celular encontrada no mesângio durante a glomerulosclerose diabética apresenta diferenças quantitativas e qualitativas nos seus componentes em relação à encontrada no glomérulo normal. Estudos de imunohistoquímica em biópsias renais de pacientes com nefropatia diabética mostram que as lesões difusas apresentam aumento de colágeno tipos IV, e V, de laminina, de fibronectina e uma redução significativa do heparan-sulfato. Nas lesões nodulares, o colágeno tipo IV está reduzido, mas as quantidades de colágeno tipo VI, V e III, e de fibronectina estão aumentadas [Nerlich et al 1991; Nerlich et al 1994; Bruneval et al, 1985]. A presença de colágeno do tipo I nas lesões nodulares da glomerulosclerose em humanos foi observada em apenas um estudo e ainda necessita ser confirmada [Glick et al, 1992]. A presença de colágenos do tipo VI e III

nas lesões nodulares, por serem colágenos intersticiais, provavelmente são responsáveis pela irreversibilidade deste tipo de lesão [Nerlich et al, 1994]. A presença de insulina parece ser importante para a presença de colágeno tipo III, como foi observado em um estudo com ratos diabéticos induzido pela estreptozotocina. Neste estudo foi demonstrado que o aumento de matriz mesangial ocorre com ou sem tratamento insulínico. mas existe maior presença de colágeno tipo III no glomérulo quando os ratos diabéticos e controles são tratados com insulina [Abrass et al, 1988].

Entre as alterações funcionais renais observadas no rim diabético destacam-se a hiperfiltração glomerular e a albuminúria. A hiperfiltração glomerular é um achado precoce no DMID e tende a persistir durante muitos anos. Este aumento varia entre 27% [Christiansen et al, 1981] e 40% em relação ao basal [Mogensen et al, 1971], especialmente em pacientes jovens com DMID de início recente, sendo menos marcado no diabetes mérito não-insulino dependente [Myers e cols, 1991]. A normalização do controle glicêmico pode reduzir a taxa de filtração glomerular nas fases iniciais de pacientes com DMID [Mogensen & Andersen, 1975; Sandhal-Christiansen et al, 1981b; Wiseman et al, 1985] e em ratos com diabetes experimental [Stackhouse et al, 1990]. Este efeito no entanto, em humanos, não é observado quando já existe nefropatia diabética instalada [Feldt-Rasmussen et al, 1986].

O aumento da taxa de filtração glomerular no diabetes experimental decorre da maior redução do tônus da arteríola aferente em relação ao da arteríola eferente, com conseqüente aumento do fluxo plasmático renal e da pressão hidráulica transcáпилar, resultando em um aumento da

taxa de filtração glomerular [Hostetter et al, 1981; Zatz et al, 1985]. Diversas anormalidades podem aumentar a pressão hidráulica transglomerular no rim diabético [Hostetter et al, 1981; Zatz et al, 1985]: a hiperglicemia aguda *per se* [Wiseman et al, 1985], a deficiência de insulina [Bank et al, 1987], o aumento da concentração intra-celular de sorbitol associado à redução do mio-inositol [Goldfarb et al, 1986], o aumento da concentração glomerular de prostaglandinas vasodilatadoras como a PGE₂ [Schambelam et al, 1985; Barnett et al, 1987], o aumento da concentração plasmática do peptídeo atrial natriurético [Ortola et al, 1987], e a deposição glomerular de produtos de glicosilação não-enzimática [Sabbatini et al, 1992]. Nenhum destes fatores entretanto foi demonstrado até o momento, de forma inequívoca, ser suficiente isoladamente para o desenvolvimento da hiperfiltração no diabetes mérito, e uma etiologia multifatorial é portanto a mais provável.

A proteinúria persistente acima de 500 mg/24h é característica do início da fase clínica da nefropatia diabética. Ela é precedida por uma elevação sub-clínica da excreção urinária de albumina, denominada microalbuminúria, convencionalmente definida como a carga excretada de albumina entre 30 a 300 mg/24h [Viberti et al, 1982] sendo predictiva para o surgimento de nefropatia clínica no DMID e DMNID e para mortalidade cardiovascular no DMNID [Messent et al, 1992]. Aproximadamente 20% dos pacientes com DMID [Parving et al, 1988] e 25% dos DMNID [Damsgaard et al, 1986], sem proteinúria detectável, excretam quantidades maiores do que o normal de albumina urinária.

Patogênese da glomerulosclerose diabética

Fatores hemodinâmicos-renais

Diversas evidências indicam que o aumento da pressão capilar glomerular seja um dos principais fatores na patogênese da glomerulosclerose diabética: 1) a progressão da expansão mesangial no rim remanescente de ratos diabéticos uni-nefrectomizados é mais rápida em comparação aos rins de ratos diabéticos não-nefrectomizados [Steffes et al, 1978]; 2) rins clipados de ratos diabéticos apresentam lesões de glomerulosclerose diabética menos intensas do que os respectivos rins contralaterais não-clipados [Mauer et al, 1978]; 3) ratos com DM induzido por estreptozotocina submetidos à dieta hiperprotéica apresentam glomerulosclerose mais precocemente quando há aumento da pressão intra-glomerular induzida por dieta hiperprotéica, independentemente do controle metabólico [Zatz et al, 1985]; 4) a redução da pressão capilar glomerular a níveis normais com o inibidor da enzima conversora da angiotensina, enalapril, confere proteção para o surgimento da glomerulosclerose em ratos diabéticos [Zatz et al, 1986]. No entanto, quando ratos não-diabéticos são submetidos à ablação renal não se observa a mesma correlação entre a pressão capilar glomerular e lesão glomerular em um mesmo glomérulo [Yoshida et al, 1980]. Desta forma, a hipertensão capilar glomerular parece ser um fator importante, porém a presença da hiperglicemia é essencial para o surgimento da glomerulosclerose diabética.

Fatores metabólicos:

Tanto o efeito direto da glicose como o da glicosilação não-enzimática podem estar implicados na patogênese da glomerulosclerose diabética. A evidência que sustenta a participação direta da glicose deriva de estudos *in vitro*. Nestes, observou-se que células mesangiais, endoteliais e epiteliais glomerulares, quando submetidas a um meio contendo alta concentração de glicose, aumentam a sua síntese de componentes da matriz extra-celular como de colágeno do tipo IV [Haneda et al, 1991; Danne et al, 1993; Ayo et al, 1990, Ayo et al, 1991 Pugliese et al, 1994], de fibronectina, laminina e de colágeno do tipo VI [Pugliese et al, 1994]. Este efeito independe da osmolaridade do meio de cultura, pois as células mesangiais não aumentam a secreção destes componentes quando o meio de cultura é suplementado com manitol no lugar da glicose [Pugliese et al, 1994]. Os mecanismos pelo qual a glicose poderia aumentar esta síntese de matriz extra-celular não são totalmente conhecidos, porém têm sido propostos: 1) a formação de produtos de glicosilação não-enzimática [Cohen et al, 1994a; Cohen et al, 1994b]; 2) alterações bioquímicas relacionadas com a utilização da glicose pela via dos polióis, como o aumento da relação NADH/NAD⁺ (em função da oxidação do sorbitol em frutose) que por sua vez ativa a proteína quinase C, [Craven et al, 1989, Pugliese et al, 1994], e da redução intra-celular do mio-inositol [Pugliese et al, 1994] e 3) um possível aumento da concentração intra-celular de radicais livres, causando estresse oxidativo [Ceriello et al, 1992].

Fatores genéticos

As evidências de que fatores genéticos também podem estar envolvidos na patogênese da nefropatia diabética derivam basicamente de estudos epidemiológicos: 1) existe maior prevalência de hipertensão arterial entre parentes de pacientes com DMID, portadores de microalbuminúria ou nefropatia diabética [Viberti et al, 1987; Krolewski et al, 1988] e de doença cardiovascular [Earle et al, 1992]; 2) o contra-transporte sódio-lítio, aceito como um marcador genético confiável para hipertensão essencial [Canessa et al, 1980; Hasstedt et al, 1988], correlacionou-se diretamente com os níveis de albuminúria de pacientes com DMID [Lopes de Faria et al, 1992]. Estes dados são sugestivos de que a predisposição familiar para hipertensão arterial e para doença cardiovascular pode aumentar o risco para o surgimento nefropatia diabética em alguns pacientes, mas a base genética para este risco ainda não está definida.

Participação das citocinas na nefropatia diabética

As citocinas são peptídios sintetizados por células para transmissão de sinais intracelulares (atividade autócrina) e intercelulares (atividade parácrina). Sua ação pode abranger a regulação do remodelamento tecidual, tanto o planejado (como na embriogênese e no desenvolvimento) como o não planejado (inflamação, proliferação celular, reparação tecidual e a carcinogênese) como também o " *turnover* " da matriz extra-celular, atuando sobre a síntese e a degradação dos seus sub-componentes. Estas ações podem ser

estimulatórias ou inibitórias, dependendo da influência de outras citocinas e do estado fisiológico da célula alvo e da matriz extra-celular [Border & Noble 1993].

Tanto células mesangiais como epiteliais renais respondem às citocinas de 3 formas: com hipertrofia, com proliferação celular ou com produção de matriz extra-celular. O papel de algumas citocinas é conhecido em diversas patologias inflamatórias renais, mas muito pouco está definido com relação ao seu papel na patogênese da nefropatia diabética.

A IGF-I (*insulin growth factor-1*) é um peptídeo de 70 aminoácidos, cuja expressão é induzida pelo hormônio do crescimento, entre outros mecanismos, tendo receptores homólogos aos da insulina [Daniel et al 1992], os quais já foram identificados em células mesangiais em cultura [Aron e cols 1989] e em glomérulos intactos [Conti e cols 1989]. A produção local de IGF-I no rim parece ser mais importante do que a sistêmica no controle do crescimento renal, especialmente na hipertrofia induzida pelo hormônio do crescimento. Considerando que os níveis de hormônio do crescimento estão elevados no diabetes mal controlado, é possível que a hipertrofia renal do diabetes, pelo menos em parte, possa estar sendo mediada pela IGF-I [Schwieger & Fine 1990]. A evidência disto parte da observação de que, em um estudo, ratos diabéticos apresentaram um aumento significativo do conteúdo renal de IGF-I 24h após o surgimento da hiperglicemia [Flyvbjerg et al 1990]. Entretanto, Nakamura e cols 1993 não evidenciaram aumento do mRNA-IGF-I no glomérulo destes ratos, indicando que o aumento de produção local de IGF-I não ocorre a nível

de transcrição de RNA. Isto não afasta a possibilidade de haver um possível mecanismo translacional [Flyvbjerg et al 1990], ou a IGF-I poderia também ter sua presença mediada por infiltração renal de macrófagos, já que foi demonstrado que a modulação da expressão do gene da IGF-I em fagócitos mononucleares é importante tanto para reparação tecidual como para a patogênese da fibrose [Nagaoka et al, 1990].

O PDGF (*platelet derived growth factor*) é um peptídeo que foi inicialmente observado em plaquetas, mas também é produzido por diversos tipos celulares em cultura e apresenta uma ação mitogênica sobre diversas células especialmente os fibroblastos e células musculares lisas [Daniel 1992]. As células mesangiais, e as endoteliais renais podem expressar o mRNA que codifica o PDGF, mas os receptores específicos do PDGF são descritos apenas nas células mesangiais sendo estas portanto, as principais células-alvo para o PDGF no rim [Shultz et al 1988]. O PDGF também é liberado por macrófagos infiltrantes e por plaquetas ativadas. Tais observações motivaram estudos que têm sugerido uma possível participação do PDGF em glomerulonefrites com proliferação mesangial [Fellstrom et al 1989].

No diabetes experimental, recentemente detectou-se aumentos significativos da produção do mRNA-PDGF glomerular em ratos, indicando haver um aumento da produção de PDGF no glomérulo destes animais [Nakamura et al, 1993]. Parece existir também um aumento da atividade proliferativa no sobrenadante de plaquetas de pacientes com DMID, relacionada ao PDGF [Hamet et al, 1985].

Especula-se com isto, que a degranulação de plaquetas, ou a infiltração de macrófagos ou mesmo as células glomerulares poderiam aumentar o conteúdo renal de PDGF no diabetes. Mais estudos, contudo, ainda são necessários para avaliar o possível efeito deste aumento de PDGF na patogênese da nefropatia diabética.

O TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) é uma citocina produzida especialmente por macrófagos e células mesangiais em resposta a diversos estímulos agressores, com um importante papel regulatório na resposta inflamatória. O TNF- α tem um efeito estimulatório indireto na proliferação das células musculares lisas vasculares via liberação plaquetária e endotelial de PDGF [Brownlee et al, 1988]. A sua secreção produz alterações endoteliais que levam a um aumento da permeabilidade vascular [Brownlee et al, 1988].

Existe um aumento significativo dos níveis de RNA-TNF- α no glomérulo de ratos diabéticos [Nakamura et al, 1993]. Também, já foi demonstrado que produtos de glicosilação não-enzimática podem ligar-se a receptores de TNF- α em macrófagos e assim estimular a sua produção [Brownlee et al, 1988]. Tais evidências sugerem uma possível participação do TNF- α na nefropatia diabética. Embora não esteja estabelecida uma relação de causa-efeito, estes dados apontam para uma possível atuação conjunta do TNF- α e outras citocinas na patogênese da nefropatia diabética, especialmente relacionado a um aumento da permeabilidade vascular.

A interleucina-1 (IL-1) também é sintetizada e secretada por células mesangiais, as quais são dotadas de receptores específicos. Esta citocina tem efeito proliferativo sobre células

endoteliais, mesangiais, musculares-lisas e fibroblastos, podendo também aumentar a síntese de colágeno tipo IV.

O papel potencial da IL-1 na nefropatia diabética ainda não está estabelecido [Brownlee et al, 1988]. Contudo, produtos da glicosilação avançada também podem ligar-se a receptores em macrófagos estimulando sua síntese em conjunto com o TNF- α [Brownlee et al, 1988].

Os dados relativos ao FGF (*Fibroblast growth factor*) são discrepantes no diabetes. Um autor demonstrou não haver aumento significativo do mRNA-FGF no córtex renal de ratos com diabetes melíto [Karpen e cols 1992], enquanto que o grupo de Nakamura e cols 1993 observou um aumento dos níveis de RNA-FGF no glomérulo. Possivelmente estas diferenças sejam atribuídas à diferença do material estudado (córtex/glomérulo) e não afastam uma participação deste peptídeo na indução da fibrose no rim diabético.

Participação do TGF- β na nefropatia diabética

Entre as citocinas acima referidas, o TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) possivelmente seja o que tenha maior importância na patogênese da nefropatia diabética. O TGF- β é uma citocina multifuncional que foi inicialmente isolada a partir de plaquetas humanas [Assoian et al, 1983], e posteriormente foi constatada estar presente em diversos tipos celulares. O TGF- β é encontrado sob três isoformas moleculares: TGF- β_1 , β_2 , β_3 , que dividem uma ação biológica semelhante. O mais estudado entre estes é o TGF- β_1 , o qual é sintetizado a partir de um peptídeo precursor de 391 aminoácidos que é

posteriormente clivado por proteases, dando origem a um complexo conhecido como TGF- β latente. Este complexo é formado por um dímero composto por 2 monômeros de 12,5 kD interligados por pontes dissulfeto (TGF- β ativo) que se apresenta ligado a outro dímero de 75 kD, conhecido como *peptídio associado à latência*, originário dos fragmentos restantes da clivagem do seu precursor o qual confere inatividade à molécula do TGF- β_1 . À exceção das plaquetas, onde o TGF- β é liberado na sua forma ativa, o TGF- β_1 é usualmente secretado sob a forma latente, depositando-se na superfície das células ou na matriz extra-celular, sendo ativado *in vivo* por mecanismos ainda não conhecidos. Outra proteína conhecida como *proteína de ligação do TGF- β* também pode ligar-se ao *Peptídio Associado à Latência*, formando o grande complexo latente. A função desta proteína ainda não é totalmente conhecida [Border & Noble, 1994].

Três tipos de receptores específicos para o TGF- β_1 são atualmente conhecidos. Os receptores tipo I e II [Ebner et al, 1993] são serina-treonina quinases que se localizam na membrana celular e mediam respectivamente a síntese de matriz extra-celular e a proliferação celular. O receptor tipo III [Lopez-Castillas et al, 1994] é uma proteoglicana conhecida como betaglicana que fica aderida à membrana celular mas não tem efeito sinalizador intra-celular conhecido, sendo responsável por fixar o TGF- β à membrana celular de forma a apresentá-lo às demais estruturas.

Diversos níveis de regulação são possíveis no sistema TGF- β . Os níveis de mRNA-TGF- β podem ser afetados tanto por um aumento da sua taxa de transcrição gênica como por uma redução da taxa de

degradação do transcrito. O peptídeo TGF- β por sua vez é regulado tanto pelo grau de ativação do complexo latente, como pela taxa de ligação do TGF- β a diversas proteínas de ligação, tanto intra como extracelulares, afetando assim a biodisponibilidade da molécula ativa. Algumas citocinas podem aumentar a expressão do TGF- β *in vitro*, como o EGF em células NRK e o ácido retinóico em queratinócitos e em células NRK (TGF- β_2) [Danielpour et al, 1990]. O TGF- β também parece ter sua secreção potentemente estimulada pelo PDGF em fibroblastos durante a cicatrização da pele [Pierce et al 1989]. O mecanismo de regulação do sistema TGF- β_1 , no entanto, ainda não está definido, mas recentemente foi demonstrado a presença de sítios específicos no gene promotor do TGF- β_1 , denominados sítios AP-1, que ligam-se ao complexo protéico Jun/Fos, que é um produto da expressão de proto-oncogenes, os quais estão implicados no controle da transcrição gênica [Sharma & Ziyadeh, 1993].

A presença do TGF- β_1 já foi demonstrada em diversos tecidos em animais adultos. Thompson et al [1989] observaram presença de marcada reação imunohistoquímica no córtex adrenal, na medula óssea, em miócitos cardíacos, condrócitos, em células ovarianas e em túbulo distal renal de camundongo, utilizando anticorpo policlonal anti-TGF- β_1 . MacKay et al (1990) verificaram, em glomérulo de ratos normais, a presença de grande quantidade de mRNA-TGF- β_1 bem como da atividade para TGF- β_1 . As quantidades de mRNA-TGF- β_1 e de mRNA-TGF- β_2 nos glomérulos foram várias vezes maior do que as observadas no rim total e no cortex. Os mesmos autores detectaram também, a presença de receptores de alta afinidade para TGF- β_1 em cultura de

células endoteliais, mesangiais e epiteliais glomerulares de camundongo [MacKay et al, 1989].

Em humanos, a distribuição do TGF- β_1 , ao nível do rim, foi estudada através de imunofluorescência indireta por Yoshioka et al [1994] em porções histologicamente normais de biópsias renais obtidas de pacientes com trauma, litíase ou tumor renal. Os resultados mostraram marcada presença de TGF- β_1 ativo nas arteríolas glomerulares com mínima reação no mesângio. O TGF- β_1 latente apresentou reação na membrana basal glomerular e na cápsula de Bowman, sendo também, menos acentuada no mesângio.

O TGF- β_1 exerce papel fundamental no controle da resposta inflamatória, da cicatrização, e da remodelação tecidual. Em termos gerais, ele coordena a seqüência de eventos da resposta inflamatória que inclui a ação quimiotática sobre neutrófilos, monócitos, células T e fibroblastos, bem como a indução da secreção de outras citocinas como o FGF, TNF- α , IL-1, PDGF e inclusive do próprio TGF- β . Ele também exerce efeito na formação do tecido de granulação bem como na proliferação celular durante a reparação tecidual [Border & Noble, 1994].

De todos os efeitos do TGF- β o mais peculiar é a sua capacidade de promover acúmulo de matriz extra-celular. Isto ocorre devido a indução de um aumento da produção de vários componentes da matriz extra-celular, associado a uma redução da sua degradação através de um efeito simultâneo, seja reduzindo a produção de proteases, seja aumentando a síntese de seus inibidores. Além disso o TGF- β também aumenta a síntese de receptores de superfície, conhecidos como

integrinas, através das quais as células se aderem aos componentes da matriz, promovendo maior adesão celular à matriz extra-celular.

O TGF- β_1 estimula a síntese de vários componentes da matriz extra-celular nas células renais residentes. Em células mesangiais de ratos o TGF- β_1 aumenta a síntese de colágeno tipo IV, I, fibronectina e proteoglicanas [MacKay et al, 1989; Creely et al, 1992; Border et al, 1990]. Células epiteliais também demonstram aumento de fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas em resposta ao TGF- β . Em fibroblastos derivados do interstício renal, em cultura, a resposta ao TGF- β_1 , por sua vez, é aumentar a produção de colágeno tipo I, III e V. Tais dados fornecem evidências indiretas que o TGF- β possa participar in vivo na geração e manutenção da membrana basal glomerular, da matriz mesangial ou na formação de glomerulosclerose.

