

# A produção de catecolaminas pelo tecido renal e a cultura de células mesangiais é modulada diferencialmente pelo diabetes

Catecholamines production by kidney tissue and mesangial cell culture is differentially modulated by diabetes

## Autores

Roseli Peres Moreira<sup>1</sup>   
 Nadia S. C. Bertencello<sup>2</sup>   
 Juliana Almada Colucci<sup>1</sup>   
 Danielle Yuri Arita<sup>1</sup>   
 Maria Claudina Camargo de Andrade<sup>1</sup>   
 Fernanda Aparecida Ronchi<sup>1</sup>   
 Tatiana Sousa Cunha<sup>2</sup>   
 Dulce Elena Casarini<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, Disciplina de Nefrologia, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Ciência e Tecnologia, São Paulo, SP, Brasil.

Data de submissão: 04/11/2020.  
 Data de aprovação: 13/04/2021.

## Correspondência para:

Dulce Elena Casarini.  
 E-mail: casarini.elena@unifesp.br

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2020-0236>

## RESUMO

**Introdução:** Segundo a Federação Internacional de Diabetes, o número de pessoas com diabetes mellitus pode chegar a 700 milhões em 2045. As catecolaminas estão envolvidas na regulação de várias funções renais. Este estudo investiga os efeitos da hiperglicemia no metabolismo das catecolaminas no tecido renal de ratos controle, diabéticos e diabéticos tratados com insulina, tanto *in vivo* como *in vitro*. **Métodos:** Os ratos Wistar-Hannover machos foram randomizados em: grupos controle, diabéticos e diabéticos tratados com insulina. O diabetes foi induzido por uma única injeção de estreptozotocina, e o grupo diabético tratado também recebeu insulina. Após 60 dias, sangue e tecido renal dos grupos foram coletados para quantificação de catecolaminas e cultura de células mesangiais. **Resultados:** ratos diabéticos apresentaram peso corporal mais baixo, hiperglicemia, e aumento da ingestão de água e diurese. Ademais, o diabetes promoveu uma redução acentuada na depuração de creatinina comparado com o grupo controle. Quanto aos extratos de rim total, ambos os grupos diabéticos (tratados/não tratados) tiveram redução significativa na concentração de noradrenalina. Na cultura de células mesangiais, a concentração de catecolaminas foi menor no meio de cultura do que no compartimento intracelular para todos os grupos. Níveis médios de noradrenalina, adrenalina e dopamina estavam aumentados no grupo diabético. **Conclusão:** O principal achado deste estudo foi que 8 semanas de indução de diabetes alteraram o sistema catecolaminérgico renal de maneira muito específica, já que a produção de catecolaminas no tecido renal excisado de ratos diabéticos foi modulada diferencialmente comparada com produção e secreção por células mesangiais cultivadas.

**Descritores:** Diabetes Mellitus; Catecolaminas; Noradrenalina; Epinefrina; Dopamina.

## ABSTRACT

**Introduction:** According to the International Diabetes Federation, the number of people with diabetes mellitus may reach 700 million in 2045. Catecholamines are involved in the regulation of several kidney functions. This study investigates the effects of hyperglycemia on catecholamines' metabolism in kidney tissue from control, diabetic, and insulin-treated diabetic rats, both *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** Male Wistar-Hannover rats were randomized into: control, diabetic, and insulin-treated diabetic groups. Diabetes was induced by a single injection of streptozotocin, and diabetic treated group also received insulin. After 60 days, blood and kidney tissue from all groups were collected for catecholamines' quantification and mesangial cells culture. **Results:** diabetic rats had lower body weight, hyperglycemia, and increase water intake and diuresis. Additionally, diabetes promoted a sharp decrease in creatinine clearance compared to control group. Regarding the whole kidney extracts, both diabetic groups (treated and non-treated) had significant reduction in norepinephrine concentration. In mesangial cell culture, catecholamines' concentration were lower in the culture medium than in the intracellular compartment for all groups. Norepinephrine, epinephrine, and dopamine medium levels were increased in the diabetic group. **Conclusion:** The major finding of the present study was that 8 weeks of diabetes induction altered the kidney catecholaminergic system in a very specific manner, once the production of catecholamines in the excised kidney tissue from diabetic rats was differentially modulated as compared with the production and secretion by cultured mesangial cells.

**Keywords:** Diabetes Mellitus; Catecholamines; Norepinephrine; Epinephrine; Dopamine.



## INTRODUÇÃO

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, o número de pessoas com diabetes mellitus (DM) pode chegar a 700 milhões em 2045<sup>1</sup>. Este número é alarmante, pois o diabetes influencia a qualidade de vida e a expectativa de vida dos pacientes. Múltiplos esforços têm sido feitos na busca de um melhor entendimento da doença e, mais importante ainda, de suas complicações. Se não for mantida sob um controle rigoroso, a hiperglicemia leva a inúmeras doenças crônicas macro e microvasculares, incluindo acidente vascular cerebral, neuropatia, retinopatia e doença renal<sup>2</sup>. Dentre estas, a complicação mais prejudicial é a doença renal diabética, que representa uma grande preocupação de saúde pública mundial, independentemente do tipo de diabetes<sup>3</sup>.

A doença renal diabética é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes com diabetes e consiste de esclerose glomerular e fibrose causada pelas alterações metabólicas e hemodinâmicas associadas ao diabetes. Após um longo período de 'silêncio' com taxa normal de excreção urinária de albumina, o primeiro sinal clínico da doença aparece<sup>3</sup>. A presença de albuminúria patológica persistente superior a 300mg/24hrs (macroalbuminúria) acompanhada por creatinina plasmática anormalmente elevada ou taxa de filtração glomerular diminuída (TFG) determina doença renal diabética<sup>4</sup>. Histologicamente, a doença renal diabética manifesta-se como expansão mesangial difusa ou nodular, espessamento das membranas basais tubulares e glomerulares, bem como fibrose intersticial<sup>5</sup>.

As células mesangiais são os principais constituintes do glomérulo renal. Elas desempenham um papel crucial na regulação da TFG e participam no desenvolvimento de anormalidades glomerulares funcionais e morfológicas<sup>6</sup>. As células mesangiais correspondem a um terço da população de células glomerulares decapsuladas e permitem múltiplos papéis fisiológicos na função glomerular normal, como síntese e secreção da matriz extracelular. Além disso, fornecem estrutura e estabilidade à barreira de filtração e, ademais, são o alvo de uma grande variedade de hormônios e fatores de crescimento<sup>7</sup>. Este tipo de célula constitui um local potencial para a produção de catecolaminas, expressando todas as enzimas sintetizadoras e degradantes necessárias para a cascata de produção<sup>8</sup>.