O TGF- β tem sido implicado na patogênese da fibrose que ocorre em diversos modelos experimentais e em doenças humanas. Em modelos experimentais o TGF- β_1 já foi demonstrado participar: 1) ao nível de fígado, na esquistossomose e na fibrose induzida pelo tetracloreto de carbono [Czaja et al, 1989]; 2) ao nível de pulmão, na fibrose induzida pela Bleomicina [Khalil et al, 1993]; 3) na pele, durante a cicatrização normal [Sporn & Roberts, 1993]; 4) em artérias, durante a re-estenose vascular [Wolf et al 1994]; 5) no sistema nervoso central, durante a cicatrização após lesão, e 6) ao nível do rim, na reação inflamatória tanto na glomerulonefrite aguda induzida por anticorpo anti-célula do Timo [Okuda et al, 1990] como na glomerulonefrite anti-membrana basal [Coimbra et al, 1991].

Na doença humana, o TGF- β tem sido implicado na patogênese da fibrose que ocorre: ao nível de fígado, na cirrose [Castilla et al 1991] e na doença veno-oclusiva [Anscher et al, 1993]; a nível de pulmão, na fibrose pulmonar idiopática [Anscher et al, 1993]; ao nível da pele, na formação de quelóides [Peltonen et al, 1991] e na esclerose sistêmica [Kulozik et al, 1990]; e ao nível do rim, na glomerulonefrite [Yoshioka et al 1993], na rejeição de enxerto renal alogênico [Shihab et al 1993], e na nefropatia por HIV [Border et al, 1993b].

Três linhas de evidências apontam para uma relação de causa-efeito entre a produção elevada de TGF- β_1 e o acúmulo de matriz extra-celular nos modelos experimentais descritos. Em primeiro lugar, os eventos *in vivo* que regulam o acúmulo de matriz extra-celular (aumento da produção de matriz extra-celular, inibição da atividade da protease e aumento da expressão de integrinas) tem sido reproduzido *in vitro* pela incubação de células glomerulares normais com TGF- β_1 [Okuda et al, 1990; Tomooka et al, 1992; Kagami et al, 1993]. Em segundo lugar a injeção de anti-TGF- β_1 em ratos nefríticos demonstrou ser capaz de bloquear o acúmulo de matriz extra-celular [Border et al, 1990] e, por fim, a transfecção do gene do TGF- β_1 em rim de ratos normais acarreta um aumento da produção de TGF- β_1 , bem como um rápido desenvolvimento de glomerulosclerose [Isaka et al, 1993].

Considerando os dados acima referidos, o surgimento das alterações estruturais e funcionais renais no DM parece ser conseqüência da participação de diversos fatores tanto hemodinâmicos como metabólicos, decorrentes do surgimento da hiperglicemia sustentada. O papel do TGF- β_1 , como elo de ligação entre a agressão

inicial e sustentada causada pela hiperglicemia e o surgimento da glomerulosclerose, é uma possibilidade que ainda necessita ser testada. Um aumento do conteúdo de mRNA ao nível de glomérulo em ratos com diabetes experimental não-tratados com insulina foi recentemente documentado no início da hiperglicemia [Yamamoto et al, 1993], mas o papel do TGF- β_1 durante o surgimento da glomerulosclerose diabética permanece desconhecido. É possível então, que o TGF- β_1 atue estimulando a produção de matriz extra-celular mesangial, uma vez que sua ação resulta em alterações morfológicas semelhantes às encontradas na nefropatia diabética.

Objetivos do estudo

O presente trabalho tem por objetivos:

1. Avaliar a produção de TGF- β_1 , quantificando o conteúdo de mRNA para esta citocina nos glomérulos e córtex renal de ratos diabéticos durante o surgimento da glomerulosclerose.
2. Avaliar, utilizando a imunohistoquímica, a distribuição renal e o conteúdo de TGF- β_1 e colágeno tipo I, neste modelo experimental.
3. Analisar possíveis correlações entre a presença do polipeptídeo TGF - β_1 e a glomerulosclerose diabética.

Material e Métodos

Material e métodos

Animais

Foram estudados ratas Wistar, fêmeas, com peso entre 160 e 190g tornadas diabéticas através de injeção endovenosa pela veia caudal de estreptozotocina (STZ) (60mg/kg), diluída em tampão citrato de sódio (0,01M, pH 4,5). Os animais foram mantidos em dieta irrestrita e normoprotéica (18% de proteínas), tratados com insulina NPH (1.0 UI/d), com injeções diárias, para manter os níveis de glicose plasmática entre (300-500 mg/dl). O controle metabólico foi aferido através de fitas reagentes (glicose-oxidase) específicas para glicose (Haemoglukotest, Boehringer). Ratas controles, de peso semelhante, não-diabéticas foram injetadas com a solução de citrato de sódio. Foi considerado como início do diabete a data da injeção de STZ.

Desenho experimental

Os animais foram sacrificados em diferentes períodos para: 1) quantificação do mRNA específico para TGF- β_1 em córtex renal em ratos diabéticos e controles com 1, 8 e 40 semanas de diabete; 2. Análise imunohistoquímica renal para TGF- β_1 e colágeno tipo I em ratos diabéticos e controles com 1, 8, 16, 24 e 40 semanas e 3. Quantificação do mRNA/TGF- β_1 em glomérulo isolado em ratos diabéticos e controles com 20 semanas. O modelo experimental utilizado foi avaliado por testes de função renal (taxa de filtração glomerular, excreção urinária de albumina, excreções fracionada de sódio e potássio, depuração osmolar

e transporte de água livre no ducto coletor) e histomorfometria (Histologia renal com coloração HE (hematoxilina/eosina), Tricrômio de Masson para avaliação de colágeno total, e medida do volume glomerular). Os parâmetros adotados para a validação do modelo foram: 1) O surgimento de hiperfiltração glomerular (definida como um aumento superior a 2 desvios-padrão da média do grupo controle; 2) a presença de carga excretada de albumina sustentadamente superior a 2 desvios-padrão dos controles da mesma faixa de idade; 3) a presença de crescimento glomerular determinado através de histomorfometria; 4) demonstração histológica da presença de glomeruloesclerose.

Modelo Experimental

Estudo da Função Renal

Taxa de filtração glomerular (TFG):

A taxa de filtração glomerular foi estudada em 22 ratos diabéticos (D) e 18 controles (C) com 1 semana (Dn=6 e Cn=6), 8 semanas (Dn=11 e Cn=6) e 40 semanas (Dn=5 e Cn=6) da STZ, pelo método da depuração de inulina previamente validado [Fuher et al, 1955]. Os animais são anestesiados com Nembutal 40 mg/kg, ip. Após entubação traqueal, a artéria e veia femural são canuladas para coleta de sangue e administração de líquidos e ambos os ureteres canulados para coleta de urina. Os animais receberam uma dose inicial ("Priming") de 12 mg/100g de inulina diluída em PBS (Solução de NaCl 0,15M tamponada com PO_4 0,01M, pH 7,2), e em seguida uma dose de manutenção de 0,5mg/min/100g através de uma bomba de infusão. Após um período de estabilização de 60 minutos, coletou-se

urina durante 2 períodos de 30 minutos, e plasma ao término do período. Ao final, os animais foram sacrificados por perfusão. A dosagem de inulina foi feita por colorimetria através de reação com a Antrona. A curva padrão foi obtida com amostras de 35, 50 e 100 mg / % de frutose.

Carga excretada de albumina (CEA)

A carga excretada de albumina foi avaliada em amostras de urina de 24h, de um grupo de 8 ratos diabéticos e 8 controles após 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 36 e 40 semanas da injeção de STZ através de eletroimunoensaio em gel de agarose desenvolvido por Laurell et al [1972] e adaptado por Coimbra et al. [1983]. As amostras foram obtidas colocando-se os ratos em gaiolas metabólicas e após conservadas em azida sódica 2%. Utilizou-se anticorpo anti-albumina de rato desenvolvido em coelhos, neste laboratório, e padrões de albumina de rato de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$, e agarose 1% (Tipo I, Sigma).

Excreção Fracional de Sódio (EF_{Na}) e Potássio (EF_{K}), Clearance Osmolar (C_{Osm}) e Transporte de Água no Ducto Coletor ($T^c_{\text{H}_2\text{O}}$)

Foram feitas dosagens urinárias e plasmáticas de sódio e potássio e medidas da osmolaridade sérica e urinária em ratos diabéticos com 8 semanas (n=9), 16 semanas (n=6), 24 semanas (n=4) e 40 semanas (n=4) após a injeção de STZ e em 1 grupo controle inicial (n=4).

Utilizou-se um fotômetro de chama (Corning photometer 400) para as dosagens de sódio e potássio e o método da redução do ponto de congelamento, (Fiske, Osmometer, Ma. U.S.A) para medida da osmolaridade. A excreção fracional corresponde à porcentagem da carga excretada de um determinado soluto que foi filtrada pelos glomérulos e foi obtida pela razão clearance do soluto referido pelo clearance da inulina x 100 e expresso em %, e o clearance osmolar multiplicando-se a osmolaridade urinária pelo fluxo urinário e dividindo pela osmolaridade plasmática. O transporte de água no ducto coletor foi obtido a pela diferença entre o clearance osmolar e o fluxo urinário no mesmo período.

Análise histológica e morfométrica

Os rins dos animais sacrificados após o estudo da Taxa de filtração glomerular foram utilizados para análise histológica e morfométrica. Foi utilizada a coloração Hematoxilina-Eosina e Tricrômio Masson para análise histológica e do conteúdo total de colágeno renal respectivamente.

O volume elipsóide glomerular (VG) foi medido nas preparações histológicas de ratos diabéticos (D) e controles (C) com 1 semana (Dn=3 Cn=3); 8 semanas (Dn=4 Cn=3) e 24 semanas (Dn=3 e Cn=3). Utilizou-se a medida do perímetro dos 50 primeiros glomérulos periféricos encontrados em cada lâmina, observados através de um microscópio óptico acoplado a uma câmara clara e a um analisador de imagens semi-automático (Mini-MOP, Kontron Bildanalyse). A estimativa do VG é obtida a partir da conversão matemática da área de

cada glomérulo em volume elipsóide. Os valores são expressos em $1 \times 10^{-5} \text{ mm}^3$.

Análise do RNA

Preparo do Córtex renal

Tecido cortical renal foi obtido de 18 ratos diabéticos (D) e 19 controles (C), com 1 semana (Dn=6 Cn=6), 8 semanas (Dn=8 Cn=8) e 40 semanas (Dn=4 Cn=5) da injeção de STZ. Os animais foram anestesiados, os rins foram perfundidos com PBS (NaCl 0.15M, tampão fosfato 0,01M, pH 7,2) e ambos os rins retirados. A gordura e a cápsula renal foram removidas, e o córtex separado à temperatura de 4°C. Fragmentos de aproximadamente 500 mg de córtex foram obtidos por cada animal.

Isolamento de glomérulos

Os glomérulos foram obtidos a partir de um *pool* de 12 animais controles e 16 diabéticos com 20 semanas da injeção de Estreptozotocina (ou tampão citrato de sódio) e submetidos ao processo de filtragem seqüencial. Os ratos foram anestesiados com eter etílico, os rins perfundidos com PBS gelado, a gordura e a cápsula foram removidas, e o córtex separado sobre uma placa de Petri à temperatura de 4°C. O córtex foi cortado em fragmentos de até 1 mm e o material colocado sobre um filtro de 180 μm através da qual se instila PBS gelado. O filtrado foi novamente passado através de um segundo filtro de 106 μm e posteriormente através de um terceiro de 75 μm que retém os glomérulos. O filtrado foi centrifugado com 1080 G à temperatura de

4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi decantado e o sedimento analisado com um microscópio invertido. Amostras contendo 95% de glomérulos intactos foram então utilizadas para extração do RNA.

Extração do RNA

Utilizamos a técnica do Fenol / Clorofórmio [Chomczynski et al 1987] para extração de RNA mensageiro. O material contendo ou o córtex ou os glomérulos foi suspenso em um tampão de homogeneização contendo:

Tiocianato de Guanidina 4M
EDTA 5 mM
Tris 50 mM, pH 7,4
pH 7,4
2-Mercaptoetanol 0,36ml/50ml

à 4°C e então homogeneizado com um Polytron.

A solução contendo o homogeneizado foi imediatamente re-suspendida em :

- sarcosil 10%
- acetato de sódio 2M, pH 4,0
- fenol
- clorofórmio/álcool isoamila (50:1)

Após repouso por 15 minutos, o material homogeneizado foi centrifugado a 3000 r.p.m durante 20 minutos à 10°C. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado de modo a evitar aspirar a interface. O sobrenadante foi novamente re-suspendido em etanol 100% e deixado precipitar durante a noite. Após, o mesmo foi re-centrifugado à 10.000 r.p.m por 20 minutos à 4°C, o sedimento ressuspendido em solução de homogeneização e novamente precipitado em etanol 70%, centrifugado e lavado com etanol 70%. A quantificação foi realizada através de espectrofotometria com leitura em 260 e 280 nm. Índices (260/280) superiores a 1.65 foram utilizados para hibridização.

Análise do RNA total

Dot-Blot

Para fixação e quantificação do RNA total, foram utilizadas membranas de Nitrocelulose ou Nylon (Schleicher & Schuel, Zetabind, UNO), através da técnica já descrita [Church & Gilbert, 1984]. A membrana é umidificada na solução SSC 6x:

NaCl 3M

Citrato de sódio 0.3M

pH 7.0

acoplada a uma câmara contendo orifícios para aplicação. Os orifícios foram preenchidos com a solução SSC 6X e em seguida aplicou-se vácuo. Amostras de 20µg de RNA total diluídas em 10 µl de água tratada com DEPC foram acrescentadas da solução :

- Formamida 100% 20 μ l
- Formaldeído 37% 7 μ l
- Solução 6 x SSC 2 μ l

e incubadas por 15 minutos à 68°C e, imediatamente após, resfriadas em gelo. As amostras foram diluídas em 400 μ l de solução SSC 6x e aplicadas sobre a membrana em concentrações decrescentes (10 μ g, 5 μ g e 2.5 μ g) e posteriormente fixadas à 80°C por 2h.

Northern-Blot

Com o objetivo de avaliar a presença de degradação do RNA total, utilizamos a técnica de Northern blot descrita por Maniatis et al 1982. Concentrações de 30 μ g de RNA total foram aplicadas a um gel de agarose 1% contendo formaldeído 37% e tampão fosfato 20%, e submetidas à eletroforese. O RNA do gel foi transferido para membranas de nylon ou nitrocelulose, corado com azul de metileno e fixado para hibridização.

Marcação do cDNA

Utilizamos o c-DNA específico obtido pela excisão do plasmídeo p β as (que continha a seqüência de DNA para TGF- β_1 humano) pela enzima de restrição EcoR₁, e purificado através de eletroforese em agarose. O c-DNA foi gentilmente cedido pelo Dr. Roger Wiggins, - Ann-Arbour, Michigan, U.S.A. Utilizamos a técnica "*Random-Priming*", com a abertura da dupla-hélice do DNA e incorporação de citidina marcada com [³²P] no DNA sintetizado na presença de nucleotídeos e DNA polimerase (Boehringer Mannheim Biochemical). A separação dos

fragmentos marcados foi feita em colunas de sephadex G-50. Os fragmentos purificados são marcados com atividade específica de 1×10^9 dpm / μ g.

Hibridização

As membranas foram pré-hibridizados por um período de 4 horas à 60°C em um envólucro plástico com uma solução contendo:

Solução de Denhart 2x,
SSC 6x
SDS 0,1x

Posteriormente foi adicionado cDNA sonificado de esperma de salmão (para inibir ligações inespecíficas) e o c-DNA específico para TGF- β_1 marcado, na concentração de 105 pg/ml, e deixado por um período de 16 horas à 60°C em banho de agitação contínua. Os filtros foram posteriormente lavados com uma solução contendo:

SSC 2x
SDS 0,5%

em temperatura ambiente, e em seguida com a solução:

SSC 1X
SDS 0.5%

à 68 °C por um período de 20 minutos, por 3 vezes. Auto-radiogramas das membranas foram obtidos após 7 dias de incubação em contato com filmes (X-OMAT AR, Kodak) à -70°C. A quantificação foi feita através de densitometria óptica.

Com o objetivo de corrigir eventuais diferenças nas quantidades de RNA total aplicado à membrana, realizamos hibridização com uma sonda c-DNA específica para a fração 28S do RNA de rato. A relação entre a intensidade do sinal para o TGF- β_1 pelo obtido para o 28S foi utilizada para análise.

Imunohistoquímica

Foram estudadas 14 ratas diabéticas (D) e 10 controles (C) com 1 semana (Dn=2 Cn=2); 8 semanas (Dn=3 Cn=2); 16 semanas (Dn=3 Cn=2); 24 semanas (Dn=3 Cn=2), e 40 semanas (Dn=3 Cn=2) da injeção de Estreptozotocina.

Os animais foram anestesiados com eter etílico e submetidos à perfusão renal com PBS até o branqueamento. Imediatamente após, os rins foram removidos, a gordura renal e a cápsula foram retiradas e então os rins foram fixados em solução de Bouin. Posteriormente os rins foram lavados em etanol 70%, desidratados através de uma seqüência decrescente de soluções de etanol e então foram incluídos em Paraplast (Eletron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Os mesmos foram cortados na espessura de 3 μ m, re-hidratados e incubados durante a noite a 4°C com um anticorpo monoclonal anti-TGF β_1 de camundongo (1D11.16, 20 μ g/ml - generosamente cedido

pelo Dr L. Ellingsworth, PhD - Celtrix Pharmaceutical Inc. Palo Alto, CA) ou com um anticorpo policlonal anti-colágeno tipo I de rato produzido em coelho diluído 1/200 (Chemicon International INC., Temecula, CA). Usou-se como segundo anticorpo biotinilado, anti-IgG de camundongo ou coelho respectivamente e o produto da reação foi revelado pela Avidina-Peroxidase (Vectastain, Vector Lab., Burlingame, CA).

A coloração da reação foi obtida com 3,3 diamino-benzidina (Electron Microscopy Sciences). As ligações não-específicas foram bloqueadas por incubação com soro de cabra 5% em PBS por 30 min. Os controles consistiram em substituir o anticorpo anti-TGF- β_1 ou anti-colágeno tipo I por IgG de rato ou coelho normais.

Utilizamos um método semi-quantitativo [Raij et al, 1984] para graduar a reação imunohistoquímica com anticorpo anti- TGF- β_1 . A cada 100 glomérulos observados por lâmina, correspondente a um rato individual cada, foram atribuídos escores de 0 a 3 baseados na intensidade da reação como se segue: 0 (nenhuma reação), 1 (presença de reação em 25% do tufo glomerular), 2 (50% do tufo glomerular) ou 3 (mais de 75% do tufo glomerular). O escore final de cada rato foi obtido através da equação a seguir:

$$\text{Escore} = \sum F_i(i)$$

onde F_i é a porcentagem de glomérulos com um dado score i .

Análise estatística

Utilizamos teste T para amostras independentes em todos os testes exceto na análise da Taxa de filtração glomerular e do volume

glomerular onde utilizamos ANOVA para dados paramétricos com teste de Scheffe e correção de Bonferoni. Os dados da excreção urinária de albumina foram previamente transformados em \log_{10} para análise. Utilizamos correlação de Person para o valor de r entre os escores da imunohistoquímica para TGF- β_1 e a excreção urinária de albumina. O nível de significância considerado foi $p < 0.05$.

Resultados

Resultados

Controle metabólico

Somente os animais que apresentaram hiperglicemia sustentada entre 300 e 500 mg/dl foram utilizados no estudo. A carga excretada de glicose em 24h de ratos diabéticos com 8 a 40 semanas e a glicemia com 8 semanas de diabetes estão representadas na tabela 1. Todos os controles apresentaram níveis normais de glicose plasmática. O ganho ponderal dos ratos diabéticos foi significativamente inferior ao do grupo controle ($p < 0,05$) (figura 1).

Tabela 1 Glicemias e glicosúrias de ratos diabéticos e controles. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n= número de animais.

Glicemia (mg / %)

Semana	Diabete	Controle	p
8	458 \pm 7 n=16	113 \pm 7 n=8	p<0,001

Glicosúria (mg / 24h)

Semana	Diabete	Controle	p
8	4613 \pm 379 n=14	2,8 \pm 0,3 n=7	p<0,001
24	1978 \pm 145 n=6	-	-
28	4786 \pm 434 n=5	-	-
30	4202 \pm 739 n=5	-	-
38	5587 \pm 598 n=9	-	-
40	4845 \pm 274 n=8	2,4 \pm 0,2 n=8	p<0,001

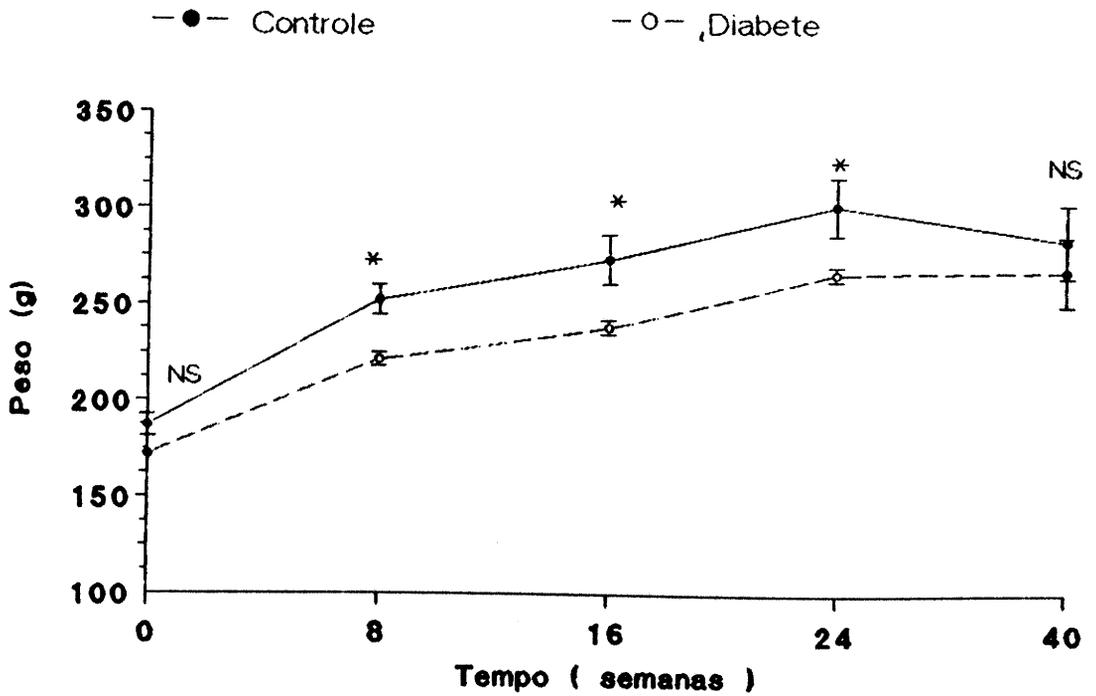


Figura 1. Peso (g) dos animais diabéticos e controles. Tempo= período em semanas após a injeção de estreptozotocina (diabéticos) ou solução de citrato de sódio (controles). NS= não significante; * $p < 0.05$.

Função renal

Os dados de função renal mostrados nas tabelas 2, 3 e nas figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 demonstram alterações de função renal típicas do diabetes mérito que serão descritas a seguir:

Fluxo urinário

A figura 2 apresenta o fluxo urinário de ratos diabéticos e controles antes e após a injeção de estreptozotocina (diabéticos) ou citrato de sódio (controles). O maior fluxo urinário observado nos diabéticos caracteriza a diurese osmótica devido a maior concentração de glicose no filtrado glomerular.

Taxa de Filtração Glomerular

A média dos valores da taxa de filtração glomerular nos ratos diabéticos aumentou significativamente em relação aos controles em na primeira e na oitava semana ($p < 0,01$) e na quadragésima semana ($p < 0,05$). O aumento observado foi de aproximadamente 30% acima dos valores basais (tabela 2 e figura 3). Este aumento é característico do diabetes mérito.

Tabela 2. Taxa de Filtração Glomerular (ml/min/100g) dos ratos controles e diabéticos. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão, n= número de animais, tempo = período após a administração de estreptozotocina (diabéticos) ou de citrato de sódio (controles) expresso em semanas.

Tempo	Diabete	Controle	p
1	1,07 \pm 0,07 n=6	0,76 \pm 0,03 n=6	p < 0,01
8	1,03 \pm 0,05 n=11	0,84 \pm 0,03 n=6	p < 0,05
40	1,05 \pm 0,05 n=5	0,81 \pm 0,07 n=6	p < 0,05

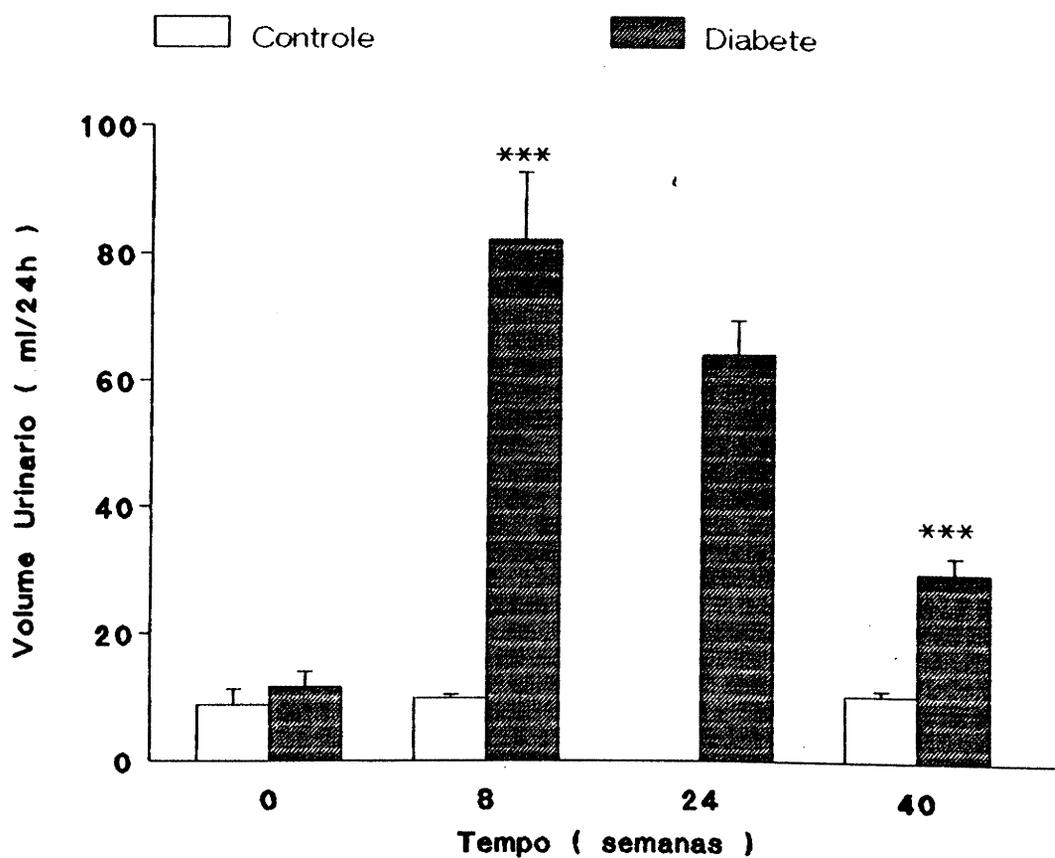


Figura 2. Fluxo urinário (ml/24h) de ratos diabéticos antes (0), e após 8, 24 e 40 semanas da injeção de estreptozotocina e controles antes (0) e após 8 e 40 semanas da injeção de citrato de sódio. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. *** $p < 0.001$.

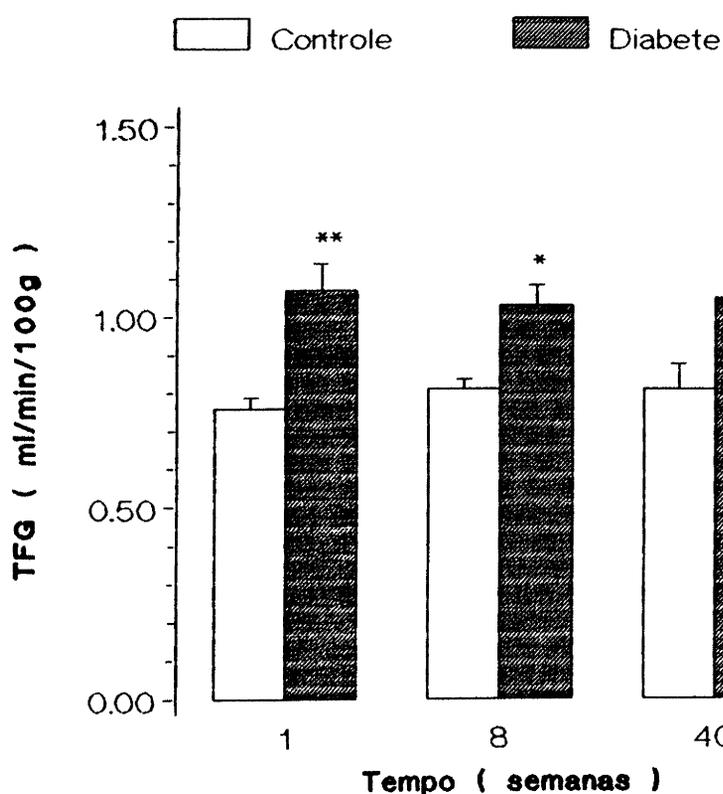


Figura 3. Taxa de filtração glomerular em ratos diabéticos (D) (barras hachurizadas) e controles (C)(barras vazias) com 1 semana (Dn=6;Cn=6), 8 semanas (Dn=11;Cn=6) e 40 semanas (Dn=5 e Cn=6) em ml/minuto/100g de rato. Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão. Tempo=período após a administração de estreptozotocina (diabéticos) ou citrato de sódio (controles).* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$.

Carga excretada de albumina

A Carga excretada de albumina mostrou um aumento significativo e persistente em relação aos controles após 16 semanas da indução do diabetes. (figura 4 e tabela 3). Ao atingir 40 semanas os ratos diabéticos apresentaram uma média geométrica 14 vezes maior do que seus respectivos controles ($p < 0,001$), caracterizando a presença de nefropatia diabética.

Tabela 3 Excreção urinária de albumina ($\mu\text{g}/24\text{h}$) em ratos controles e diabéticos. Os resultados estão expressos como média geométrica \pm erro padrão. Tempo (semanas) = período após a injeção de estreptozotocina (animais diabéticos) ou citrato de sódio (controles). n= número de animais.

Tempo	Diabete		Controle		p
1	155 \pm 21	n=12	123 \pm 17	n=10	NS
8	465 \pm 78	n=12	178 \pm 29	n=8	$p < 0.01$
12	239 \pm 20	n=5	191 \pm 31	n=8	NS
16	721 \pm 175	n=8	243 \pm 97	n=5	$p < 0.01$
24	1000 \pm 242	n=5	212 \pm 56	n=4	$p < 0.01$
32	2252 \pm 780	n=6	219 \pm 43	n=5	$p < 0.001$
40	5223 \pm 1789	n=6	366 \pm 92	n=6	$p < 0.001$

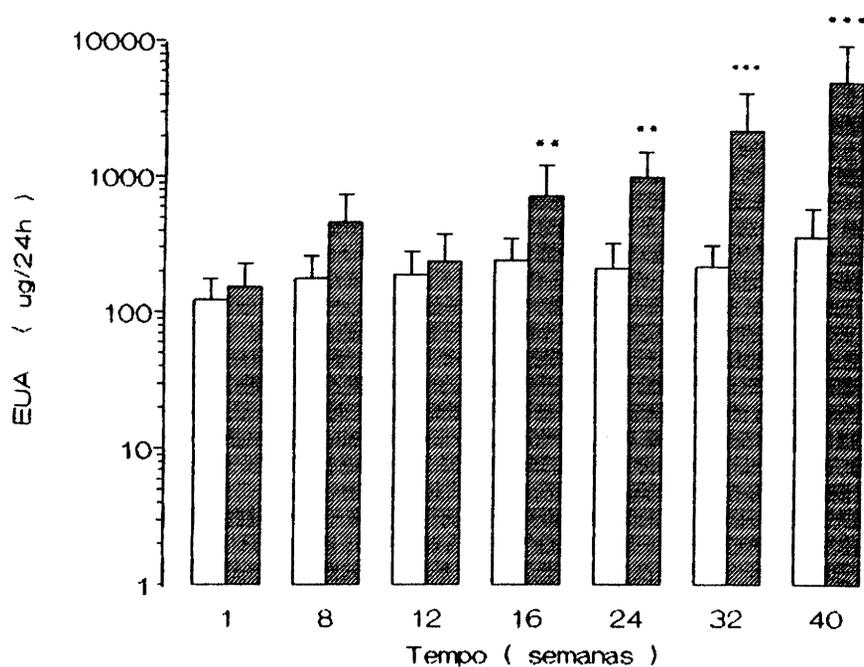


Figura 4. Carga excretada de albumina de ratos diabéticos (n=8) (barras hachurizadas) e controles (n=8) (barras vazias) entre 1 e 40 semanas da injeção de estreptozotocina. Estão representadas as médias geométricas e os erros-padrão em $\mu\text{g}/24\text{h}$. Tempo= período após a injeção de estreptozotocina (diabéticos) ou tampão citrato (controles). Os dados foram transformados em logaritmo decimal para análise estatística. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Excreção fracional de Sódio e Potássio, Clearance Osmolar e Transporte de Água no Ducto Coletor

Não foi encontrada diferença significativa na excreção fracional de sódio (Figura 5) e potássio (Figura 6) entre ratos diabéticos com 8, 16, 24 ou 40 semanas de hiperglicemia comparativamente a controles basais e de 40 semanas. O *clearance* osmolar (Figura 7) e o transporte de água no coletor (T_{cH_2O}) (Figura 8) foram significativamente maiores nos ratos diabéticos com 8, 24 e 40 semanas, ($p < 0.05$), comparativamente aos controles basais. Estas observações também estão de acordo com o esperado em animais diabéticos. Uma maior carga de soluto (glicose) está sendo filtrada, saturando portanto a sua capacidade de reabsorção ao nível dos túbulos proximais. A presença de solutos não absorvíveis no túbulo proximal vai interferir com o transporte de sódio e água, promovendo um aumento da diurese e do *clearance* osmolar (maior quantidade de solutos na urina). O transporte de água no coletor também aumenta devido ao maior aporte de fluidos para o túbulo coletor.

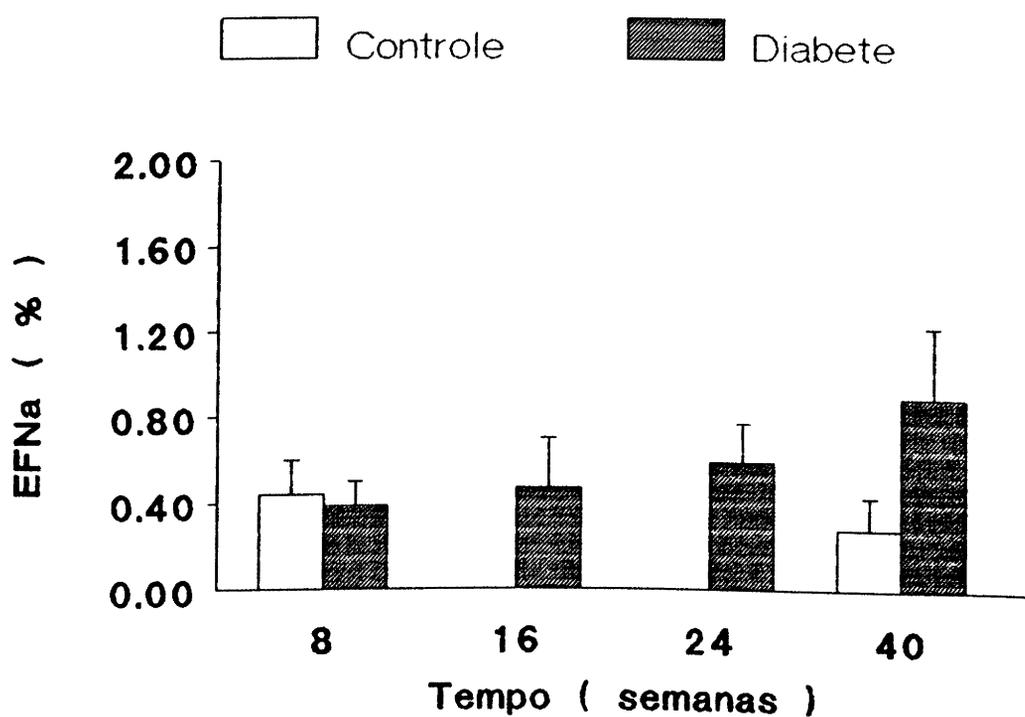


Figura 5. Excreção fracionada de Sódio (EF_{Na}) em ratos diabéticos com 8, 16, 24 e 40 semanas de diabete e controles basais e 40 semanas. Estão representadas as médias \pm erro padrão, em (%). Tempo = período após a administração da estreptozotocina.

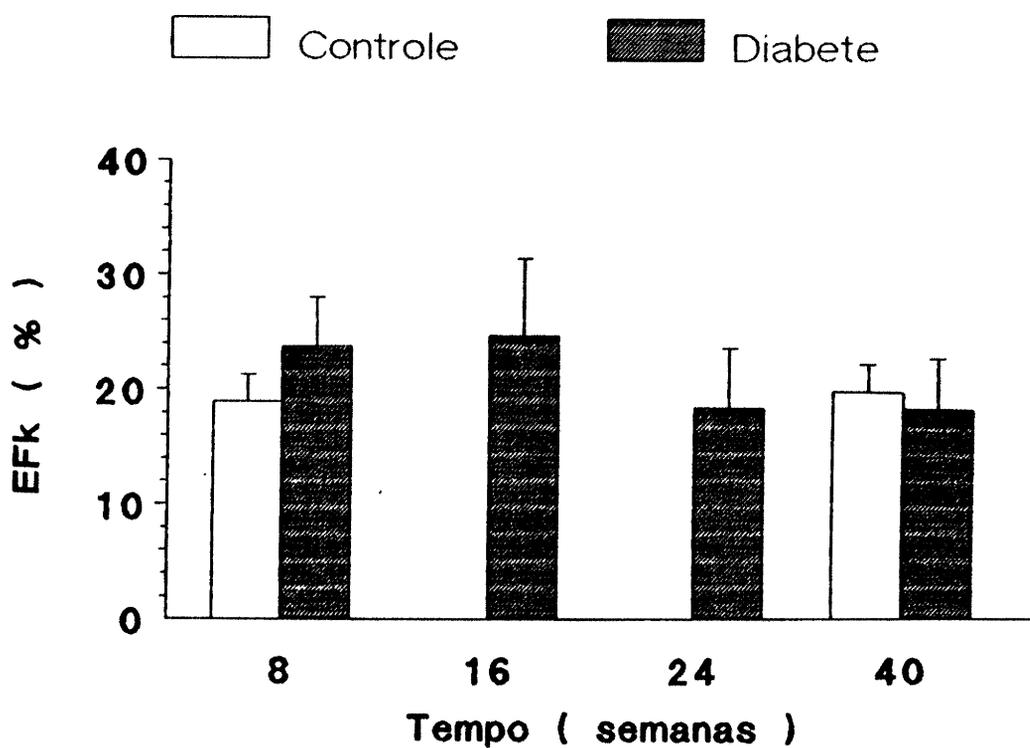


Figura 6. Excreção Fracionada de potássio (EF_K) em ratos diabéticos com 8, 16, 24 e 40 semanas de diabete e controles basais e de 40 semanas. Estão representadas as médias e erros padrão, em %. Tempo= período após a administração da estreptozotocina.