As catecolaminas são hormônios bem conhecidos que desempenham um papel importante na regulação

de uma variedade de funções fisiológicas renais, como o metabolismo do sódio e da água e o controle da pressão arterial, e um conseqüente papel causador em várias doenças comuns, incluindo hipertensão, dislipidemia (síndrome metabólica), e diabetes<sup>9</sup>. Em vários modelos experimentais, o DM é induzido por estreptozotocina (STZ) que destrói seletivamente as células  $\beta$  da ilhota pancreática mimetizando o DM tipo 1 humano, resultando em deficiência de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria<sup>10</sup>. Este tipo de DM experimental é acompanhado por um aumento de catecolaminas no cérebro, coração e pâncreas<sup>11, 12</sup>. No rim, Marco et al. (2008)<sup>6</sup> mostraram que o DM induziu alterações nas catecolaminas em cultura de células mesangiais primárias de camundongos diabéticos não-obesos. Os autores observaram um aumento da produção/secreção de dopamina e noradrenalina em cultura de células mesangiais e tecido renal, o que poderia contribuir para o comprometimento da função renal. Os autores descreveram que o diabetes altera a produção de catecolaminas ao interferir tanto nas enzimas sintetizadoras quanto nas degradantes, sugerindo um possível papel das catecolaminas na patogênese de complicações renais agudas e crônicas do DM<sup>6</sup>.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o perfil das catecolaminas no tecido renal total e também na cultura de células mesangiais primárias obtidas de ratos Wistar controle e tratados com STZ que poderiam contribuir para o desenvolvimento de doença renal diabética.

## MATERIAL E MÉTODOS

### DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Todos os procedimentos experimentais seguiram as Diretrizes Institucionais para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, e os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, Brasil (CEP/UNIFESP – 0240/08).

### PROJETO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado para investigar os efeitos da hiperglicemia sobre as catecolaminas em tecido renal de ratos STZ-diabéticos e ratos STZ-diabéticos tratados com insulina, tanto *in vivo* como *in vitro*. Ratos Wistar-Hannover machos receberam uma única injeção de STZ para torná-los diabéticos e foram acompanhados durante 60 dias após o início do diabetes. Amostras de urina e sangue foram coletadas e o tecido renal foi removido. Os rins foram

usados para análise morfológica, quantificação de catecolaminas dos tecidos e cultura de células mesangiais. A concentração de catecolaminas foi determinada em cultura de células mesangiais a partir de ratos controle (CT), STZ-diabéticos (D) e STZ-diabéticos tratados com insulina (DT).

#### ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ratos Wistar-Hannover (n=8/grupo) com dois meses de idade, machos, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME), foram utilizados ao longo deste estudo, e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: controle (CT), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DT). Os animais foram alimentados com ração padrão de laboratório e receberam água da torneira *ad libitum* enquanto alojados (4-5 por gaiola) em uma sala com temperatura e umidade controladas (22°C e 60±5%), com um ciclo claro-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 7h da manhã) por 60 dias.

O diabetes foi induzido por uma única injeção de veia caudal de STZ após um jejum de 12 h (STZ, 60 mg/kg de peso corporal; Sigma, Chemical, St. Louis, MO); em tampão de citrato 0,01 M recém-preparado, pH 4,5<sup>13</sup>. Animais controle de mesma idade foram injetados apenas com tampão de citrato. Animais injetados com STZ foram autorizados a beber 5% de solução de glicose durante a noite para prevenir a mortalidade inicial por hipoglicemia induzida por drogas. Após esse período, os animais foram mantidos por 3 dias com livre acesso a comida e água. Os animais injetados com STZ exibiram glicosúria e hiperglicemia maciças dentro de poucos dias, e o diabetes foi confirmado medindo-se a concentração de glicose no sangue em jejum, 4 dias após a injeção do medicamento. A glicemia de jejum foi determinada em amostras de sangue obtidas por punção da cauda, usando um glicosímetro operado por fita (Accu-Check® Sensor, Roche, Suíça), e ratos com uma glicemia plasmática de jejum superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos. Ratos DT começaram a receber 2 UI (diariamente) de insulina *Neutral Protamine Hagedorn* (NPH Humulin® N, Eli Lilly Laboratory and Company, Brasil)<sup>13</sup> após 4 dias da injeção de STZ.

#### GAIOLAS METABÓLICAS E COLETA DE AMOSTRAS

Na semana 8 do protocolo experimental, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas individuais.

Após 1 dia de adaptação, mediu-se a ingestão de água e comida, bem como o volume de urina de 24 h. A urina foi coletada e centrifugada a 3.000 rpm, a glicose, o pH e a densidade foram determinados qualitativamente usando fitas disponíveis comercialmente, e seus níveis foram classificados com base nos detalhes fornecidos pelo fabricante (Fitas Reagentes de Urina 10 Labor Strips-URS10®, TECO Diagnostics, EUA)<sup>14</sup>.

Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina (100 mg/kg)/ xilazina (12 mg/kg). Amostras de sangue e rins esquerdos foram coletadas e armazenadas a -80°C até o dia da avaliação da creatinina e catecolaminas. Os rins direitos foram removidos para cultura de células mesangiais primárias.

#### TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

Mediu-se a proteína total da urina (Reagente de Ensaio de Proteína BioRad, BioRad Laboratórios, Hercules, CA) em alíquotas de urina coletadas conforme descrito acima<sup>15</sup>. A TFG foi estimada pela depuração de creatinina. A creatinina foi medida em amostras de urina e plasma pelo método Jaffe utilizando o kit Creatinina K® (Labtest Diagnostica, Brasil)<sup>16</sup>.

#### CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MESANGIAIS

As células mesangiais (CM) foram obtidas como resultado do crescimento externo de glomérulos de rato, isoladas por peneiramento diferencial, como descrito anteriormente por nosso grupo<sup>17,18</sup>. Em resumo, os glomérulos foram isolados do rim por meio de uma técnica de peneiramento gradual com malhas de aço inoxidável e nylon em condições estéreis. Culturas primárias de células mesangiais de ratos CT, D e DT foram estabelecidas por plaqueamento de glomérulos isolados (300 glomérulos/cm) em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA)<sup>19</sup> contendo 20% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (50 U/mL), HEPES (15 mM), glutamina (2 mM), e D-glicose (5 mM). As células puderam crescer a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar em frascos de cultura celular. O meio de cultura foi substituído a cada 36 h. Após 3 semanas, as células foram colhidas com tripsina e as subculturas foram cultivadas no mesmo meio de cultura. As células foram utilizadas entre a terceira e quinta subcultura e caracterizadas por métodos clássicos, usando os seguintes critérios: aspecto morfológico de células estreladas, coloração de imunofluorescência da matriz

extracelular para colágeno tipo IV e fibronectina, coloração negativa de imunofluorescência para antígenos fator VIII humano (células endoteliais glomerulares) e citoqueratina (células epiteliais parietais), e coloração positiva de imunofluorescência para actina e miosina.