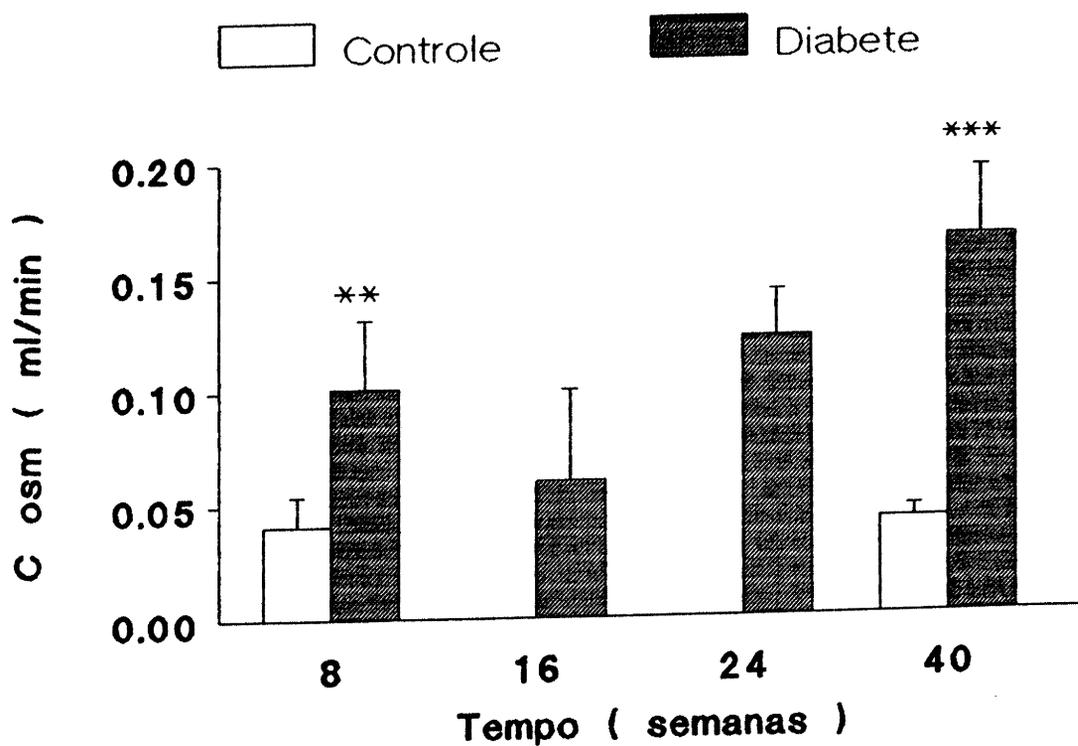


Figura 7. Clearance osmolar (C_{Osm}) em ratos diabéticos com 8, 16, 24 e 40 semanas e controles basais e de 40 semanas. Estão representadas as médias e os erros-padrão em ml/min. Tempo = período após a injeção de estreptozotocina. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

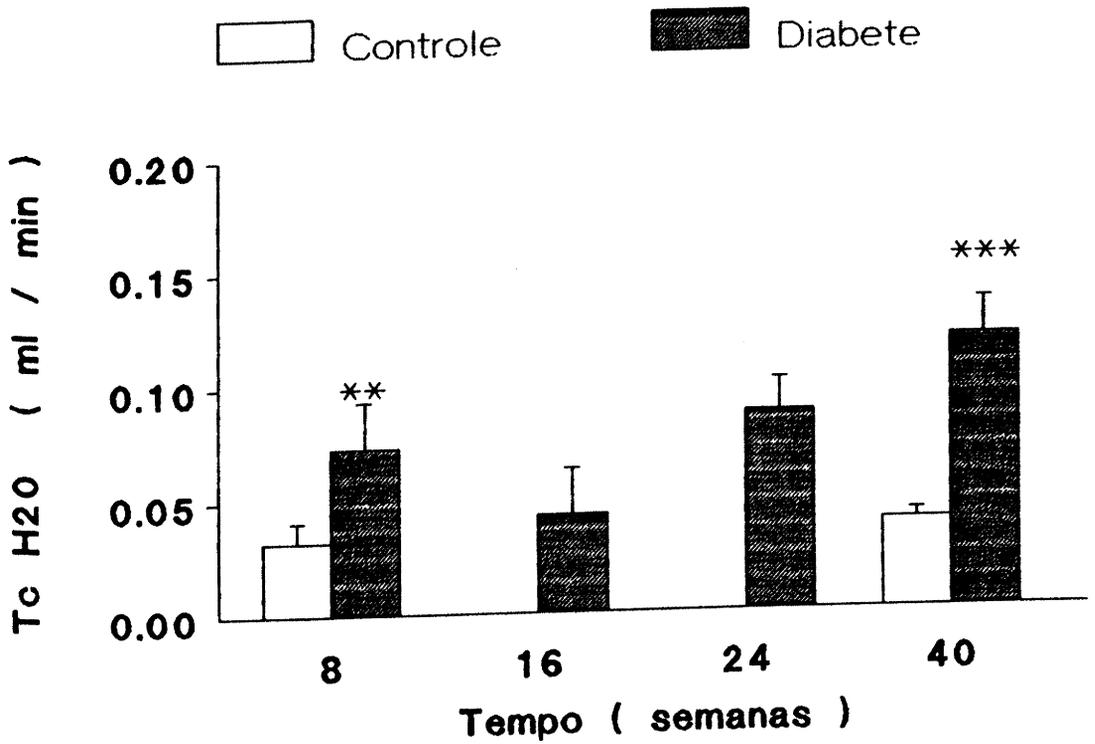


Figura 8. Transporte de água no ducto coletor ($T^c_{H_2O}$) em (ml/min) em ratos diabéticos com 8, 16, 24 e 40 semanas e controles basais e de 40 semanas. Estão representadas as médias e os erros-padrão. Tempo= período após a injeção da estreptozotocina ou de citrato de sódio. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Histomorfometria

As médias \pm EP dos volumes glomerulares para diabéticos e controles com 1, 8 e 24 semanas, em $\text{mm}^3 \times 10^{-5}$ estão representadas na figura 9 e tabela 4. Observa-se um aumento progressivo em ambos os grupos porém significativamente maior no grupo diabético após 8 semanas do início da hiperglicemia ($p < 0.001$) sugerindo a presença de hipertrofia glomerular.

Tabela 4 Volume glomerular ($\text{mm}^3 \times 10^{-5}$) dos ratos diabéticos e controles. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número de animais, tempo = período após a administração da estreptozotocina (diabéticos) ou citrato de sódio (controles).

Tempo	Diabete	Controle	p
1	30 \pm 3 n=3	25 \pm 2 n=3	NS
8	41 \pm 1 n=4	33 \pm 2 n=3	$p < 0.001$
24	50 \pm 5 n=3	38 \pm 1 n=3	$p < 0.05$

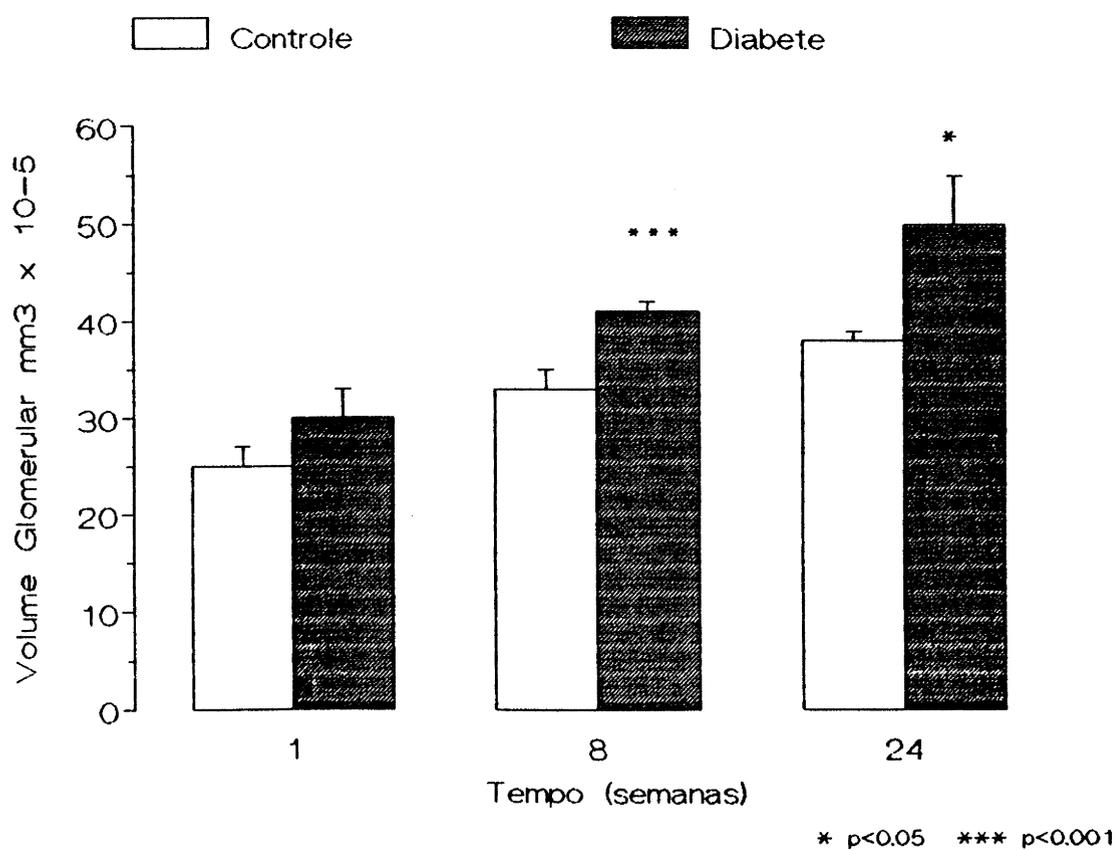


Figura 9. Volume elipsóide glomerular em mm³ x 10⁻⁵ de ratos diabéticos e controles com 1, 8 e 24 semanas. Estão representados as médias ± erro padrão das médias obtidas de 50 glomérulos por rato. Tempo = período após a administração da estreptozotocina (diabéticos) ou citrato de sódio (controles). *p<0,05 , ***p<0,001.

Análise histológica com coloração para colágeno

A análise histológica com coloração para colágeno total mostrou a presença de espessamento mesangial com marcada deposição de colágeno em ratos diabéticos com 24 e 40 semanas de hiperglicemia indicando a presença de glomerulosclerose diabética do tipo difusa (figura 10 inferior B e D). Não observamos aumento da deposição de colágeno no grupo controle do mesmo tempo (figura 10 inferior A e C) nem no grupo diabético com menos de 16 semanas.

Imunohistoquímica:

A imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-TGF β_1 de camundongo mostrou presença de reação marcada ao nível de mesângio e endotélio capilar glomerular que só foi visualizada nos ratos diabéticos com albuminúria significativa, após 24 semanas da indução da hiperglicemia, estando também presente nos ratos diabéticos com 40 semanas de doença. (figura 10 superior B e D e figura 11). A reação é específica para os glomérulos, e apenas uma leve reação é observada a nível tubular nos mesmos cortes. Não encontramos reação nos ratos controles da mesma idade (figura 10 superior A e C) nem nos controles com IgG de camundongo.

Observamos a presença de uma correlação significativa ($r=0.905$, $p<0.001$) (figura 12) entre o escore de intensidade da reação imunohistoquímica para TGF- β_1 e a carga excretada de albumina bem

como uma associação temporal com o surgimento de colágeno no grupo diabético.

A imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-colágeno tipo I mostrou presença de deposição difusa e intensa deste sub-tipo do colágeno na região mesangial e nos capilares glomerulares de ratos com 24 e 40 semanas de diabetes mérito (figura 13 B e 13 C). Pouca reação se observa nos controles de 24 semanas (Figura 13 A) e nenhuma nos controles com IgG de coelho.

Figura 10 Superior. Imunolocalização de TGF- β_1 no córtex renal de um rato diabético com 24 semanas (B) e de quarenta semanas da injeção de estreptozotocina (D) e seus respectivos controles (A) e (C), usando anticorpo monoclonal anti-TGF- β_1 de camundongo. Observe a intensa reação presente no mesângio e parede capilar glomerular dos ratos diabéticos. 280x.

Figura 10 inferior. Cortes obtidos dos mesmos ratos acima, corados com Tricrômio de Masson. B. Rato diabético com 24 semanas após a injeção de estreptozotocina e D. Rato diabético com 40 semanas após a injeção de estreptozotocina e seus respectivos controles (A) e (C). Observe o aumento da coloração azul nas áreas mesangiais e na membrana basal indicando aumento da deposição de colágeno total. 280x.

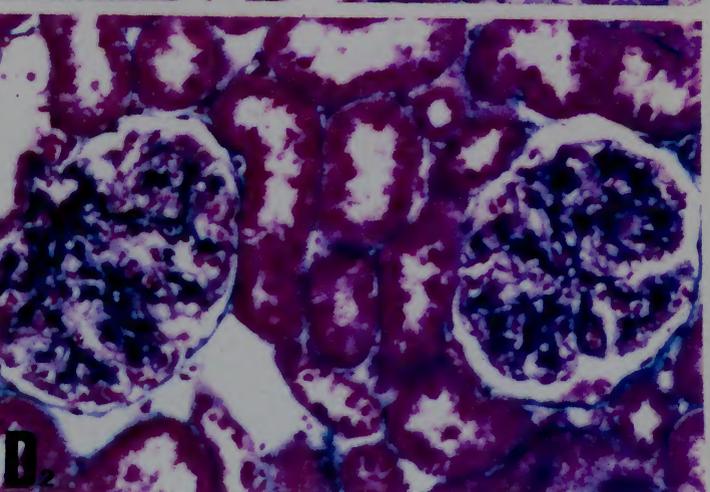
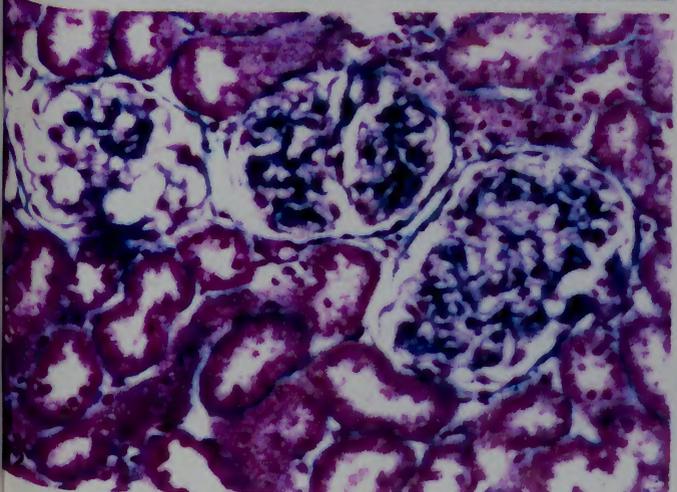
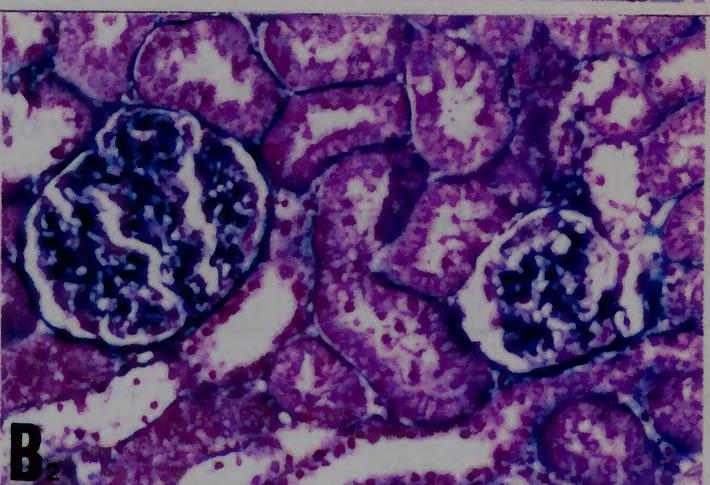
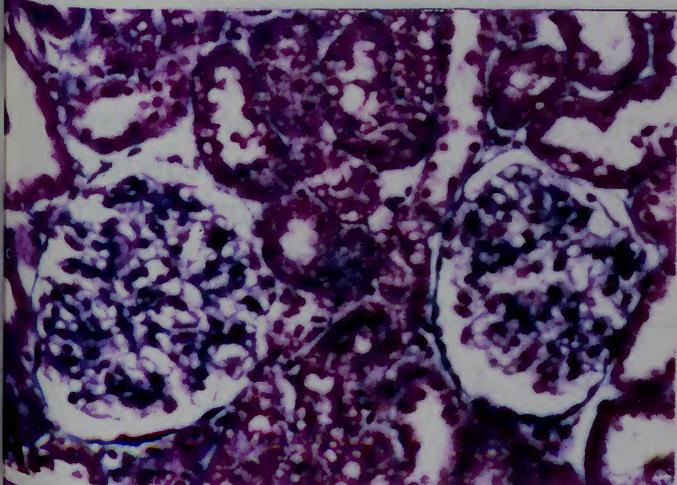
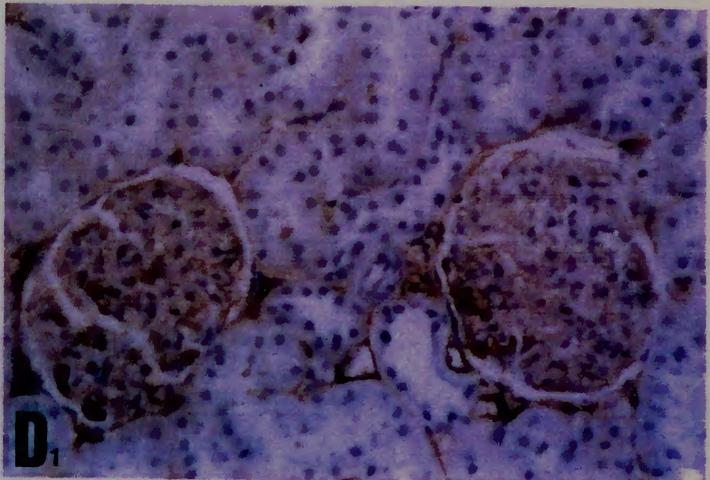
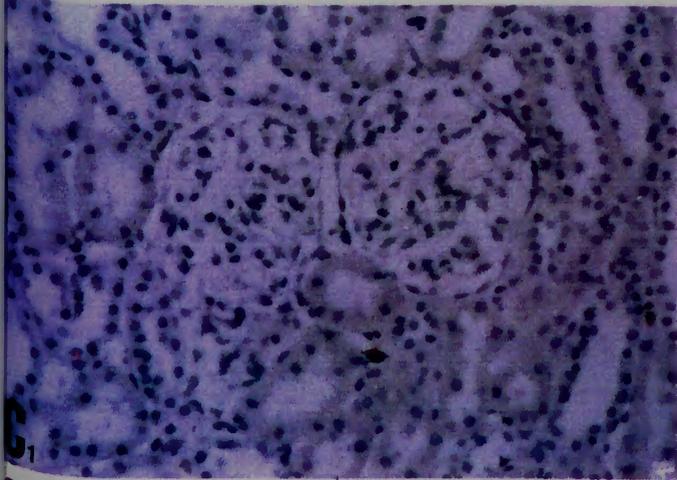
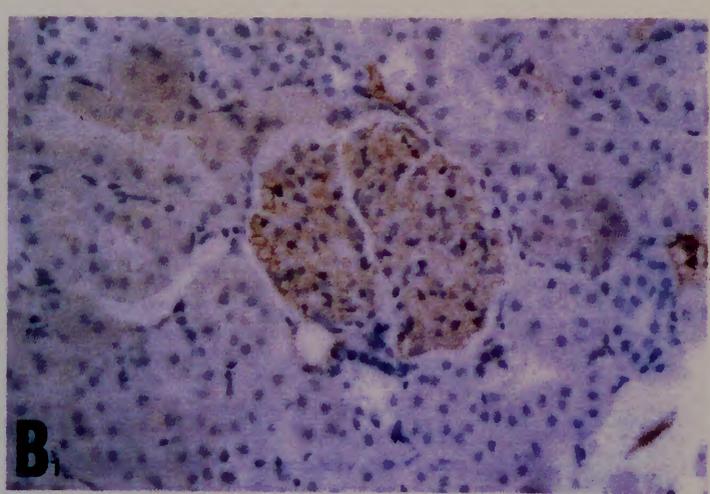
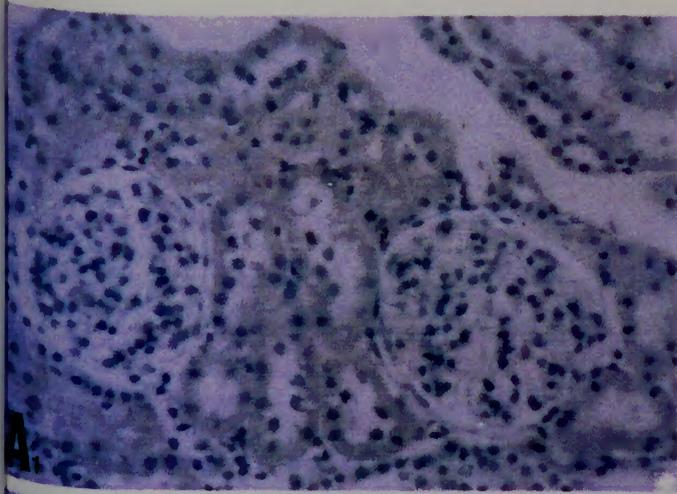
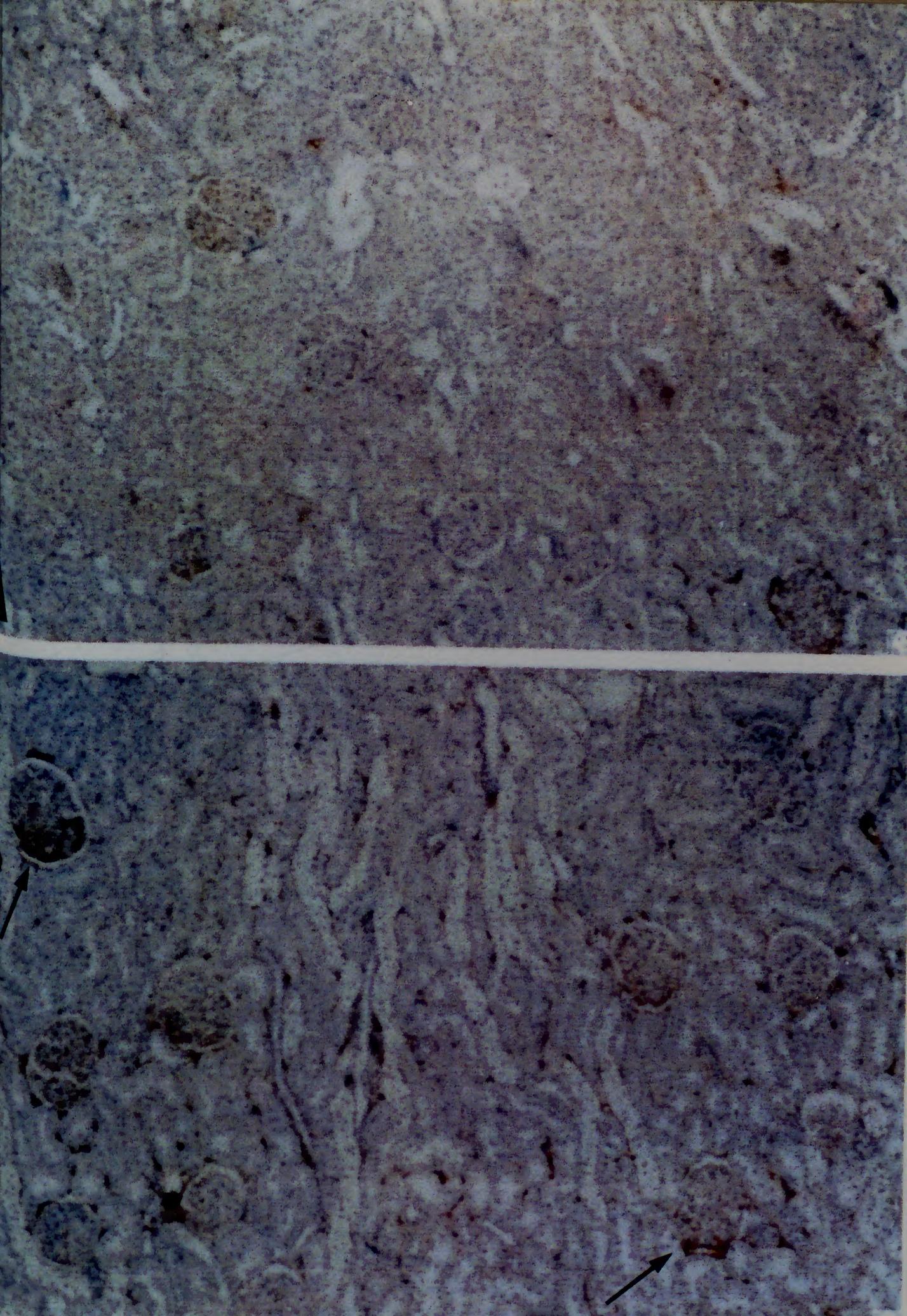


Figura 11: Imunolocalização de TGF- β_1 com anticorpo monoclonal de anti-TGF- β_1 de camundongo em córtex renal de um rato diabético com 24 semanas (A) e quarenta semanas do início da hiperglicemia (B). Observe a reação mais intensa presente no glomérulo dos ratos diabéticos de 40 semanas (setas). 150x.