Na subconfluência, as culturas de células mesangiais de todos os grupos foram semeadas e mantidas no meio de cultura indicado acima. Após 72 h, as células foram enxaguadas duas vezes com PBS e o meio de cultura foi substituído por um meio sem SFB, para manter as células na fase G0 do ciclo celular. O meio de cultura foi então coletado nas últimas 24 h e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. As células foram enxaguadas com PBS, lisadas com tampão Tris-HCl de 1 mM, pH 7,5, e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. A concentração de catecolaminas no lisado celular e no meio de cultura foi determinada por CLAD, como descrito abaixo.

#### QUANTIFICAÇÃO DAS CATECOLAMINAS

Rins inteiros foram homogeneizados em 15 mL de ácido perclórico 0,1 M,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (metabissulfito de sódio) e 10  $\mu\text{L}$  de dihidroxibenzilamina padrão interno (DHBA) (1 mM). Os homogenatos foram mantidos refrigerados durante a noite e centrifugados a 12.000 rpm por 50 minutos. As catecolaminas foram extraídas do meio de cultura (2 mL) e lisados celulares (0,8 mL) usando  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (alumina) e DHBA. As catecolaminas de tecido renal e culturas de células mesangiais (meio de cultura e lisado celular) foram medidas por cromatografia de fase reversa de par iônico acoplada à detecção eletroquímica (0,5 v), como descrito por Di Marco et al<sup>8</sup>. A separação isocrática rápida foi obtida utilizando um cátion F micron RP 18 Aquapore, Coluna Brownlee (Applied Biosystems, San Jose, CA) (4,6x250 mm) eluída com a seguinte fase móvel: 0,02 M de fosfato dibásico de sódio, 0,02 M de ácido cítrico, pH 2,64, 10% de metanol, 0,12 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  e 566 mg/L de ácido heptanossulfônico. A análise total da amostra durou 30 min. Os níveis de catecolaminas encontrados em homogenatos celulares, bem como no meio de cultura correspondente, foram normalizados pelo conteúdo de proteína intracelular.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média  $\pm$  EP. As diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância unilateral (ANOVA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$  comparando os grupos CT, D, e DT.

## RESULTADOS

### ESTUDO *IN VIVO*

A Tabela 1 mostra que os animais D apresentaram uma redução no peso corporal em relação aos grupos CT (266,90 vs 317,50 g) e DT (266,90 vs 298,00 g). A glicemia em D atingiu níveis tão altos quanto 3 vezes os do grupo CT (371,40 vs 113,40 mg/dL) e o tratamento com insulina conseguiu trazer a glicemia de volta à faixa normal (371,40 vs 114,50 mg/dL).

**TABELA 1** PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DOS GRUPOS CONTROLE (CT), DIABÉTICO (D) E DIABÉTICO TRATADO (DT)

	CT	D	DT
<b>Peso corporal (g)</b>	317,50 $\pm 2,00$	266,90 $\pm$ 2,70*	298,00 $\pm 1,10\#$
<b>Glicose no sangue (mg/dL)</b>	113,40 $\pm 0,60$	371,40 $\pm$ 11,40*	114,50 $\pm 1,00\#$

Os valores são média  $\pm$  EP. \* $p < 0,05$  vs CT; # $p < 0,05$  vs D; n=6.

Usamos gaiolas metabólicas para avaliar diferentes parâmetros fisiológicos e metabólicos, como a ingestão de água e o débito urinário (Tabela 2). Os animais D tiveram um aumento de 3,5 vezes na ingestão de água quando comparados ao CT (109,30 vs 31,30 mL/dia) e 1,6 vezes comparados ao grupo DT (109,30 vs 66,50 mL/dia). Com relação à excreção urinária, os ratos D apresentaram uma diurese significativamente maior quando comparados aos CT (90,00 vs 14,70 mL/dia), que foi parcialmente revertida no grupo DT (90,00 vs 44,50 mL/dia).

A proteinúria e a depuração de creatinina também foram afetadas pelo diabetes. Um aumento significativo na proteinúria foi observado em ambos os grupos de diabéticos, D e DT (27,9  $\pm$  3,00 e 19,50  $\pm$  3,10 mg/24hs respectivamente) em comparação com o grupo CT (13,6  $\pm$  1,00 mg/24hs). Para a depuração de creatinina, enquanto os grupos CT e DT apresentaram valores normais (2,20 e 2,07 mL/min respectivamente), o grupo D teve uma diminuição acentuada neste parâmetro (0,80 mL/min). A relação proteína / creatinina urinária (rP/C), utilizada para avaliar lesão aos glomérulos quando ainda não há evidência clínica, demonstrou que o grupo D apresentou este parâmetro aproximadamente duas vezes mais alto do que para os grupos CT e DT (rP/C: 1,61; 2,95 e 1,70 para CT, D e DT respectivamente). Tanto D como DT também mostraram diminuição no pH urinário (CT= 7,90; D=6,80; DT=6,90) e aumento da glicose urinária (CT=negativo; D>1000; DT<600 mg/dL) quando comparado com o grupo controle (Tabela 2).