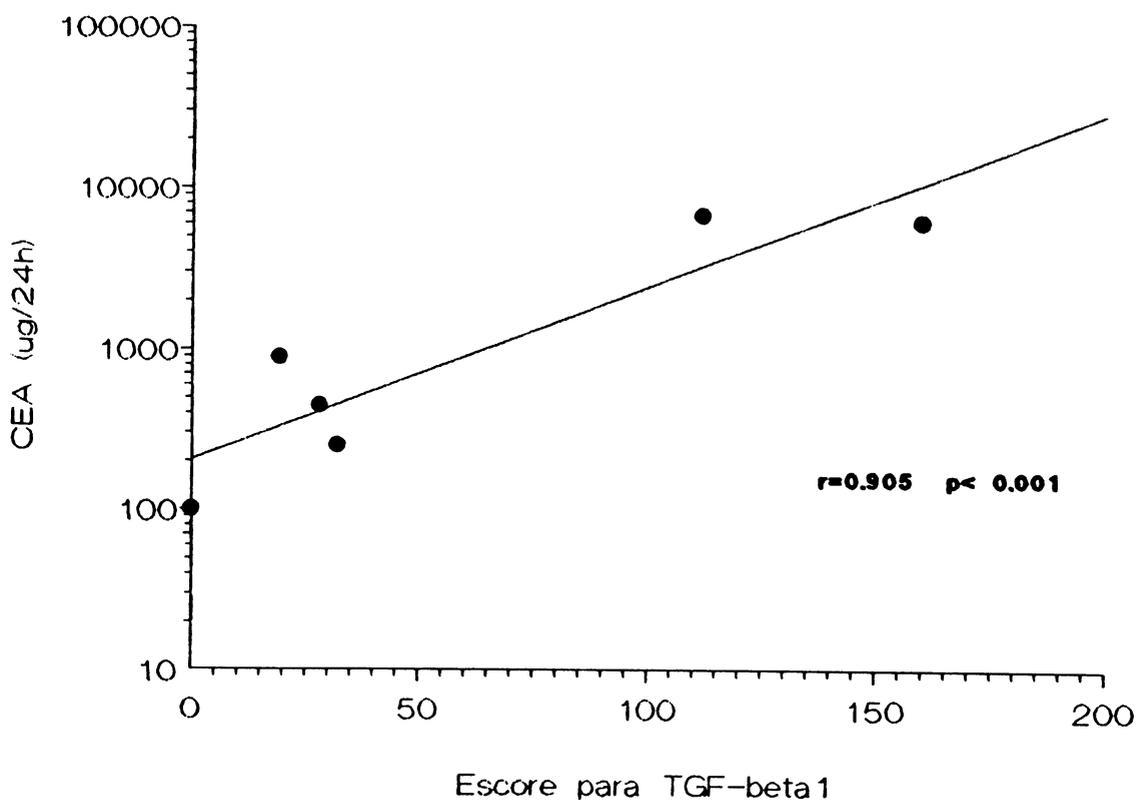
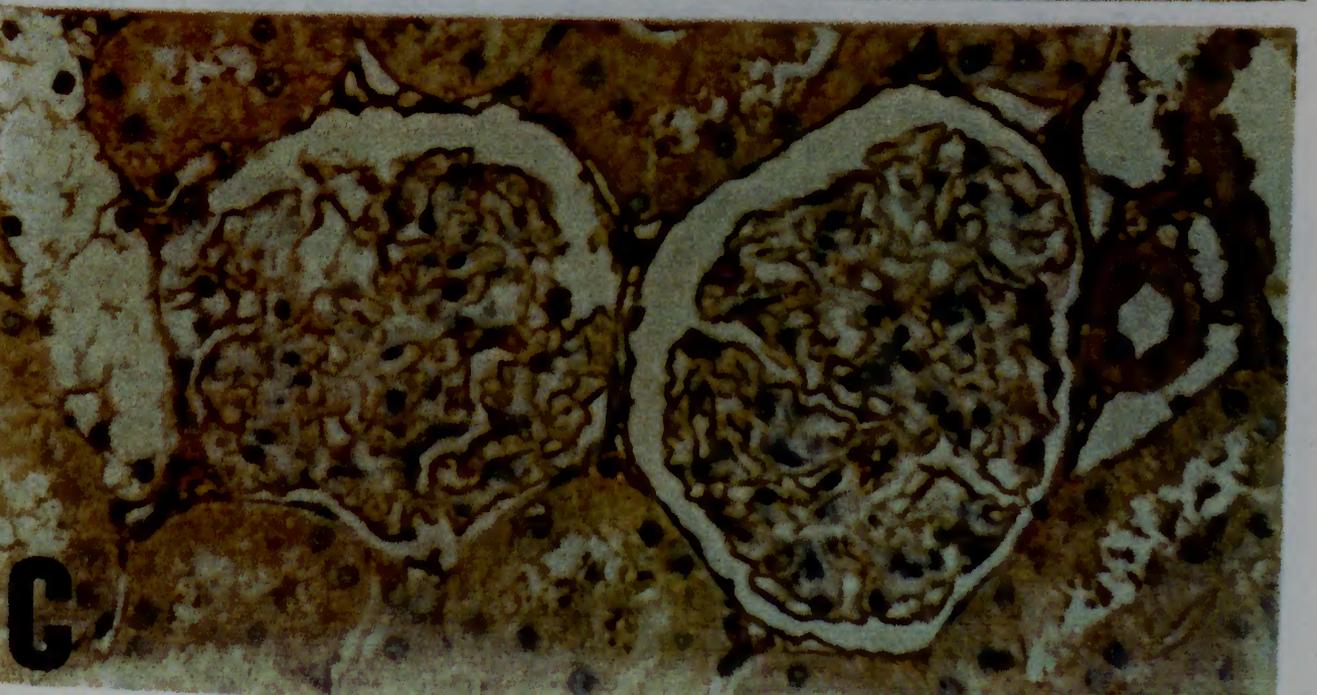
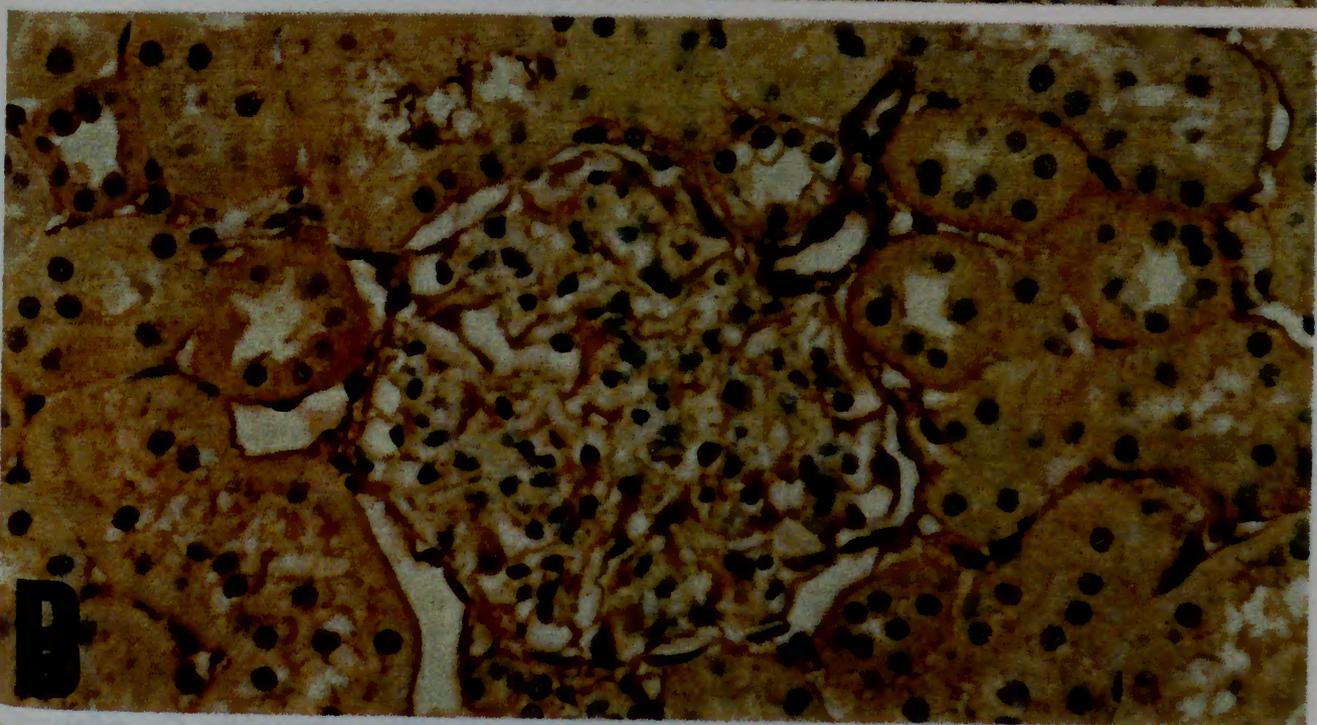
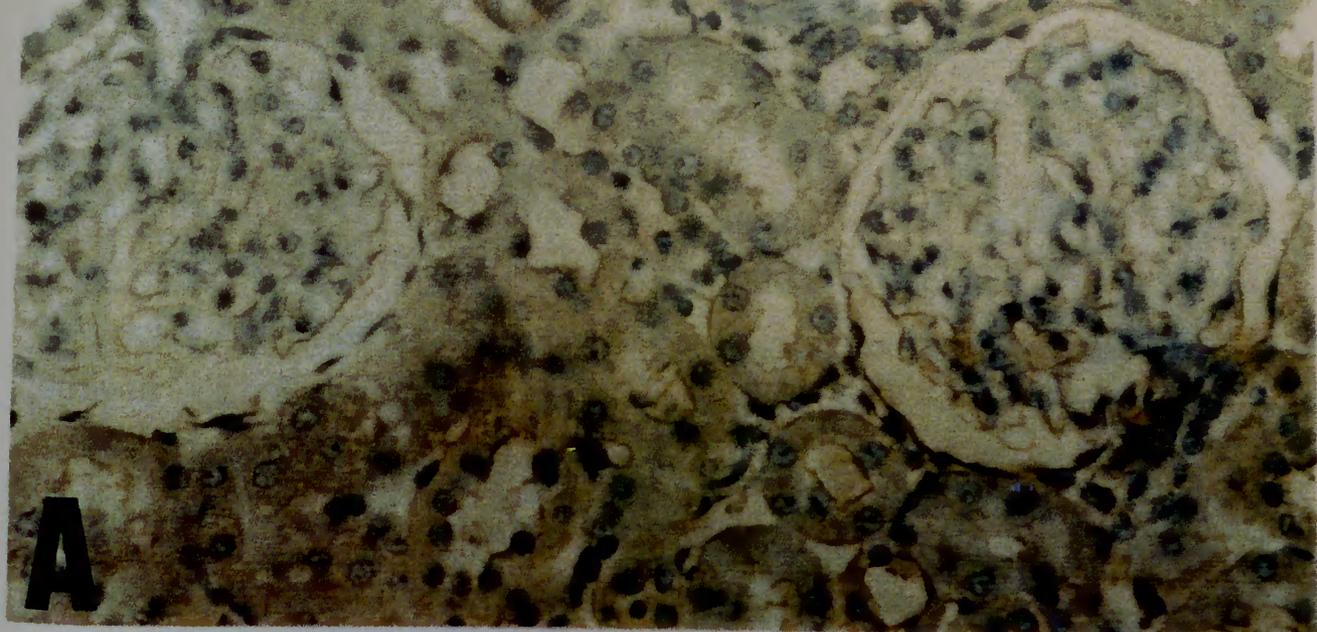


Figura 12. Correlação entre os escores da reação obtida com a imunohistoquímica renal coim o anticorpo monoclonal anti- TGF- β_1 e os a excreção urinária de albumina correspondente em ratos diabéticos. O cálculo do escore obtido na imunohistoquímica para TGF- β_1 está descrito no texto. A carga excretada de albumina está representada em $\mu\text{g}/24\text{h}$. $r=0,905$, $p<0.001$.

Figura 13. Imunolocalização de colágeno tipo I em cortes renais de ratos com diabetes mérito de 24 semanas (B) e 40 semanas (C) e um rato controle de 24 semanas (A). Observe a deposição difusa de colágeno na região mesangial nos ratos diabéticos. 420x.

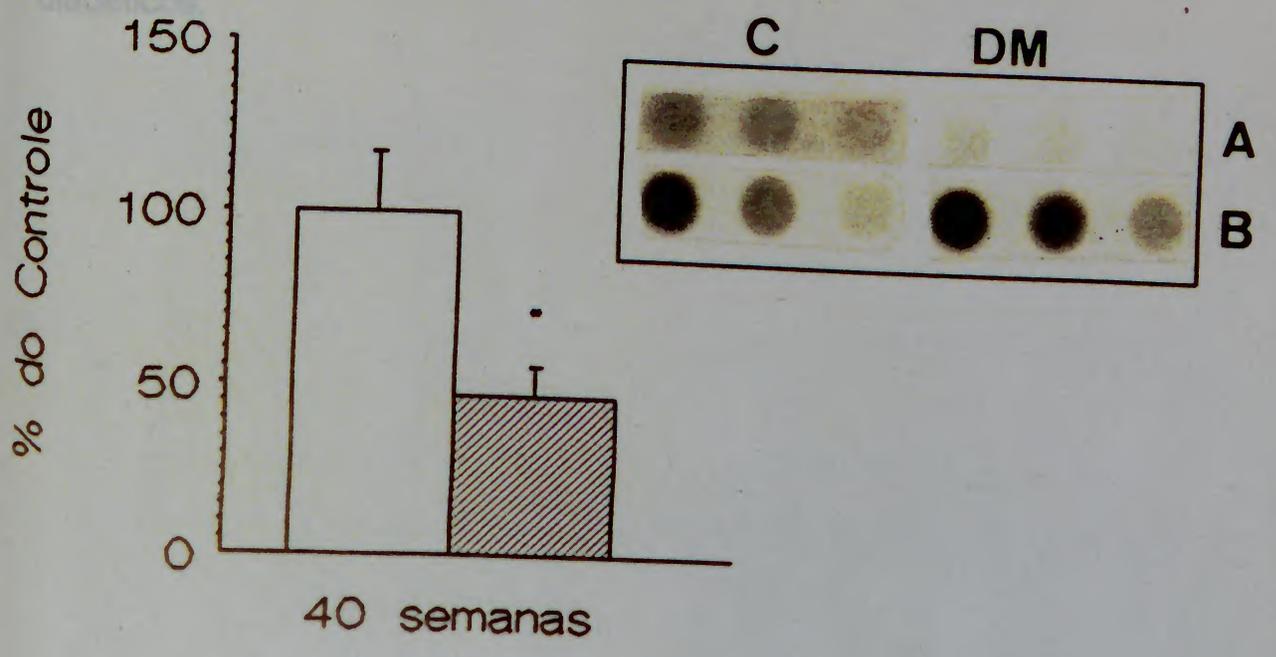
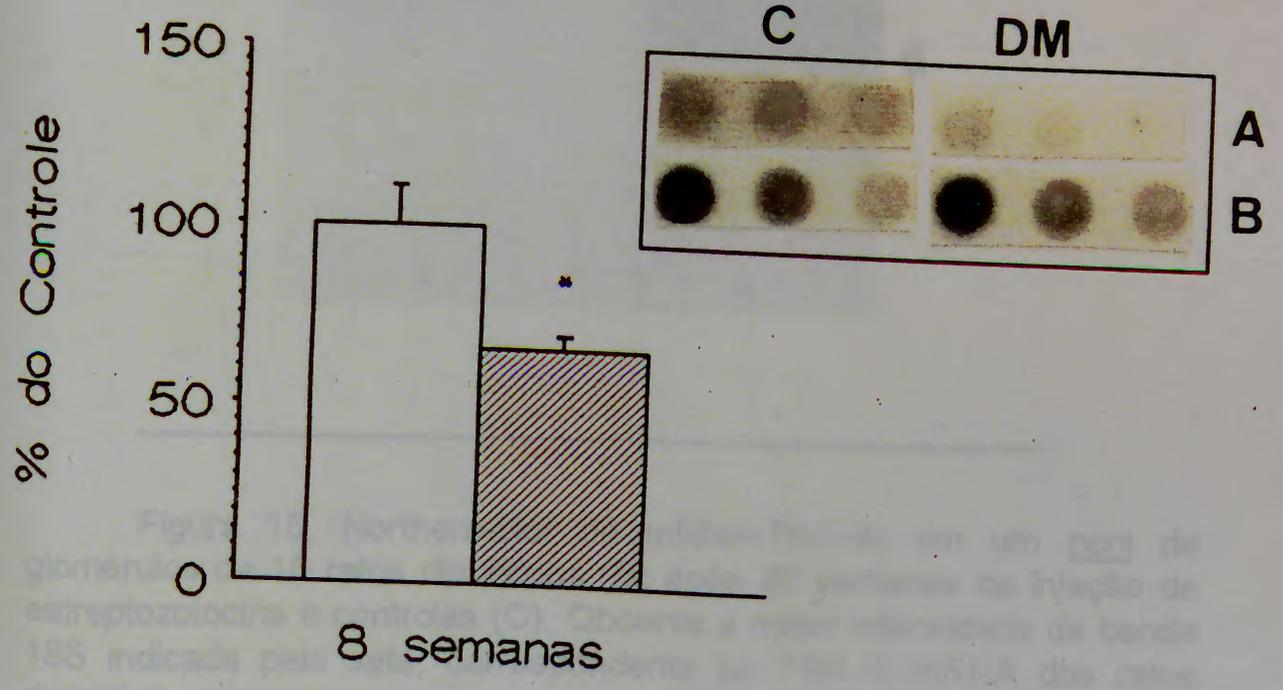
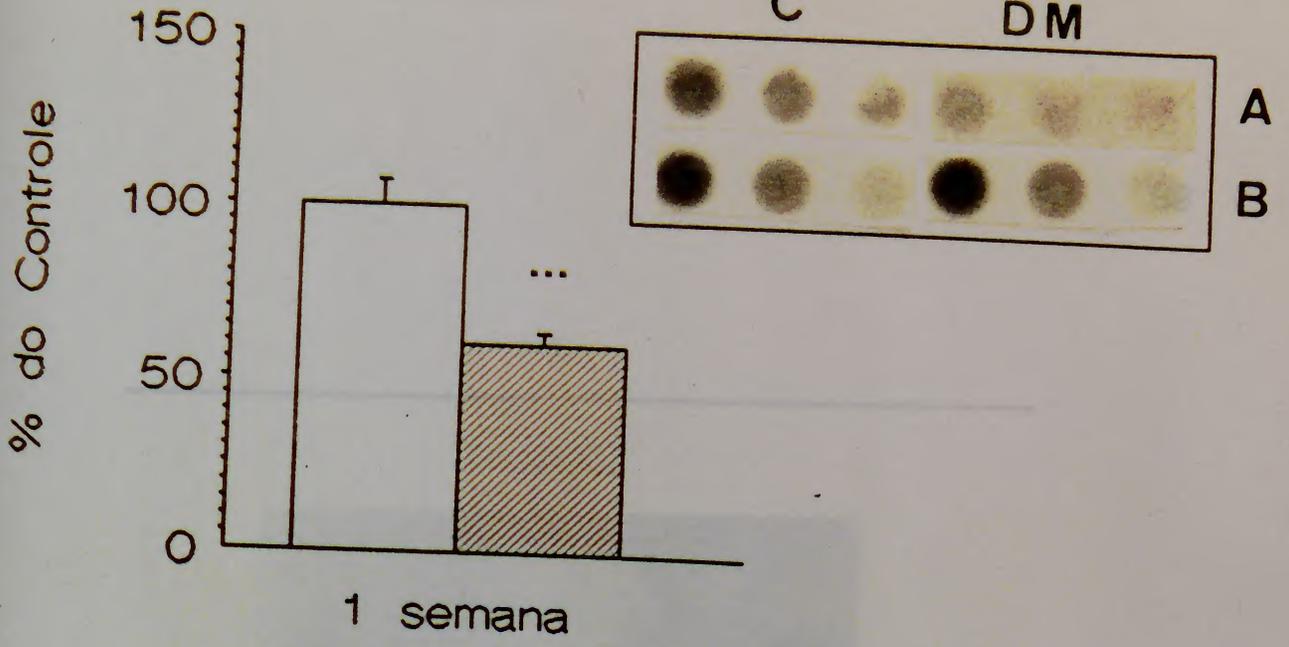


Análise do mRNA cortical e glomerular para TGF- β_1

Os níveis de mRNA para TGF- β_1 no córtex renal quantificados através de dot-blot foram 30% menores nos ratos diabéticos comparativamente a seus respectivos controles com 1 semana ($p<0.01$), 8 semanas ($p<0.05$) e 40 semanas ($p<0.01$) da indução do diabetes e estão representados na figura 14.