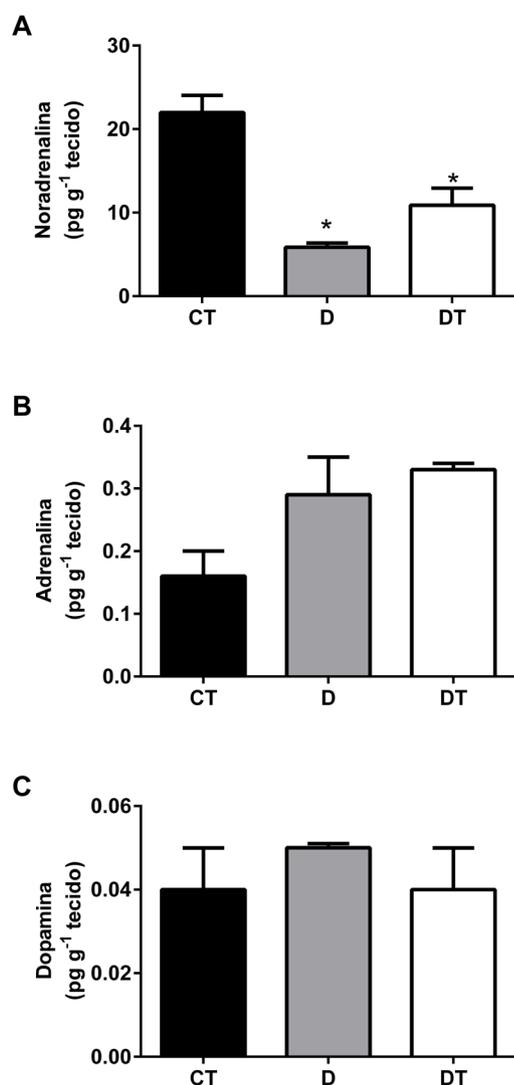
A Figura 1 mostra o conteúdo das catecolaminas em extratos de rim inteiro. Ambos os grupos D

**TABELA 2** PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DOS GRUPOS CONTROLE (CT), DIABÉTICO (D) E DIABÉTICO TRATADO (DT) DE GAIOLAS METABÓLICAS

	CT	D	DT
<b>Ingestão de água em 24 horas (mL/dia)</b>	31,30 ± 1,80	109,30 ± 16,00*	66,50 ± 6,70*
<b>Débito urinário em 24 horas (mL/dia)</b>	14,70 ± 1,50	90,00 ± 12,40 *	44,50 ± 6,90*#
<b>Proteína total da urina (mg/24hs)</b>	13,60 ± 1,00	27,90 ± 3,00*	19,50 ± 3,10
<b>Depuração de creatinina (mL/min)</b>	2,20 ± 0,30	0,80 ± 0,10*	2,10 ± 0,20#
<b>pH da urina</b>	7,90 ± 0,20	6,80 ± 0,20*	6,90 ± 0,20*
<b>Glicose na urina (mg/dL)</b>	Negativo	> 1000	< 600

Os valores são média ± EP. \* $p < 0,05$  vs CT; # $p < 0,05$  vs D;  $n = 6$ .

**Figura 1.** Quantificação de catecolaminas nos extratos de rim total de ratos Wistar. Noradrenalina (1A), adrenalina (1B), e dopamina (1C). Todos os valores são médias ± EP,  $n = 6$ , \* $p < 0,05$  vs CT. Grupos: CT - controle; D - diabético; DT - diabético tratado.



e DT apresentaram uma redução significativa nos níveis de noradrenalina (CT=21,98±2,06; D=5,86±0,6\*; DT=10,88±2,06\*  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$  homogenato

renal,  $p < 0,05$ ) como visto na Figura 1A. Adrenalina renal (CT=0,16±0,04; D=0,29±0,06; DT=0,33±0,01  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$  homogenato renal) e concentrações de dopamina (CT=0,04±0,01; D=0,05±0,001; DT=0,04±0,01  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$  homogenato renal) não foram diferentes entre os grupos.

#### CULTURA DE CÉLULAS MESANGIAIS

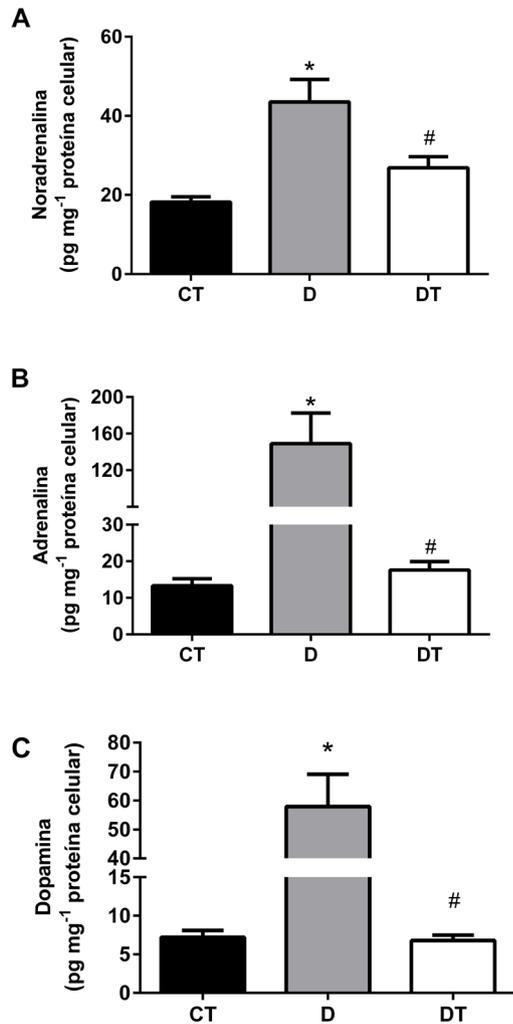
Os níveis de catecolaminas foram significativamente mais baixos no meio de cultura do que no compartimento intracelular nos três grupos (CT, D e DT). O diabetes aumentou a concentração de noradrenalina, adrenalina e dopamina no meio de cultura do grupo D (43,50±5,70; 149,00±33,60 e 57,90±11,20  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína celular respectivamente,  $p < 0,05$ ) em comparação com os grupos CT (18,20±1,30; 13,30±1,90 e 7,20±0,90  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$  proteína celular, respectivamente,  $p < 0,05$ ) e DT (26,90±2,80; 17,60±2,3 e 6,80±0,70  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína celular, respectivamente,  $p < 0,05$ ).

No lisado celular, a adrenalina e a dopamina foram aumentadas nos grupos D (269,60±21,9 e 189,10±48,70  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína celular, respectivamente,  $p < 0,05$ ) em comparação com os grupos CT (62,60±9,30 e 39,10±7,60  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína celular, respectivamente,  $p < 0,05$ ) e DT (82,50±9,00 e 38,80±7,50  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína celular, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, o conteúdo intracelular de noradrenalina não foi diferente entre os grupos D (139,40±41,10), CT (117,30±9,90), e DT (63,50±6,50  $\text{g}^{-1}$  proteína celular,  $p < 0,05$ ) como mostrado nas Figuras 2 e 3.

#### DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi que 8 semanas de diabetes alteraram o sistema catecolaminérgico renal de uma maneira muito específica, uma vez que a produção de catecolaminas por tecido renal excisado de ratos STZ-diabéticos é

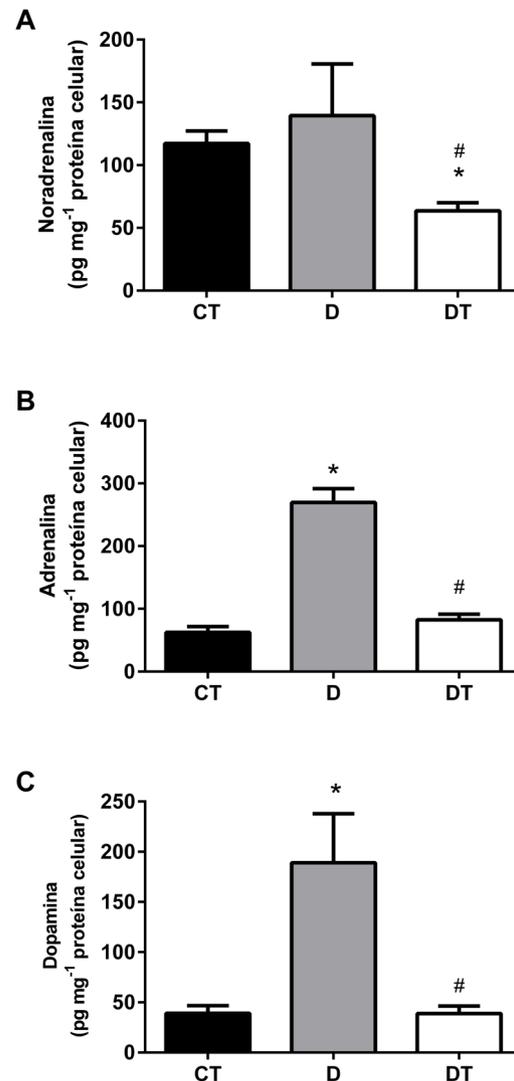
**Figura 2.** Quantificação de catecolaminas no compartimento extracelular de CM (meio) de ratos Wistar. Noradrenalina (2A), adrenalina (2B), e dopamina (2C). Todos os valores são média  $\pm$  EP,  $n = 6$ , \* $p < 0,05$  vs CT; # $p < 0,05$  vs D. Grupos: CT - controle; D - diabético; DT - diabético tratado.



diferenciadamente modulada em comparação com a produção e secreção por células mesangiais cultivadas.

Embora o rato STZ-diabético desenvolva lesões características semelhantes àsquelas encontradas na doença renal diabética humana, este modelo animal não desenvolve hipertensão, o que o torna um bom modelo para avaliar os efeitos da hiperglicemia em si. De fato, em um estudo anterior de nosso grupo utilizando o mesmo modelo animal e protocolo de tratamento, Ronchi et al. demonstraram que ratos STZ tratados ou não com insulina, não apresentam aumento da pressão arterial<sup>13</sup>. Esta adaptação também foi observada anteriormente e, em alguns casos, os autores descrevem uma diminuição na pressão arterial<sup>20</sup>. A ausência de hipertensão neste modelo nos permitiria focar nos efeitos metabólicos do diabetes sobre a função renal e a produção de

**Figura 3.** Quantificação de catecolaminas no compartimento intracelular de CM primárias (lisadas) de ratos Wistar. Noradrenalina (3A), adrenalina (3B) e dopamina (3C). Todos os valores são média  $\pm$  EP,  $n = 6$ , \* $p < 0,05$  vs CT; # $p < 0,05$  vs D. Grupos: CT - controle; D - diabético; DT - diabético tratado.



catecolaminas, independentemente dos efeitos da hipertensão sistêmica.

Neste modelo animal observamos diferenças marcantes nos biomarcadores urinários da doença renal diabética, tais como um aumento na excreção de proteína total e uma importante diminuição na depuração de creatinina. É importante mencionar que os animais STZ exibem proteinúria progressiva e uma diminuição precoce da função renal. Por outro lado, eles apresentam alterações histológicas, incluindo glomérulos e as lesões tubulointersticiais, somente após 3-6 meses de diabetes. Tal fato está de acordo com um estudo anterior de nosso grupo, utilizando o mesmo modelo animal, onde Ronchi et al. (2007)<sup>13</sup> não encontraram nenhuma alteração

estrutural analisando a histologia renal de animais diabéticos durante o desenvolvimento inicial da doença<sup>23</sup>. Isto também é sustentado por outros estudos, mostrando que animais STZ podem ser resistentes ao desenvolvimento de danos renais histológicos<sup>23</sup>. No entanto, é importante mencionar que alterações patológicas estruturais associadas à doença renal diabética, incluindo a deposição de matriz extracelular, espessamento da membrana basal glomerular, ativação de vias proliferativas, atrofia tubular e albuminúria leve a moderada, foram descritas em animais STZ, 6 meses após a indução do diabetes<sup>24,25</sup>.

O modelo animal STZ é útil para elucidar o mecanismo associado à patogênese precoce da doença renal diabética<sup>25</sup> considerando que são necessários apenas alguns dias para que a hiperglicemia comece a regular positivamente as vias que levam a esta complicação<sup>26</sup>. Neste estudo, a alteração da filtração glomerular de animais diabéticos associada à poliúria caracteriza o estágio inicial da doença renal diabética<sup>13,27</sup>.

Várias linhas de evidência sugeriram que um estado precoce de desequilíbrio entre a via do óxido nítrico (ON) e o sistema renina-angiotensina (SRA)<sup>28</sup> que leva a um aumento da atividade do sistema nervoso simpático periférico está implicado na patogênese de disfunções renais que acompanham o DM<sup>27,29-31</sup>. Além disso, a angiotensina II como principal efector do SRA e um potente vasoconstritor, leva à liberação de catecolaminas da medula adrenal e terminações nervosas pré-juncionais, predispondo à hipertensão associada ao DM<sup>31</sup>. Di Marco et al. (2008)<sup>6</sup> usaram células mesangiais de ratos diabéticos não-obesos e seus resultados sugeriram uma implicação do diabetes tanto nas enzimas de catecolaminas sintetizadoras como nas degradantes, sugerindo um possível papel desses componentes na patogênese das complicações renais agudas e crônicas do DM.