Para estudar a expressão renal de TGF- β_1 em glomérulo estudou-se o mRNA para TGF- β_1 em um *pool* de glomérulos de ratos diabéticos 20 semanas da indução e de controles da mesma idade. Observamos um aumento definido do mRNA-TGF- β_1 nos glomérulos dos ratos com 20 semanas do início da hiperglicemia (Figura 15).

Figura 14. Quantificação do mRNA-TGF- β_1 no córtex renal de ratos diabéticos (barras hachuradas) e controles (barras vazias) com 1 semana (Dn=6 Cn=6), 8 semanas (Dn=8 e Cn=8) e 40 semanas (Dn=5 e Cn=4) após a injeção de estreptozotocina por hibridização com cDNA de TGF- β_1 humano em *dot-blot*. Os dados são expressos como porcentagem dos controles e estão representadas as médias e erros-padrão. O valor do controle é designado 100%. * $p<0,05$ ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Autorradiograma de valores individuais são mostrados ao lado dos gráficos, onde a primeira linha representa dots de um rato individual (C=controle e DM=diabético) em 3 diluições diferentes, respectivamente 10, 5 e 2,5 μg de RNA total. A linha abaixo corresponde aos mesmos dots, no mesmo ensaio, hibridizados com cDNA para a 28S de rato.



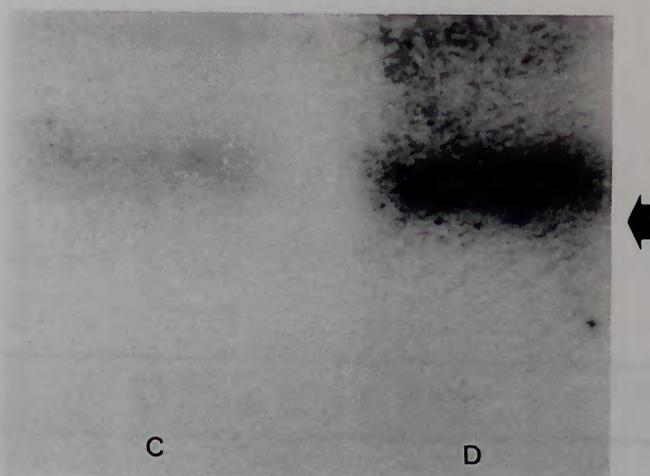


Figura 15. Northern-blot de mRNA-TGF- β_1 em um pool de glomérulos de 16 ratos diabéticos (D) após 20 semanas da injeção de estreptozotocina e controles (C). Observe a maior intensidade da banda 18S indicada pela seta, correspondente ao TGF- β_1 /mRNA dos ratos diabéticos.

Discussão

Discussão

Os primeiros estudos *in vivo* mostrando que o TGF- β_1 poderia estar relacionado com doença glomerular em modelos experimentais foram realizados por Okuda et al 1990 e Coimbra et al [1991].

No estudo de Okuda et al [1990] foi utilizado um modelo de glomerulonefrite mesangial em camundongos, a qual foi induzida pela administração de anticorpo anti-célula do timo. Nestas condições estes autores observaram um aumento do RNA mensageiro para o TGF- β_1 e da atividade deste polipeptídeo nos glomérulos. Posteriormente, Border et al [1992] também constataram, no mesmo modelo experimental, que a administração de um anticorpo capaz de neutralizar a atividade para o TGF- β_1 reduzia o aumento da produção de matriz extra-celular nesses animais.

No estudo de Coimbra et al [1991], em um modelo de glomerulonefrite produzida pela administração de anticorpo anti-membrana basal em coelhos, foi observado que os níveis de RNA mensageiro e a atividade para o TGF- β_1 estavam aumentados no córtex total e nos glomérulos renais desses animais durante a evolução da doença. Os autores verificaram também que o meio condicionado obtido de córtex renal desses animais estimulava a produção de colágeno pelas células mesangiais em cultura, e que esse efeito estimulante era inibido pela administração de um anticorpo específico para o TGF- β_1 .

A motivação para a realização do presente estudo surgiu com estes trabalhos. Na ocasião, não se encontravam na literatura estudos que tivessem avaliado a possibilidade de envolvimento do TGF- β_1 na gênese e na evolução da nefropatia diabética.

Posteriormente surgiram evidências sobre a participação do TGF- β_1 na patogênese de diferentes tipos de nefropatias experimentais. O TGF- β_1 participa na gênese e evolução das doenças renais induzidas por Puromicina [Jones et al, 1991]; obstrução ureteral [Keneto et al, 1993]; Adriamicina [Tamaki et al, 1994] e pela Angiotensina [Kagami et al, 1994]. Também foi verificada a existência de determinadas proteoglicanas, como a Decorina e a Biglicana, as quais são capazes de inibir a atividade do TGF- β_1 [Yamaguchi et al, 1990].

No momento, as principais evidências experimentais que mostram que o TGF- β_1 possa ter um papel importante na patogênese e na evolução de lesões glomerulares em doenças renais são as seguintes: 1) existem observações realizadas *in vivo* que demonstram uma associação temporal entre o aumento da produção e da atividade do TGF- β_1 com o aumento da matriz extra-celular que pode ser reproduzido *in vitro*, pela incubação de glomérulos ou de células mesangiais com preparações contendo TGF- β_1 [Okuda et al, 1990; Coimbra et al, 1991; Kagami et al, 1993]; 2) a administração do anticorpo anti-TGF- β_1 ou de Decorina - um inibidor específico do TGF- β_1 - pode reduzir a produção de colágeno pelas células glomerulares na glomerulonefrite experimental [Border et al, 1990 e 1992]; 3) A introdução pela artéria renal de um DNA de plasmídeo contendo o cDNA para o TGF- β_1 provoca um aumento da produção de diversos tipos de

colágeno (tipo I, III, e IV) pelas células glomerulares levando à esclerose glomerular [Isaka et al, 1993].

A participação do TGF- β_1 na nefropatia diabética em humanos vem sendo proposta recentemente. Yamamoto et al [1993] analisaram, através de imunofluorescência, biópsias de pacientes com nefropatia diabética avançada, utilizando anticorpo anti-TGF- β_1 , e compararam com observações em controles normais e em portadores de glomerulonefrite de lesões mínimas. Os autores encontraram forte reação imunohistoquímica para o polipeptídeo TGF- β_1 nos glomérulos de pacientes com nefropatia diabética, enquanto que nos controles e nos pacientes com nefropatia de lesões mínimas a reação foi de pequena intensidade. O delineamento deste estudo foi transversal e, portanto, não permite, isoladamente, conclusões sobre uma possível relação causa-efeito entre a presença de reação imunohistoquímica ao polipeptídeo TGF- β_1 e o surgimento da glomerulosclerose.

No presente estudo observou-se a presença de um aumento da quantidade do polipeptídeo TGF- β_1 nos glomérulos de ratos com diabetes mérito com 24 e 40 semanas de hiperglicemia. A análise imunohistoquímica com anticorpo para TGF- β_1 evidenciou uma reação que localizou-se predominantemente na região mesangial e na parede dos capilares glomerulares, sendo que esta reação foi mínima nos túbulos renais. Evidenciou-se também a existência de um aumento marcado dos níveis de RNA mensageiro para TGF- β_1 no glomérulo isolado de ratos diabéticos, tratados com insulina, já com 20 semanas de hiperglicemia. Este aumento, portanto, precedeu a deposição do polipeptídeo TGF- β_1 no glomérulo. Por outro lado, no córtex renal, os

níveis de mRNA-TGF- β_1 apresentaram-se, durante todo o período de observação, significativamente reduzidos em relação aos seus controles, confirmando que o aumento da produção de TGF- β_1 parece ter ocorrido predominantemente nos glomérulos. Foi observado, ainda, uma importante correlação entre a intensidade da reação imunohistoquímica para o polipeptídeo TGF- β_1 com a carga excretada de albumina correspondente, bem como uma associação temporal com o aumento do conteúdo de colágeno total e colágeno tipo I. Nenhuma reação foi verificada nos glomérulos dos animais controles e dos ratos com diabetes de menor duração.

Os resultados descritos no presente trabalho estão de acordo com estudos que têm mostrado que o conteúdo glomerular de RNA mensageiro para TGF- β_1 encontra-se aumentado em modelos animais com diabetes de início recente [Nakamura et al, 1993; Yamamoto et al, 1993]. No estudo de Yamamoto et al [1993], em ratos com 6 e 15 semanas de diabetes e tratados com insulina, foi observado um tênue aumento, a nível glomerular, de RNA mensageiro para TGF- β_1 , de 1,5 e 1,8 vezes em relação aos controles não-diabéticos, respectivamente. Este aumento foi maior (2,5 vezes o basal) no grupo de animais diabéticos não tratados com insulina. Resultados semelhantes foram obtidos por Nakamura et al (1993) que constataram aumentos de 2,6; 3,6; e 5,6 vezes em ratos com 4, 12 e 24 semanas, respectivamente, com DM não tratado. Em conjunto, esses estudos indicam que a hiperglicemia sustentada, associada à deficiência de insulina, pode induzir uma maior expressão do RNA mensageiro para TGF- β_1 e

consequentemente aumento da produção de TGF- β_1 no glomérulo de ratos diabéticos.

No presente estudo encontramos nos glomérulos dos ratos diabéticos com 20 semanas um sinal de TGF- β_1 , definidamente maior que os dos controles com a mesma idade, o que confirma as observações de Nakamura et al e Yamamoto et al (1993), mas em um período mais avançado, onde já existe glomerulosclerose diabética. Os dados foram consistentes em definir a existência de aumento da produção do TGF- β_1 no glomérulo de ratos com glomerulosclerose diabética.

Reunidos os resultados de Nakamura et al e Yamamoto et al, e os obtidos neste estudo, as evidências são de que há um aumento moderado da produção de TGF- β_1 , que parece estar relacionado com a intensidade da hiperglicemia, com a deficiência de insulina e com a duração do diabete, indicando que o meio metabólico diabético possa estar interferindo significativamente na transcrição gênica do mRNA-TGF- β_1 .

A relação entre o aumento persistente do conteúdo glomerular de TGF- β_1 e a evolução da nefropatia diabética não havia sido demonstrada em estudos anteriores, pois estes utilizaram ratos diabéticos em uma fase na qual a nefropatia não estava definida. Procurou-se, portanto, manter os animais durante um período suficientemente longo (40 semanas) para o desenvolvimento das alterações de estrutura e de função renal típicas da nefropatia diabética. Observou-se então, que aumentos persistentes e progressivos da albuminúria ocorrem somente após 16 semanas do início da hiperglicemia e a glomerulosclerose é

detectada a partir de 24 semanas. A produção glomerular de mRNA-TGF- β_1 estava aumentada com 20 semanas do início da hiperglicemia. Este aumento poderia determinar um aumento da síntese do polipeptídeo TGF- β_1 e contribuir para sua maior deposição no glomérulo.

As prováveis conseqüências do aumento de atividade para TGF- β_1 no glomérulo são múltiplas pois este polipeptídeo tem uma ação estimulatória significativa na síntese de vários componentes da matriz extra-celular [MacKay et al, 1989; Border et al, 1990; Coimbra et al, 1991], além de reduzir a degradação da matriz extra-celular recém formada [Edwards et al, 1987]. Foi demonstrado, em glomérulos de ratos diabéticos, que a presença do polipeptídeo TGF- β_1 estava associada a um aumento da síntese local de colágeno [Bollineni et al, 1993]. Neste trabalho, Bollineni et al, [1993], observaram que pequenos aumentos da concentração de TGF- β_1 , em cultura de glomérulos de ratos normais, são suficientes para aumentar significativamente a produção de colágeno, um efeito que é bifásico, pois, a partir de uma determinada concentração (5ng/ml) de TGF- β_1 , suplementações maiores de TGF- β_1 passam a inibir progressivamente esta atividade de síntese de colágeno. Os mesmos autores observaram que glomérulos de ratos diabéticos apresentam um pequeno, mas significativo, aumento da atividade de síntese de colágeno (1,5 vezes em relação ao controle), a qual não apresenta o efeito bifásico observado nos glomérulos normais. Quando se adiciona o anticorpo anti-TGF- β_1 , entretanto, este aumento basal de atividade de síntese de colágeno é supressível a níveis normais, indicando ser este um efeito específico do TGF- β_1 . Os resultados do estudo de Bollineni et al, [1993] sugerem que pequenas

concentrações do peptídeo TGF- β_1 , presentes no glomérulo de forma sustentada, podem ser suficientes para manter um aumento da síntese de componentes da matriz extra-celular *in vitro*, porém a reprodução de glomerulosclerose diabética *in vivo* ainda necessita ser demonstrada.

A origem da deposição glomerular do TGF- β_1 observada nos ratos diabéticos no presente trabalho, pelo menos em parte, parece ser devido a uma maior transcrição de RNA e da síntese deste polipeptídeo por células glomerulares residentes. Os resultados aqui apresentados, não afastam, no entanto, a possibilidade de que a deposição glomerular seja também secundária a uma menor degradação local do polipeptídeo TGF- β_1 . Teoricamente, pelo menos, isto seria possível, uma vez que o TGF- β_1 pode ligar-se à matriz extra-celular através de seus receptores (betaglicana) e a glicosilação não-enzimática de alguns de seus sub-componentes poderia interferir com esta ligação, estabilizando-a em relação à ação de proteases. Existe também a possibilidade de haver uma maior degranulação de plaquetas - as quais são ricas em TGF- β_1 a nível glomerular, uma vez que a adesividade plaquetária pode estar aumentada no diabetes descompensado.

Os níveis reduzidos de mRNA-TGF- β_1 encontrados, no presente estudo, no córtex renal não haviam sido descritos na literatura até o momento e podem ser explicados pela influência de alguns fatores: A primeira possibilidade é a de que, devido à hipertrofia renal que existe já nos primeiros dias de diabetes, neste modelo, o RNA de toda a massa cortical estaria aumentado, mascarando aumentos discretos do mRNA-TGF- β_1 glomerular (o qual representa uma proporção bem menor do córtex total). Desta forma, com mais RNA total, a razão entre o mRNA

para o TGF- β_1 e o RNA total poderia estar reduzida no córtex. Outra possibilidade é a de que a produção de TGF- β_1 no córtex esteja realmente reduzida em função da desnutrição apresentada pelos ratos no presente estudo. Em suporte a esta hipótese, o estudo de Okuda et al [1991] demonstrou que a dieta hipoprotéica pode reduzir os níveis renais de mRNA para TGF- β_1 em ratos com glomerulonefrite aguda. No presente estudo, embora os ratos estivessem com dieta normoprotéica, estes se apresentavam desnutridos, o que pode ser confirmado pela perda ponderal em relação aos controles. Esta desnutrição ocorreu provavelmente devido ao catabolismo gerado pelo diabetes mérito descompensado. Tal alteração metabólica poderia reduzir a produção de TGF- β_1 no córtex total. Desta forma, no diabetes descompensado de longa duração, poderia estar havendo uma menor produção de TGF- β_1 no córtex total, enquanto que a produção glomerular estaria aumentada.

Entre os mecanismos que poderiam estar envolvidos no aumento de produção glomerular de TGF- β_1 no diabetes destacam-se os níveis glomerulares de angiotensina II e a própria hiperglicemia.

A angiotensina II é capaz de estimular as células mesangiais de rato aumentando seus níveis de RNA mensageiro para componentes da matriz extra-celular - colágeno tipo I, fibronectina e biglicana - e de suas respectivas moléculas através do aumento da expressão do polipeptídeo do TGF- β_1 . A angiotensina II promove também a conversão do TGF- β_1 latente em ativo, e o uso do anticorpo anti-TGF- β_1 inibe o efeito da angiotensina II na produção de matriz extra-celular [Kagami et al, 1994]. Esta ativação parece ser mediada, *in vitro*, pela plasmina que por sua vez depende da conversão do plasminogênio, pelo ativador do

plasminogênio [Flaumenhaft et al, 1992]. Anderson et al [1993] demonstraram que ratos diabéticos apresentam concentrações intrarenais elevadas da proteína da renina assim como do RNA mensageiro para a renina e do angiotensinogênio, sugerindo a existência de ativação do sistema renina-angiotensina nesses animais. Neste estudo, a atividade da enzima conversora de angiotensina encontrava-se baixa nos túbulos proximais mas aumentada nos vasos e glomérulos, mostrando que há uma redistribuição da atividade do sistema renina-angiotensina no diabetes experimental.

Os mecanismos pelos quais a glicose poderia estimular a síntese do peptídeo do TGF- β_1 não são conhecidos, mas diversas hipóteses tem sido levantadas, entre elas a glicosilação não-enzimática [Brownlee et al, 1988] a redução intra-celular do mio-inositol pela ativação da via dos polióis [Ziyadeh et al, 1991] e a ativação da proteína quinase C [Ayo et al, 1991].

A glicose conhecidamente forma compostos reversíveis com proteínas teciduais e plasmáticas, chamados bases de Schiff, cuja síntese é diretamente proporcional à concentração de glicose no plasma. Estes compostos por sua vez reagem para formar moléculas mais estáveis, mas ainda reversíveis, chamados produtos de Amadori. [Brownlee et al, 1984]. Uma parte destes assim chamados produtos de glicosilação precoce sofre por sua vez uma lenta reorganização molecular, formando produtos de glicosilação avançada, os quais ligam-se através de pontes cruzadas dissulfeto de forma irreversível às proteínas plasmáticas (albumina, hemoglobina, IgG), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a proteínas tissulares, e a componentes da

matriz extra-celular (colágeno) [Brownlee et al, 1983; Kent et al, 1985], acumulando-se proporcionalmente aos níveis de glicose. A glicosilação não-enzimática pode alterar a conformação dos receptores para o TGF- β_1 ou mesmo das proteínas regulatórias intra-celulares. Isto poderia afetar a síntese ou a atividade do TGF- β_1 . Sustentando esta evidência, existe o estudo de de Cohen et al [1994a]. Estes autores demonstraram que células mesangiais de ratos quando submetidas à incubação com produtos de Amadori, aumentam a sua síntese de colágeno e a sua expressão de RNA para colágeno. A administração crônica de anticorpo anti-albumina glicosilada de ratos em ratos diabéticos atenua as manifestações histológicas e reduz a albuminúria da nefropatia diabética [Cohen et al, 1994b]. Este aumento de síntese de matriz extra-celular poderia estar sendo mediado pelo TGF- β_1 .