Na verdade, a noradrenalina circulante é aumentada em pessoas com diabetes ou hipoglicemia mal controlados<sup>32</sup>. Por outro lado, tem sido relatado que os níveis de catecolaminas plasmáticas estão diminuídos<sup>32,33</sup>, ou inalterados<sup>11,34</sup> em resposta ao diabetes. Embora existam informações, a validade de inferências sobre a atividade do sistema nervoso simpático no diabetes com base apenas nas catecolaminas plasmáticas circulantes é questionável, uma vez que os níveis plasmáticos das aminas não

representam necessariamente a atividade simpática específica do tecido<sup>35</sup>.

Além das controvérsias sobre os níveis circulantes de catecolaminas em resposta ao diabetes, há também discrepâncias em relação à concentração de catecolaminas teciduais que parecem depender do modelo animal, gravidade e duração do diabetes<sup>32,36</sup>. Em um estudo anterior, nosso grupo demonstrou que homogenatos renais inteiros de ratos diabéticos não-obesos (NOD) apresentam aumento na produção e secreção de noradrenalina em comparação com NOD normoglicêmicos e ratos suíços<sup>6</sup>. Entretanto, Fushimi et al. (1988)<sup>37</sup> relataram que, como a duração do estado diabético se prolonga em ratos, há uma diminuição gradativa proporcional ao tempo na resposta de catecolaminas plasmáticas<sup>36</sup>. Giachetti (1978)<sup>38</sup> também descreveu, usando os ratos db/db, que dependendo da duração do diabetes, a concentração de noradrenalina renal não é influenciada ou é reduzida em resposta ao diabetes<sup>38</sup>, e este tipo de alteração também foi observada no tecido cardíaco de ratos diabéticos<sup>39,40</sup>. Isto é semelhante ao curso clínico observado em diabéticos humanos, que também inclui uma redução de excreção de catecolaminas após o aparecimento da neuropatia autônoma. Em pacientes diabéticos com neuropatia autonômica, a concentração de noradrenalina plasmática, utilizada como um índice de atividade nervosa simpática é baixa. Esta diminuição, no entanto, só é encontrada em pacientes com uma longa duração de diabetes com neuropatia autonômica clinicamente grave<sup>36</sup>.

Em resposta à hipoglicemia induzida por insulina em pacientes diabéticos com neuropatia autonômica, os níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina foram significativamente mais baixos do que em diabéticos sem neuropatia autonômica e indivíduos saudáveis. Estes resultados demonstram que a adrenalina e noradrenalina são afetadas em diabéticos com neuropatia autonômica em resposta à hipoglicemia induzida por insulina<sup>41</sup>. Além disso, alterações no sistema nervoso simpático decorrentes de complicações do DM levam a diferentes manifestações clínicas, tais como hipotensão postural e alterações em várias funções viscerais. Tem sido relatado que a neuropatia autonômica está relacionada ao aumento da mortalidade no DM tipo 1 e tipo 2 e que os pacientes com neuropatia autonômica diabética avançada possuem noradrenalina plasmática diminuída<sup>36</sup>. Como descrito por Granados et al. (2000)<sup>43</sup>, os níveis basais de noradrenalina estão diminuídos como

resposta ao frio em pacientes submetidos a essas alterações de temperatura e testes ortostáticos com neuropatia autonômica definida e grave, evidenciando uma resposta modulada pelo estresse. Nesse mesmo estudo, os níveis de adrenalina em pacientes diabéticos com e sem neuropatia autonômica não foram diferentes, sugerindo que a função adrenal não é alterada. Estes autores não encontraram associação dos níveis de glicose no sangue ou de hemoglobina glicada com a gravidade da neuropatia<sup>43</sup>.

No presente estudo, não foi possível determinar se a diminuição da concentração renal de noradrenalina foi uma consequência de neuropatia ou uma resposta protetora aos danos renais, considerando que o aumento da sensibilidade à noradrenalina tem sido descrito em rins diabéticos<sup>44</sup>. Ainda com relação à possível resposta protetora relacionada à redução da concentração de noradrenalina no tecido renal, como consequência da ativação simpática, a noradrenalina aumenta os níveis de glicose, piorando o estado metabólico animal<sup>45</sup>. É importante mencionar que a diminuição acentuada da concentração de catecolaminas no tecido renal também pode ser uma consequência de hipertrofia renal, não acompanhada de um aumento proporcional no conteúdo total de noradrenalina; assim, a concentração de amina (nanogramas por grama) é diminuída<sup>38</sup>. Uma análise mais detalhada dos dados relativos às concentrações renais de noradrenalina, adrenalina e dopamina mostra que o diabetes não induz uma diminuição proporcional nas três catecolaminas, sugerindo que a importante diminuição na concentração de noradrenalina está provavelmente relacionada a alterações na função do nervo adrenérgico periférico, que parece estar correlacionada com a gravidade da síndrome diabética experimental, como observado em estudos anteriores<sup>38</sup>.

Luippold et al. (2004)<sup>46</sup> relataram que a denervação renal crônica prévia à indução de DM induzido por STZ possuía uma ação renoprotetora considerável contra a hiperfiltração glomerular. Esses achados apoiam a visão de que os componentes adrenérgicos estão diretamente relacionados ao impacto sobre as funções renais e hemodinâmicas em DM não controlado. No contexto clínico, Feyz et al. (2020)<sup>47</sup> estudaram o efeito da denervação simpática renal em 60 pacientes hipertensos. O estudo concluiu que, apesar da redução significativa da pressão arterial, a denervação não promoveu alteração significativa nem nas catecolaminas nem nos componentes do

SRA. Entretanto, até o momento, os mediadores responsáveis, bem como os mecanismos subjacentes envolvidos na denervação simpática renal, não são completamente compreendidos.

Nosso grupo e outros demonstraram que a CM primária possui o maquinário biosintético necessário para produzir catecolaminas *in vitro*, sugerindo que elas podem atuar como um sistema hormonal parácrino/autócrino, contribuindo para a regulação da hemodinâmica glomerular e da microcirculação renal<sup>8,48</sup>. Considerando a importância da CM na manutenção da função glomerular, que as catecolaminas desempenham um papel causador na doença renal diabética<sup>49</sup>, e que os mecanismos subjacentes envolvidos nesta patologia não são completamente compreendidos, nosso grupo também demonstrou que a CM isolada de ratos NOD (DM tipo I) produziu e secretou níveis mais elevados de dopamina e noradrenalina, aumentando a atividade da tirosina hidroxilase e inibindo a atividade da monoamina oxidase<sup>6</sup>.