Um segundo mecanismo de ação pelo qual a glicose poderia agir seria a ativação da via dos polióis reduzindo os níveis de mio-inositol intra-celular. Ratos diabéticos apresentam redução do conteúdo renal de mio-inositol [Goldfarb et al, 1991]. In vitro, a suplementação com mio-inositol restabelece a proliferação celular de células mesangiais e reduz a sua produção de matriz extra-celular relacionada à exposição a altas concentrações de glicose [Ziyadeh et al, 1991].

A glicose também pode aumentar a síntese de matriz extra-celular através da ativação da proteína quinase C. Este mecanismo foi demonstrado em células mesangiais de ratos [Ayo et al, 1991] e é bloqueado por inibidores da proteína quinase C [Studer et al, 1993]. A glicose, quando em excesso no meio intra-celular, utiliza como via alternativa para sua utilização a síntese de sorbitol que por sua vez

oxida-se em frutose gerando um aumento na relação citosólica NADH/NAD⁺. Este aumento de NADH facilita a síntese de diacilglicerol (DAG) que por sua vez ativa a Proteína quinase C. Esta ativação está associada a um aumento da síntese dos componentes da matriz extra-celular como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV [Ayo et al, 1991, Studer et al, 1993] e de seus respectivos níveis de mRNA [Kreisberg et al, 1993; Studer et al, 1993]. A presença deste efeito em células humanas no entanto, ainda não foi confirmada.

Embora o mecanismo exato pelo qual a hiperglicemia atue não esteja totalmente estabelecido (direto, glicosilação não enzimática, via ativação da proteína C quinase ou outro), é sabido que altas concentrações de glicose estimulam a produção de colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e outros componentes da matriz extra-celular por células glomerulares [Haneda et al 1991; Ayo et al 1990], têm um efeito inibitório na proliferação celular [Wolf et al, 1992], e podem induzir hipertrofia celular *in vitro* [Ziyadeh et al, 1990]. Altas concentrações de glicose exercem efeito estimulatório sobre o mRNA-TGF- β_1 em células mesangiais de ratos [Wolf et al, 1992] e de túbulo proximal de rato [Rocco et al, 1992].

A albuminúria observada nos animais diabéticos no presente estudo foi discreta e transitória nas primeiras semanas. Ela se tornou, entretanto, mais intensa e persistente a partir da 16ª semana, ocorrendo então um aumento progressivo na sua intensidade. Este aumento foi acompanhado do aparecimento de alterações estruturais do glomérulo, evidenciando, portanto, a presença da glomerulopatia diabética. Como a proteinúria inicial não estava relacionada com as alterações na histologia

renal, esta deve ser mais provavelmente secundária às alterações da hemodinâmica renal que podem ser observadas já nas fases iniciais do diabetes [Viberti et al, 1983; Zatz et al, 1986].

A albuminúria é uma manifestação característica da nefropatia diabética clínica e experimental e é essencialmente de origem glomerular. Nas fases iniciais da doença é de pequena intensidade e pode ser uma das conseqüências do aumento da pressão de filtração nos capilares glomerulares [Viberti et al, 1983; Zatz et al 1986]. Posteriormente, com a evolução da doença, podem ocorrer alterações de seletividade glomerular em relação a carga elétrica das macromoléculas, devido a uma redução dos componentes aniônicos das paredes dos capilares glomerulares. Vários trabalhos têm mostrado que o conteúdo glomerular de heparan-sulfato está reduzido na nefropatia diabética [Kanwar et al, 1983; Cohen et al, 1988; Makino et al, 1993]. Esta proteoglicana é fortemente aniônica e está presente na membrana basal dos capilares glomerulares nas lâminas raras interna e externa [Caufield & Farquhar, 1976], sendo portanto, um determinante importante da permeabilidade glomerular, restringindo assim a passagem de moléculas aniônicas pelo filtro glomerular [Kanwar et al, 1983]. Gambaro et al [1992] observaram uma redução da excreção urinária de albumina em ratos com DM após o tratamento com proteoglicanas (heparinas de baixo peso molecular e dermatan sulfato) por um período prolongado (8 meses). Esta redução estava relacionada com o aumento do conteúdo da heparan-sulfato nas paredes dos capilares glomerulares e conseqüentemente com a restauração da densidade de carga dos mesmos. Nas fases mais avançadas da

glomerulopatia ocorre também perda da seletividade do filtro glomerular em relação ao tamanho das macromoléculas devido ao aparecimento de populações de poros de maior diâmetro nas paredes capilares glomerulares [Kaysen et al, 1986].

Embora os achados morfológicos e laboratoriais encontrados no rim de ratos com diabetes induzido experimentalmente sejam muito semelhantes com os observados em humanos, algumas diferenças histológicas a nível renal ocorrem. A mais significativa é que o padrão da glomerulosclerose é invariavelmente difuso no rato, raramente sendo encontrados nódulos como nas lesões de Kimmelstiel-Wilson, e são mínimas as oclusões glomerulares, ao contrário da nefropatia diabética em humanos [Kempe et al, 1993]. O presente modelo experimental, utilizando a estreptozotocina, é, entretanto, amplamente aceito na literatura mundial para o estudo da nefropatia diabética, especialmente nas fases que precedem a insuficiência renal crônica [Kempe et al, 1993].

A possibilidade de que a nefrotoxicidade da estreptozotocina tenha interferido nos resultados encontrados neste trabalho é remota. A lesão característica causada pela estreptozotocina é precoce, e está associada com lesão primariamente a nível tubular, geralmente poupando o glomérulo. No presente estudo, as alterações histológicas renais observadas ocorreram em uma fase tardia do diabetes, sendo típicas da glomerulosclerose diabética e podem ser atribuíveis às alterações metabólicas [Kempe et al 1993; Churchil et al 1993]. A nefrotoxicidade da estreptozotocina também é menos significativa do que a da aloxana, motivo pelo qual este modelo têm sido preferido para o

estudo da nefropatia diabética [Kempe et al, 1993]. Além disso, a presença do polipeptídeo TGF- β_1 no glomérulo também já foi encontrada em pacientes com diabetes mérito. Estes dados, tomados em conjunto, tornam pouco provável que a deposição do polipeptídeo do TGF- β_1 , no presente estudo, seja secundária a um efeito nefrotóxico da estreptozotocina.

Conclusões:

Foram obtidas evidências que mostram que o TGF- β_1 pode ter uma participação na patogênese da glomerulosclerose diabética:

1. Existe aumento do conteúdo glomerular do polipeptídeo do TGF- β_1 em ratos com glomerulosclerose diabética.
2. O aumento do conteúdo de TGF- β_1 no glomérulo torna-se mais intenso com a evolução da glomerulosclerose, correlaciona-se com a albuminúria e está associado temporalmente com o aumento do conteúdo glomerular de colágeno total e tipo I.
3. A reação imunohistoquímica para TGF- β_1 ocorre predominantemente no mesângio e nas paredes dos capilares glomerulares e com menor intensidade a nível tubular.
4. O aumento do conteúdo de TGF- β_1 deve ser, pelo menos em parte, secundário a um aumento da produção glomerular de TGF- β_1 , já que um aumento dos níveis de mRNA-TGF- β_1 precedeu a ocorrência de imunorreatividade para este peptídeo nas células glomerulares.

Referências bibliográficas

Referências Bibliográficas

Abrass CK, Peterson CV and Raugi GJ: Phenotypic expression of collagen types in mesangial matrix of diabetic and non-diabetic rats. *Diabetes* 37, 1695-1702, 1988.

Andersen A.R, Sandhal-Christiansen J, Andersen K, Kreiner S and Deckert T: Diabetic nephropathy in type-1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 25: 496-501, 1983.

Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR: Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical and molecular biological correlations. *Am J Physiol* 265:F477-F486, 1993.

Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, Petros WP, Jirtle RL. Transforming Growth Factor β as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med* 328:1592-1598, 1993.

Aron DC, Rosenzweig JL Abboud HE: Synthesis and binding of insulin-growth factor I by human glomerular mesangial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 68:585-591. 1989.

Assoian RK, Komoryia A, Meyers Y, Miller D.M and Sporn, M.B: Transforming Growth Factor β in human platelets. *J. Biol. Chem.* 258: 7155-7160, 1983.

Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA Glass II WF and Kreisberg JI: High glucose causes an increase in extra-celular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 136:1339-1348, 1990.

Ayo SH, Radnik R, Garoni J, Troyer DA, Kreisberg JI: High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures. *Am J Physiol* 261:F571-577, 1991.

Bank N, Lahorra MA, Aynedjian HS: Accute effect of calcium and insulin on hyperfiltration of early diabetes. *Am J Physiol* 252: (Renal Fluid Electrolyte Physiol 23):E13-E20, 1987.

Bank N: Mechanisms of diabetic hyperfiltration In: Cohen J, Harrington JT, Madias NE and Zussman CJ: Nephrology forum. *Kidney Int* 40: 792-807. 1991.

Barnett R, Scharschmidt L, Ko Y-H, Schlondorff D: Comparison of glomerular and mesangial prostaglandin synthesis and glomerular contraction in two rat models of diabetes mellitus. *Diabetes* 36:1468-1475, 1987.

Bell GM, Bernstein RK, Laragh JH, Atlas SA, James GD, Pecker MS, Sealey JE: Increased plasma atrial natriuretic factor and reduced renin in patients with poorly controlled diabetes mellitus. *Clin Sci* 77:177-182, 1989.

Bennet R.A. & Pegg A.E.: Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Can Res.* 41:2786-90, 1981.

Berridge MJ: Growth factors, oncogenes, and inositol lipids. *Cancer Surv* 5:413-30. 1986.

Blantz, R.C. Peterson O.W., Gushwua, L. Tucker, B.J.: Effect of modest hyperglycemia in tubulo-glomerular feedback activity. *Kidney International* 22 (Suppl. 12) s206, 1982.

Blue M.L., Shin I.: Diabetes induction of subdiabetogenic doses of Streptozotocin in BALB/cBOM mice: non-involvement of host B-lymphocyte functions. *Diabetes* 33: 105-10. 1984

Bollineni JS & Reddi AS: Transforming growth factor- β 1 enhances glomerular collagen synthesis in diabetic rats. *Diabetes* 42,1673-1677, 1993.

Border WA, Okuda S, Languino LR et al: Transforming Growth Factor- β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int.*; 37: 689-695. 1990a.

Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB and Ruoslahti E: Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor- β 1. *Nature*. London 346:371-374, 1990b.

Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD and Ruoslahti E. Natural inhibitor of Transforming Growth Factor β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature Lond.* 360: 361-364, 1992.

Border WA & Noble NA: Cytokines in kidney disease: The role of Transforming Growth Factor - β . *Am J Kidney Diseases* 22(1) pp105-113, 1993a.

Border WA, Yamamoto T, Noble N, Gold L, Nast C, Cohen A: HIV associated nephropathy is linked to TGF- β and matrix protein expression in human kidney. *J Am Soc Nephrol* 4:675, abstract, 1993b.

Border WA & Noble NA: Transforming Growth Factor- β in tissue fibrosis. In: Epstein FH Ed: Mechanism of disease. *New England Journal of Medicine* 331(19):1286-1292, 1994.

Brownlee M, Vlassara H, and Cerami A: Non-enzymatic glycosilation reduces the susceptibility of fibrin to degradation by plasmin. *Diabetes* 32:680, 1983a.

Brownlee M, Pongor S, Cerami A: Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosilated collagen :role in the in situ formation of immune complexes. *J Exp Med* 158:1739-1744, 1983b.

Brownlee M, Cerami A and Vlassara H: Advanced glycosilation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. In: Flier JS and Underhill LH Seminars in Medicine *New England J Medicine* 318 20 1315-1321 1988.

Bruneval P, Foidart JM, Nochy D, Cammileri JP, Bariety J: Glomerular matrix proteins in nodular glomerulosclerosis in association with light chain deposition disease and diabetes mellitus. *Hum Pathol* 16:477-84, 1985.

Canessa M, Andragna N, Solomon HS, Connolly TM, Tosteson DC: Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *N Eng J Med* 302:772-776, 1980.

Castilla A, Prieto J, Fausto N: Transforming Growth Factor β 1 and a in chronic liver disease: effects of interfeon alfa therapy. *N Engl J Med* 324:933-940, 1991.

Caufield JP and Farquhar MG: Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes: their possible role infiltration and attachment. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1646-1650, 1976.

Ceriello A, Curcio F, Colombatti A, Dello Russo P, Pegoraro I, Giugliano D: Hyperglycemia-induced endothelial cell alterations are reversed by antioxidants [Abstract] *Diabetologia* 35 (Suppl. 1); A103, 1992.

Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chlorophorm extraction: *Anal Biochem* 162: 156-159.23.1987.

Christiansen JS, Gammelgaard J, Frandsen M and Parving H-H: Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetics. *20:451-456, 1981.*

Church GM, Gilbert W: Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA, 81:1991-1995, 1984.*

Churchil P, Churchil M, Bidani A, and Dunbar J: Streptozotocin-induced renal hemodynamic changes in isogenic Lewis rats: a kidney transplant study. *Am J Physiol* 264 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 33): F100-105, 1993.

Cohen MP, Klepser H, Wu VY: undersulfation of glomerular basement membrane heparan sulfate in experimental diabetes and lack of correction with aldose reductase inhibition. *Diabetes* 37:1324-1327, 1988.

Cohen MP and Ziyadeh FN: Amadori glucose adducts modulate mesangial cell growth and collagen gene expression. *Kidney Int* 45:475-484, 1994a.

Cohen MP, Hud E & Wu VY: Amelioration of diabetic nephropathy by treatment with monoclonal antibodies against glycated albumin. *Kidney Int* 45:1673-1679, 1994b.

Cohen, AH., Mampaso, F.& Zambony, L.: Glomerular podocyte degeneration in human renal disease. An ultra-structural study. *Lab Invest* 37: 40, 1977

Coimbra TM, Furtado MR, Lachat JJ et al: Effects of administration of cationic and native homologous albumin on the kidney. *Nephron* 33:208-215, 1983.

Coimbra TM, Wiggins R, Noh JW, et al: Transforming Growth Factor- β production in anti-glomerular basement membrane disease in the rabbit. *Am J Pathol* 138:223-234, 1991.

Conti FG, Elliot SJ, Striker LJ and Striker GE: Binding of insulin-growth factor-1 by glomerular endothelial and epithelial cells: Further evidence for IGF-1 action in the renal glomerulus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:952-958, 1989.

Craven PA, Caines MA, DeRubertis FR: Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: Relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Metabolism* 36:95-103, 1987.

Craven PA, DeRubertis FR: Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin induced diabetic rats: possible mediation by glucose. *J Clin Invest* 83:1667-1675, 1989.

Creely JJ, DiMari SJ, Howe AM, Haralson MA: Effects of Transforming Growth Factor- β on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. *Am J Pathol* 140(1):45-55, 1992.

Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, et al. In vitro and in vivo association of transforming growth factor- β 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 108:2477-2482, 1989.

Damsgaard EM, Mogensen CE.: Microalbuminuria in elderly hyperglycaemic patients and controls. *Diabetic Med* 3:430-35, 1986.

Daniel T: Peptide growth factors and the kidney. In: Seldin DW and Giebisch. *The kidney physiology and pathophysiology*. Second edition. Raven Press Ltd, New York, pp:3135-3155, 1992.

Danielpour D, Dart LL, Flander KC, Roberts AB & Sporn MB: Immunodetection and quantitation of the two forms of Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β 1 and TGF- β 2) secreted by cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 138:79-86, 1989.

Danielpour D, Kim KY, Windsor TS, et al: Differential regulation of TGF- β 1 and TGF- β 2 expression by retinoic acid and epidermal growth factor in NRK and A549 cells. *J Cell Biochem* 14C:292,(suppl) (abstract), 1990.

Danne T, Spiro MJ and Spiro RG: Effect of high glucose on type IV collagen production by cultured glomerular Epithelial, endothelial and mesangial cells. *Diabetes* 42:170-177, 1993.

Dean DC, Mc Quillan JJ, Weintraub S: Serum stimulation of fibronectin gene expression appears to result from rapid serum-induced binding of nuclear proteins to a cAMP response element. *J Biol Chem* 265:3522-3527, 1990.

Derubertis FR and Craven PA: Activation of Protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy *Diabetes* 43:1-8, 1994.

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al: Human transforming growth factor β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316:701-705, 1985.

Desjardins M, Gross F, Wieslander J, Gubler MC, Bendayan M: Heterogeneous distribution of monomeric elements from the globular domains (NC1) of type IV collagen in renal basement immunocytochemistry. *Lab Invest* 63:637-648, 1990.

Earle K, Walker JD, Hill C, Viberti GC: Familial clustering of cardiovascular disease in insulin-dependent diabetic patients with nephropathy. *N Eng J Med* 326:673-677, 1992.

Ebner R, Chen R-H, Lawler S, Zioncheck T, Derinck R: Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 262:900-902, 1993.

Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, et al: Transforming Growth Factor-beta modulates the expression of collagenase and metalloprotease inhibitor. *EMBO J* 6: 1899-1905, 1987.

Fabre J, Balant LP, Dayer PG, Fox HM, Vernet AT: The kidney in maturity onset diabetes mellitus: a clinical study of 510 patients. *Kidney Int* 21:730-38, 1982.

Falk R.J., Scheinmann J.J., Mauer S.M. et al: Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *Diabetes* 32:34-39, 1983.

Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytic Biochem* ;132 6-13.25 1983.

Feldt-Rasmussen B, Mathiensen ER, Hegedus L, Deckert T: Kidney function during 12 months of strict metabolic control in insulin-dependent diabetic patients with incipient nephropathy. *N Eng J Med* 314:665-670, 1986.

Fellstrom B, Dimeny E, Larsson E, Klareskog L, Tufveson G, Rubin K: Importance of PDGF receptor expression in accelerated atherosclerosis-chronic rejection. *Transplant Proc.* 21:3689-3691, 1989.

Fine A, Goldstein RH: The effect of Transforming Growth Factor β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262:3897-3902, 1987.

Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P and Rifkin DB: Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor- β in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol* 118:0901-909, 1992.

Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist, Orskov H: Kidney IGF-1 mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 33:334-338, 1990.

Fogo A, Yoshida Y, Glick AD, Homma T, Ichikawa I: Serial micropuncture analysis of glomerular function in two rat models of glomerular sclerosis *J Clin Invest* 82:322-32, 1988.

Frolik, CA, Dart, L.L, Meyers C.A.; Smith, DM. and Sporn M.B.: Purification and initial characterization of a type β transforming Growth Factor from Human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3676-3680. 1983.

Fuehr Y, Kaczmarczyk Y, Kruttgen GD: Eine einfache colorimetrische methode zur inulin bestimmung für nieren clearance-untersuchungen bei stoffwechselgesunden und diabetiken. *Klinik Wochenschrift* 33:729-739.21 ,1955

Gambaro G, Cavazzana PL, Piccoli A, Borsatti A, Crepaldi G, Marchi E, Venturini AP and Baggio B: Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int* 42. pp 285-292. 1992.

Gambaro G, Venturini AP, Noonan DM, Fries W, Reis G, Garbisa S, Milanese C, Pesarini A, Borsatti A, Marchi E and Baggio B: Treatment with glycosaminoglycan formulation ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 46:797-806, 1994.

Glick AD, Jacobson HR, Haralson MA: Mesangial deposition of type I collagen in human glomerulosclerosis. *Hum Pathol* 2:1373-1379, 1992.

Goldfarb S, Simmons DA, Kern EFO: Amelioration of glomerular hyperfiltration in acute experimental diabetes mellitus by dietary myo-inositol supplementation and aldose reductase inhibition. *Trans Assoc Am Physicians* 99:67-72, 1986.

Goldfarb S, Zyiadeh FN, Kern EFO, Simmons DA: Effects of polyol-pathway inhibition and dietary myo-inositol on glomerular hemodynamic function in experimental diabetes mellitus in rats. *Diabetes* 40:465-471, 1991.

Guh JY, Lai YH, Shin SJ, Chuang LY and Tsai JH: Epidermal growth factor in renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Nephron* 1991;59:641-647, 1991.

Hamet P, Sugimoto H, Umeda F, Lecavalier L, Franks DJ Orth DN and Chiasson JL: Abnormalities of platelet-derived growth factors in insuli-dependent diabetes. *Metabolism* 34 (12) supp1.25-31, 1985.

Haneda M, Kikkawa R, Horide N, et al: Glucose enhances type IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. *Diabetologia* 34:198-200, 1991

Hasstedt SJ, Wu LL, Ash KO, Kuida H, Williams RL: Hypertension and sodium-lithium countertransport in Utah pedigrees: evidence for a major-locus inheritance. *Am J Hum Gene* 43:14-22, 1988.

Hauser EB, Hostetter TH and Daniels BS: Non-enzimatic glycation enhances its permeability through the glomerular basement membrane. *Kid International*37:507, 1990.

Hommel E, Mathiensen E, Arnold-Larsen S, Edsberg B, Olsen UB, Parving H-H: Effects of indometacin on kidney function in type I (insulin-dependent) diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia* 30:78-81.1987.

Hostetter TH.; Troy J.L.: Glomerular hemodynamics in experimental diabetes. *Kidney Int.* 19:410, 1981.

Hostetter TH: Diabetic Nephropathy; in: Brenner BM and Rector FC (eds): *The Kidney* ed 4, Philadelphia, Saunders, USA, , vol 2, pp1695-1727, 1991.

Ignotz RA, Massagué J: Transforming Growth Factor β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extra-cellular matrix. *J Biol Chem.* 261: 4337-4345.1986

Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL: Preferential elevation of protein kinase C isoform β II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: diferential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11059-63, 1992.

Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda T, Imai E: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- β or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92:2597-2601, 1993.

Jensen P.K., Sandhal-Christiansen J., Steven K. & Parving H.H.: Renal Function in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Diabetologia* 21:409-14, 1981.

Jones CL, Buch S, Post M, McCullach L, Liu E and Eddy AA. Pathogenesis of interstitial fibrosis in chronic purine amino-nucleoside nephrosis. *Kidney Int* 40:1020-1031, 1991.

Juncos L.A, Ito,S. Carretero O: Effect of insulin on contractility of isolated afferent arterioles. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2: 521, 1991.

Kagami S, Border WA, Ruoslahti E and Noble NA: Coordinated expression of $\beta 1$ integrins and transforming growth factor $\beta 1$ -induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab Invest* 69:68-76, 1993.

Kagami S, Border WA, Miller DE, et al: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of Transforming Growth Factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93:2431-2437.31. 1994.

Kaneto H, Morriseey J and Klahr S. Increased expression of TGF- $\beta 1$ mRNA in obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int* 44:313-321, 1993.

Kanwar YS, Rosenzweig LJ, Linker A, Jakubowski ML,: Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: Biochemical and autoradiographical evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2272-75, 1983.

Karpen CW, Spanheimer RG, randolph AL, Lowe WL: Tissue specific regulation of basic fibroblast growth factor mRNA levels by diabetes. *Diabetes* 41:222-26, 1992.

Kasiske, B.L., O'Donnell, M.P. Keane, W.F: Glucose-induced increases in renal hemodynamic function: Possible modulation by renal prostaglandins. *Diabetes* 34:360-64, 1985.

Kawada J., Toide K., Nishida M et al: New diabetogenic Streptozotocin analogue, 3-O-methyl-2-(methylnitrosoamino) carbonyl amino D-glucopyranose. Evidence for a glucose recognition site on pancreatic β cells. *Diabetes* 35: 74-77, 1986.

Kaysen GA, Myers BD, Couser WG, Rakin R and Felts JM. Biology of disease. Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab Invest* 54:479-499, 1986.

Kempe HP, Engelmann K, Gretz N, et al: Models of diabetes for studying diabetic nephropathy; in Gretz N, Strauch M (eds): Experimental and genetic rat models of chronic renal failure. Basel, Karger 34. pp 148-155. 1993

Kent MJC, Light ND, Bailey AJ: Evidence for glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosilation in vitro. *Biochem J* 225:745-752, 1985.

Kimmelstiel P, Wilson C: Intercapillary lesions in glomeruli of kidney. *Am J Pathol.* 12:83-97, 1936.

Khalil N, Whitman C, Zuo L, Danielpour D, Greenberg A: Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor- β secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in the rat. *J Clin Invest* 93:1172-1178, 1993.

Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I: The Progression of renal disease. *N Eng J Med* , 318;25:1657-1666.1988

Kreisberg JI, Radnik RA, Ayo SH, Garoni J and Saikumar P: High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int* 46:105-112, 1994.

Krolewski AS, Canessa M, Warram JH et al: Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus *N Eng J Med* 318:140,1988.

Kroustrup J.P, Gundersen H.J.G, Østerby R.: Glomerular size and structure in diabetes mellitus. *Diabetologia* 13:207-210, 1977.

Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Co-localization of transforming growth factor β 2 with α 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 86:917-922, 1990.

Kurokawa K, Silverblatt, FJ., Klein K.L.; Wang, M-S. Lerner R, R.J.: Binding of 125 I-insulin to the isolated glomeruli of rat kidney. *J. Clin. Invest.* 64:1357-64,1979

Laragh JH, Atlas SA: Atrial natriuretic hormone: A regulator of blood pressure and volume homeostasis. *Kidney Int* 34:S64-S71, 1988.

Laurell, CB: Electroimmunoassay. *Scand J clin Lab Invest* 124: suppl. 21-23.19.1972

Leung, D.Y.M.,; Glagov, S.; Mathews, M.B.; Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science* 191:475-477, 1976.

Lopes de Faria JB, Friedman R, Tariq T, Viberti GC: Prevalence of raised sodium-lithium countertransport activity in type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Kidney Int* 41:877-882, 1992.

Lopez-Castillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124:557-568, 1994.

Lovett DH, Ryan JL, Sterzel RB : Stimulation of rat mesangial cell proliferation by macrophage interleukin 1. *J. Immunol.*, 131:2830-2836,1983.

Lundbaek K, Malmros R, and Andersen HC: Hypophysectomy for diabetic angiopathy: a controlled clinical trial. In:Goldberg MF and Fine SL (eds): Symposium on the treatment of diabetic retinopathy. U.S. Public Health Service Publication No1980,p291, 1969.

Lundbaek K: Growth hormone's role in diabetic microangiopathy. *Diabetes* 25(suppl 2):845-849,1976.

MackKay K, Striker LJ, Stauffer JW, et al: Transforming Growth factor- β . Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. *J Clin Invest* 83: 1160-1167.1989

MackKay K, Kondaiah,P, Danielpour D. et al: Expression of Transforming Growth Factor- β 1 and β 2 in Rat Glomeruli. *Kid Intern* 38, 1095-1100, 1990.

MacVerry B, Hopp A, Fischer C and Huehns ER: Production of pseudo diabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections of glycosilated proteins. *Lancet* 1:738-740, 1980.

Maniatis T., FritschE.F. and Sambrook J.: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

Mauer SM, Steffes MW, Azar S, Sandberg SK, Brown DM:The effects of Goldblatt hypertension on development of glomerular lesions of diabetes mellitus in the rat.*Diabetes* 27:738-44, 1978.

Makino H, Yamasaki Y, Haramoto T, Shikata K, Hironaka K, Ota Z and Kanwar YS: Ultrastructural changes of extra-cellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 68(1): 45-55, 1993.

Mauer S.M., Steffes M.W., Ellis E.N. et al: Structural-Functional Relationships in Diabetic Nephropathy. *J. Clin Invest* 74, 1143-55, 1984.

Melcion C, Lachman L, Killen PD, Morel-Maroger L, Striker GE: Mesangial cells, effect of monocyte products on proliferation and matrix synthesis. *Transpl. Proc.* 3: 559-564, 1982.

Merimee TJ: A follow up study of vascular disease in growth-hormone-deficient dwarves with diabetes. *N Eng J Med.* 298:1217-1222, 1978.

Messent J, Elliott TG, Jarrett RJ, Hill RD, Keen H, Viberti GC: The prognostic significance of microalbuminuria in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 23-year follow-up study. *Kidney Int* 41:936-39, 1992.

Mogensen, C.E.: Glomerular filtration rate and renal plasma flow in normal and diabetic man during elevation of blood sugar levels. *Scand J. Clin Lab Invest* 28: 177-182, 1971.

Mogensen C.E & Andersen MJF: Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* 22:706-712, 1973.

Mogensen C.E & Andersen MJF: Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin-treatment. *Diabetologia* 11:221-24, 1975a.

Mogensen CE, Andersen MJF: Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin-treatment. *Diabetologia* 11:221-24, 1975b.

Myers BD, Nelson RG, Williams GW, Bennett PH, Hardy SA, Berg RL, Loon N, Knowler WC and Mitch WE. Glomerular function in PIMA indians with Noninsulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *J Clin Invest* 88:524-530, 1991.

Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG: Regulation of insulin-growth factor I gene expression in human macrophage-like cell line U 937. *J Clin Invest* 85:448-55 1990.

Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, et al: mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 42:450-456.17.1993

Nelson RG, Pettitt DJ, Carraher MJ, Baird HR, Knowler WC: Effect of proteinuria on mortality in NIDDM. *Diabetes* 37:1499-1504, 1988.

Nelson RG, Kunzelman CI, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Knowler WC: Albuminuria in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus in impaired glucose tolerance in Pima indians. *Diabetologia* 32:870-76, 1989.

Nerlich A, Schleicher E.: Immunohistochemical localization of extra-cellular matrix components in human diabetic glomerular lesion. *Am J Pathol* 139: 889-899, 1991.

Nerlich AG, Schleicher ED, Wiest I, Specks U, Timpl R: Immunohistochemical localization of collagen VI in diabetic glomeruli. *Kidney Int* 45: 1648-1656, 1994.

Okano R, Mita T, Matsui T: Characterization of a novel promoter structure and its transcriptional regulation of the murine laminin B1 gene. *Biochim Biophys Acta* 1132: 49-57, 1992.

Okuda SL, Languino R, Ruoslathi E, et al: Elevated expression of Transforming Growth Factor- β and proteoglycans production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extra-cellular matrix. *J Clin Invest* 86: 453-462, 1990;

Okuda S, Nakamura T, Yamamoto T, et al: Dietary protein restriction rapidly reduces Transforming Growth Factor β_1 expression in experimental glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* ;88:9765-69.1991

Olson, JL, Hostetter, TH, Rennke, H.G. et al: Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. *Kidney Int.* 22:112-126, 1982.

Ortola FV, Ballerman BJ, Andersen S, Mendez RE, Brenner BM: elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. *J Clin Invest* 870:670-674, 1987.

Østerby R. : Early Phases in the development of diabetic glomerulopathy. *Acta Med Scand* 574(suppl):1, 1975.

Østerby R. & Gundersen H.J.G.: Glomerular size and structure in diabetes Mellitus. Early abnormalities. *Diabetologia* 11:225-229, 1975.

Østerby, R.; Gundersen H.J.G.: Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* 18: 493-500, 1980.

Østerby R; Parving HH, Nyberg G, et al: A strong correlation between glomerular filtration rate and filtration surface in diabetic nephropathy. *Diabetologia* 31:265-270,1988

Partasarathi N.; Spiro, R.G. Effect of Diabetes on the Glycosaminoglycan Component of the Human Glomerular Basement Membrane: *Diabetes*: 31:: 738-741, 1982.

Parving, H-H , Christiansen J.S, Noer I.,Troinier B., Mogensen, C.E.: The effect of glucagon infusion on kidney function in short-term insulin-dependent juvenile diabetes. *Diabetologia* 19:350-354, 1980.

Parving H-H, Hommel E, Skott P, Edberg B, Bahnsen M, Lauritzen M, Høngaard P, Lauritzen E: Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy in patients with insulin-dependent diabetes. *Br Med. J* 296:156-60, 1988.

Peltonen J, Hsiao LL, Jaakkola S et al : Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor- β 1 mRNA. *J Invest Dermatol* 97:240-248, 1991.

Peterson DT, Greene WC, Reaven GM.: Effect of experimental diabetes on kidney ribosomal protein synthesis. *Diabetes* 20:649-654, 1971.

Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J et al: Platele-derived -growth-factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 109:429-440, 1989.

Pugliese G, Pricci F, Pugliese F, Mene P, Lenti L et al: Mechanisms of glucose-enhanced extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells. *Diabetes* 43.478-490, 1994.

Raj L, Azar S, Kzane W: Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 26:137-143.1984.

Riser BL, Cortes P, Zhao X, et al: Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in rat. *J Clin Invest*:90:1932-1943, 1992.

Roberts, A.B.; Anzano, M.A.; Meyers, C.A.; Smith D.M. and Sporn, M.B.. Purification and properties of a type beta transforming Growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22: 5692-5698, 1983.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al: Transforming Growth Factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4167-4171, 1986.

Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S and Ziyadeh FN: Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 41:107-114, 1992.

Sabbatini M, Sansone G, Uccello, Giliberti A, Conte G and Andreucci VE: Early glycosilation products induce glomerular hyperfiltration in normal rats *Kidney Int* 42:875-881, 1992.

Sandhal-Christiansen J; Gamelgaard J; Frandsen M. and Parving H-H: Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 20:451-456, 1981a.

Sandhal-Christiansen J, Frandsen M and Parving H-H: The effect of intravenous insulin infusion on kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 20: 199-204, 1981b.

Sandhal-Christiansen J., Gamelgaard J. Orkov H., Andersen A.R., Telmer S. and Parving H-H.: Kidney function and size in normal subjects before and during growth hormone administration for one week. *Eur. J. Clin. Invest.*11:487,1981c.

Sandler S., Swenne I Streptozotocin, but not Alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 25:444-47, 1983.

Sandler S., Swenne I.: DNA repair synthesis in the pancreatic islets cells of Streptozotocin-treated mice. *Diabetes Res.* 2:255-258, 1985.

Saski A, Horiuchi N, Hasegawa K, Uehara M: Risk factors related to the development of persistent albuminuria among diabetic patients observed in long-term follow-up. *J Jap Diabetes Soc* 29:1017-23, 1986.

Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M, Verma IM: Fos-associated cellular p-39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* 54:553-560, 1988.

Schambelan M, Balke S, Sraer J, Bens M, Nivez MP, Wahbe F: Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 75:404-412, 1985.

Scholey JW, Meyer TW: Control of glomerular hypertension by insulin administration in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 83 1384-1389, 1989.

Scwieger J and Fine L: Renal Hypertrophy, Growth factors and nephropathy in diabetes mellitus. *Seminars in Nephrology* 10 930: 242-253. 1990.

Seney F.D, Salmond R.: Tubuloglomerular feedback in diabetic rats. *Kidney Int.*33:412A, 1988.

Seyer-Hansen K.:Renal Hypertrophy in Streptozocin Diabetic Rats. *Clin Sci Mol Med* 51:551-555, 1976.

Seyer-Hansen K, Hansen J, Gundersen HJG: Renal hypertrophy in experimental diabetes. A morphometric study. *Diabetologia* 18:501-505, 1980.

Shaklai N, Garlick RL and Bunn HF: Non-enzimatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 259:3812, 1984.

Shankland SJ, Scholey: Expression of Transforming Growth Factor- β 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 46: 430-442, 1994.

Shlondorfe D.: The glomerular mesangial cell: and expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J.* 1:272-81, 1987

Sheinmann J.I.,Steffes M.,Brown W. et al: The immunohistopathology of glomerular antigens: Increase mesangial actinomyosin in experimental diabetes in the rat. *Diabetes* 27:632-637, 1978

Shihab F, Yamamoto T, Nast C et al. Acute and chronic allograft rejection in human kidney correlate with the expression of TGF- β and extra-cellular matrix protein. *J Am Soc Nephrol* 4:671 [abstract], 1993.

Shultz PJ, DiCorleto PE, Silver BJ, Abboud HE: Mesangial cells express PDGF mRNAs and proliferate in response to PDGF. *Am J Physiol* 255:F674-684, 1988.

Silver BJ, Jaffer EE, Abboud HE: Platelet-derived growth factor synthesis in mesangial cells: induction by multiple peptide mitogens. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 86:1056-1060, 1989.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM: Some recent advances in the chemistry and biology of Transforming Growth Factor-beta. *J Cell Biol* 105:1039-1045, 1987.

Sporn MB, Roberts AB. A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. *J Clin Invest* 92:2565-2566, 1993.

Spurney RF, Onorato JJ, Albers FJ, Cofman TM: Tromboxane binding and signal transduction in rat glomerular mesangial cells. *Am Physiol* 264: F292-99 1993.

Sharma K & Ziyadeh FN.: The Transforming Growth factor- β system and the kidney. *Seminairs in Nephrology* 13:116-128, 1993.

Stackhouse S, Miller P.L., Park S.K. & Meyer T.W.: Reversal of glomerular hyperfiltration and Renal hypertrophy by blood glucose normalization in diabetic rats. *Diabetes* 39: 989- 95,1990.

Steffes MW, Brown DM, Mauer SM: Diabetic glomerulopathy following unilateral nephrectomy in the rat. *Diabetes* 27:35-41, 1978.

Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR: Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high glucose medium. *Diabetes* 42:188-226, 1993a

Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR: Tromboxane stimulation of mesangial cell fibronectin synthesis is signaled by activation of protein kinase C and is modulated by cGMP. *J Am Soc Nephrol* 4: 458, 1993b.

Tamaki K, Okuda S, Ando T, Iwamoto T, Nakayama M and Fujishima M: TGF- β 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis adriamycin nephropathy. *kidney Int* 45:525-536, 1994.

The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *N Engl J Med.* 329:683-89, 1993.

Thompson N.L., Flanders, K.C., Smith J.M. et al :Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Specific Cells and Tissues of Adult and Neonatal Mice: The *Journal of Cell Biology*, 108,661-9, Feb. 1989.

Tomooka S, Border WA, Marshall BC, Noble NA. Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int* 42:1462-1469, 1992.

U.S Renal Data System: USRDS 1991. Annual Data Report. Bethesda, MD. The National Institute of health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. August 1991.

Viberti, G.C., Pickup, J.C., Jarrett, R. J. and Keen H.: Effect of control of blood glucose on urinary excretion of albumin and β_2 microglobulin in insulin-dependent diabetes. *The New England Journal of Medicine*. 300. 638-41 1979.

Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H: Microalbuminuria as a predictor of clinical proteinuria in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1:1430-32, 1982a.

Viberti GC, Mackintosh D, Bilou RW, Pickup JC, and Keen H: Proteinuria in diabetes mellitus. Role of spontaneous and experimental variation of glycemia. *Kidney Int* 21:714-20. 1982b.

Viberti GC, Mackintosh D, Keen H: Determinants of the penetration of proteins through the glomerular barrier in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 32 (Suppl. 2):92-95, 1983.

Viberti GC, Keen H, Wiseman MJ: Raised arterial pressure in parents of proteinuric insulin-dependent diabetics. *Br Med J* 295:515-517, 1987.

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB & Sporn MB: Transforming Growth Factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 5788-5792, 1987.

Webb C, Bohr, D.F: Recent advances in the pathogenesis of hypertension : Consideration of structural, functional, and metabolic vascular abnormalities resulting in elevated arterial resistance. *Am Heart J.* 102: 251, 1981.

Welsh M, Nielsen DA, Mackrell AJ, Steiner DF: Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II Regulation of insulin mRNA stability. *J Biol Chem* 260: 13590-13594, 1985.

Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y Kawamura T, Nyengaard JR, Van Den Enden M, Kilo C, Tilton RG: Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42:801-13.1993

Wiseman MJ, Saunders AJ, Keen H, Viberti GC: Effect of blood glucose control on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 312:617-21, 1985.

Wolf G, Sharma K, Chen Y, et al: High glucose induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . *Kidney Int* 42:647-656, 1992

Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E: Antibodies against transforming growth factor- β 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* 93:1173-1178, 1994.

Woods LL, Mizelle L, Hall J.E.: Control of Renal hemodynamics in hyperglycemia: possible role of tubuloglomerular feedback. *Am. J. Physiology* 252 (Renal Fluid Electrolyte Physiology 21) F65-f73, 1987.

World Health Organization Multinational Study of Vascular Disease in diabetes: Prevalence of small vessel disease in diabetic patients from 14 centres. *Diabetologia* 28:615-40, 1985.

Wu V, Wilson B, and Cohen, M.P.: Disturbances in Glomerular Basement Membrane Glycosaminoglycans in Experimental Diabetes. *Diabetes* 36:679-683, 1987.

Yamaguchi Y, Mann DM and Ruoslahti E. negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature Lond* 346:281-284, 1990.

Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, et al: Expression of transforming growth factor- β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90: 1814-1818, 1993.

Yoshida Y, Fogo A, Shiraga H, Gulk AD, Ichikawa I: Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation. *Kidney Int* 33:855-67, 1980.

Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, Okada M, Hino S, Miyamoto H, Maki S: Transforming Growth Factor- β protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. Laboratory investigation. *68: 154-163*, 1993.

Zatz R., Meyer T.W., Rennke E H.G. & Brenner B.M.: Predominance of haemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5963-5967, 1985.

Zatz R., Dunn BR, Meyer TW, et al: Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77:1925-1930, 1986.

Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP: High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* 259:F704-F714, 1990.

Ziyadeh FN, Simmons DA, Snipes ER, Goldfarb S: Effect of myo-inositol on cell proliferation and collagen transcription and secretion in proximal tubule cells cultured in elevated glucose. *J Am Soc Nephrol* 1:1220-1229, 1991.