Aqui, descrevemos que a CM cultivada isolada de ratos STZ (lisado celular), produziu níveis mais elevados de noradrenalina, adrenalina e dopamina em comparação com o controle, e o tratamento com insulina foi capaz de reduzi-los. Por outro lado, a CM de ratos STZ diabéticos secretou maiores quantidades de adrenalina e dopamina, mas não de noradrenalina (meio de cultura), e este desequilíbrio foi corrigido pela insulina, demonstrando o importante papel da hiperglicemia no desenvolvimento destas alterações. É bem conhecido que a CM controla a função glomerular devido à sua capacidade de contrair e reduzir a área da superfície capilar glomerular, e sintetiza vários hormônios. A geração local dessas substâncias vasoativas pode alterar profundamente a função renal, independente de alterações hemodinâmicas sistêmicas<sup>6,50</sup>. No estado normal, a contração tônica por CM neutraliza a hipertensão intraglomerular para manter constante a TFG por autorregulação. Evidências do envolvimento da CM no DM foram apresentadas pela primeira vez por Iidaka et al. (1968)<sup>51</sup>, que mostraram que o mesângio era o sítio glomerular inicial associado à nefropatia diabética. Estudos subsequentes mostraram que, no estado diabético, a hiperfiltração surgiria como resultado se a CM não pudesse se contrair isométrica e isotonicamente para neutralizar a pressão intraglomerular. Assim, as evidências de uma série de modelos diabéticos sugerem que CM disfuncionais

são parcialmente responsáveis pela condição de hiperfiltração diabética. No entanto, é provável que não uma, mas várias vias de sinalização estejam envolvidas na resposta patológica da CM no diabetes.

Nossos resultados mostram um aumento acentuado da concentração e secreção de dopamina por CM cultivada, e este projeto de estudo nos permitiu mostrar pela primeira vez que, em resposta ao diabetes, a produção de dopamina por extrato tecidual renal é diferencialmente modulada em comparação com a produção por CM de ratos diabéticos. Esta diferença sugere um possível papel protetor da dopamina na CM, em resposta à progressão da doença renal no modelo animal STZ. De fato, tem sido descrito que o aumento dos níveis intrarrenais de dopamina inibiu a hiperfiltração, diminuiu os marcadores de estresse oxidativo e inibiu a infiltração de macrófagos, enquanto que a diminuição da produção intrarrenal de dopamina teve o efeito oposto. Na verdade, Marwaha et al. (2004)<sup>52</sup> mostraram que ratos diabéticos induzidos por STZ apresentam redução da função do receptor D1 de dopamina renal, o que, por sua vez, é devido a uma diminuição da expressão do receptor D1 de dopamina e a um defeito no acoplamento do receptor à proteína G. Os autores descrevem que esta anormalidade na expressão do receptor D1 juntamente com o acoplamento e função do receptor defeituoso da proteína G é parcialmente causada por hiperglicemia e pode contribuir para a retenção de sódio observada no diabetes tipo I. Na literatura, foi descrito que a dopamina desempenha um papel crucial na nefropatia diabética<sup>49</sup>.

Em resumo, mostramos que a administração de STZ produziu um aumento significativo no nível de glicose no sangue e redução do peso corporal, juntamente com outros sintomas típicos de diabetes, incluindo polidipsia, polifagia e poliúria, que foram parcialmente revertidos pelo tratamento com insulina. Com o início do diabetes, observou-se uma diminuição na depuração de creatinina, indicando o estabelecimento bem-sucedido de um modelo de doença renal diabética. Além disso, os resultados mostraram que 8 semanas de diabetes alteraram o sistema catecolaminérgico renal de maneira muito específica, uma vez que a produção de catecolaminas por tecido renal excisado de ratos diabéticos é modulada diferencialmente em comparação com a produção e secreção por CM cultivadas. A regulamentação desta cascata hormonal e sua potencial contribuição para o controle intrarrenal da função glomerular no diabetes não são completamente compreendidas. No entanto,

com as ferramentas genômicas e proteômicas tornando-se cada vez mais disponíveis, vários fatores de transcrição e reguladores estão sendo identificados em relação a esta via, o que poderia permitir uma maior compreensão da contribuição que as alterações nas catecolaminas celulares e teciduais representam na patogênese da doença renal diabética. Além disso, um melhor entendimento da fisiopatologia da doença renal associada ao diabetes ajudará no desenvolvimento de alvos de medicamentos novos e complementares. Finalmente, também gostaríamos de enfatizar a importância do modelo CM, uma vez que ele fornece um modelo conveniente para o estudo de síntese renal e liberação de catecolaminas carentes de contribuição neuronal.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela FAPESP, bolsas 2008/51552-5 e 2010/519049.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

DEC concebeu o projeto e obteve o apoio financeiro. DEC, TSC e RPM conceberam o desenho do experimento. RPM, JAC, DYA, MCCA e FAR realizaram experimentos. RPM e NSCB analisaram, interpretaram dados e escreveram o manuscrito com a contribuição de todos os autores. DEC e TSC supervisionaram a pesquisa.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declararam que não existe conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. International Diabetes Federation., *IDF Diabetes Atlas*. Ninth Edition ed. 2019.
2. Maric, C. and J.E. Hall, *Obesity, metabolic syndrome and diabetic nephropathy*. *Contrib Nephrol*, 2011. 170: p. 28-35.
3. Ezquer, M.E., et al., *MSC transplantation: a promising therapeutic strategy to manage the onset and progression of diabetic nephropathy*. *Biol Res*, 2012. 45(3): p. 289-96.
4. Eknoyan, G., et al., *Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK)*. *Am J Kidney Dis*, 2003. 42(4): p. 617-22.
5. Reeves, W.B., et al., *Therapeutic Modalities in Diabetic Nephropathy: Future Approaches*. *Open J Nephrol*, 2012. 2(2): p. 5-18.
6. Marco, G.S., et al., *Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(4): p. 747-54.
7. Abboud, H.E., *Mesangial cell biology*. *Exp Cell Res*, 2012. 318(9): p. 979-85.
8. Di Marco, G.S., et al., *Mesangial cells are able to produce catecholamines in vitro*. *J Cell Biochem*, 2003. 89(1): p. 144-51.
9. Zeng, C., et al., *The dopaminergic system in hypertension*. *Clin Sci (Lond)*, 2007. 112(12): p. 583-97.

10. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015 Sep 1;70:5.47.1-5.47.20.
11. Adeghate, E., et al., *Comparative morphology and biochemistry of pancreatic tissue fragments transplanted into the anterior eye chamber and subcutaneous regions of the rat*. *Eur J Morphol*, 2001. 39(5): p. 257-68.
12. Ganguly, P.K., et al., *Norepinephrine storage, distribution, and release in diabetic cardiomyopathy*. *Am J Physiol*, 1987. 252(6 Pt 1): p. E734-9.
13. Ronchi, F.A., M.C. Irigoyen, and D.E. Casarini, *Association of somatic and N-domain angiotensin-converting enzymes from Wistar rat tissue with renal dysfunction in diabetes mellitus*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2007. 8(1): p. 34-41.
14. Lerco, M.M., et al., *Experimental alloxan diabetes-induced: a model for clinical and laboratory studies in rats*. *Acta Cir. Bras.*, 2003. 18(2): p. 1-14.
15. Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem*, 1976. 72: p. 248-254.
16. Luiz Rda, S., et al., *Exercise attenuates renal dysfunction with preservation of myocardial function in chronic kidney disease*. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e55363.
17. Andrade, M.C., et al., *Purification and characterization of angiotensin I-converting enzymes from mesangial cells in culture*. *J Hypertens*, 1998. 16 (12 Pt 2): p. 2063-74.
18. Hadad, S.J., et al., *FK 506: effects on glomerular hemodynamics and on mesangial cells in culture*. *Kidney Int*, 1995. 48(1): p. 56-64.
19. Wolf, G., et al., *Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(6): p. 1585-93.
20. Dall'ago, P., et al., *Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats*. *Auton Neurosci*, 2007. 131(1-2): p. 28-35.
21. Cunha, T.S.; Ronchi, F.A.; Sakata, M.M.; Casarini, D.E. Exercise Training Reduces Kidney Angiotensin II Levels and Attenuates Renal Dysfunction in Animal Diabetic Nephropathy. *Follow journal Conference: 70th Annual Meeting of the American-Diabetes-Association*, 2010. Volume: 59.
22. Cunha, T.S.; Mendes, R.H.; Bertagnolli, M.; Viegas, V.; Mostarda, C.T.; Moderate exercise training reduces kidney oxidative stress and mortality of hypertensive diabetic rats *The FASEB Journal* 22, 753.4-753.4
23. Uil M, Scantlebery AML, Butter LM, Larsen PWB, De Boer OJ, Leemans JC, et al. Combining streptozotocin and unilateral nephrectomy is an effective method for inducing experimental diabetic nephropathy in the “resistant” C57Bl/6J mouse strain. *Sci Rep* 2018;8.
24. Umanath K, Lewis JB. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis* 2018;71:884–95.
25. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: Their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2016;9:279–90.
26. Ilyas Z, Chaiban JT, Krikorian A. Novel insights into the pathophysiology and clinical aspects of diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2017;1–8.
27. Silva, K., et al., *Progressive resistance exercise training attenuated renal damages, but did not improve Muscle Force in STZ-Induced Diabetic Rats*. *J Diabetes Metab*, 2014. 5:11.
28. Bertoncetto, N., et al., *Diabetic Nephropathy Induced by Increased Ace Gene Dosage Is Associated with High Renal Levels of Angiotensin (1-7) and Bradykinin*. *J Diabetes Res*, 2015. 2015: p. 674047.
29. Joles, J.A. and H.A. Koomans, *Causes and consequences of increased sympathetic activity in renal disease*. *Hypertension*, 2004. 43(4): p. 699-706.
30. Cunha TS, Arita DY, Watanabe IKM, Brandão JDP, Ribeiro LAFMS, Aragão DS, et al. Renal physiology and immune system: the role of renin-angiotensin system, nitric oxide and catecholamines. In: Casarini DE, Arita DY, Colucci JA, Cunha TS, eds. *New aspects of the renin angiotensin system in cardiovascular and renal diseases*. *Sharjah: Bentham Books*; 2016. p. 232-49.
31. Hsueh, W.A. and Wyne, K. (2011), *Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Diabetes and Hypertension*. *The Journal of Clinical Hypertension*, 13: 224-237.
32. Peschke, E., et al., *Catecholamines are the key for explaining the biological relevance of insulin-melatonin antagonisms in type 1 and type 2 diabetes*. *J Pineal Res*, 2012. 52(4): p. 389-96.
33. Heyman, E., et al., *Alteration in sympathoadrenergic activity at rest and during intense exercise despite normal aerobic fitness in late pubertal adolescent girls with type 1 diabetes*. *Diabetes Metab*, 2007. 33(6): p. 422-9.
34. Banthia, S., et al., *Detection of cardiovascular autonomic neuropathy using exercise testing in patients with type 2 diabetes mellitus*. *J Diabetes Complications*, 2013. 27(1): p. 64-9.
35. Adeghate, E., A.S. Ponery, and R. Sheen, *Streptozotocin-Induced diabetes mellitus is associated with increased pancreatic tissue levels of noradrenaline and adrenaline in the rat*. *Pancreas*, 2001. 22(3): p. 311-6.
36. Hilsted, J., *Catecholamines and diabetic autonomic neuropathy*. *Diabet Med*, 1995. 12(4): p. 296-7.
37. Fushimi, H., et al., *Impaired catecholamine secretion as a cause of diabetic autonomic neuropathy*. *Diabetes Res Clin Pract*, 1988. 4(4): p. 303-7.
38. Giachetti, A., *The functional state of sympathetic nerves in spontaneously diabetic mice*. *Diabetes*, 1978. 27(10): p. 969-74.
39. Svirglerova, J., et al., *Alteration of the cardiac sympathetic innervation is modulated by duration of diabetes in female rats*. *Exp Diabetes Res*, 2011. 2011: p. 835932.
40. Santos, R., et al., *Resistance Training Counteracts The Systemic Catecholaminergic Hyperactivation Associated With Experimental Diabetes, But Not Normalize Cardiac Sympathetic Outflow*. *Hypertension*, 2016: p. 68:AP633.
41. H Horie, T Hanafusa, T Matsuyama, M Namba, K Nonaka, S Tarui, A Yamatodani, H Wada. Decreased response of epinephrine and norepinephrine to insulin-induced hypoglycemia in diabetic autonomic neuropathy. *Horm Metab Res* 1984 Aug;16(8):398-401.
42. Töyry JP, Niskanen LK, Mäntysaari MJ, Länsimies EA, Uusitupa MI. Occurrence, predictors, and clinical significance of autonomic neuropathy in NIDDM. Ten-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes*. 1996 Mar;45(3):308-15.
43. G. Granados, M.E. Garay-Sevilla, J.M. Malacara, K. Wróbel-Zasada, A. Rivera-Cisneros. Plasma epinephrine and norepinephrine response to stimuli in autonomic neuropathy of type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* (2000) 37:55-60
44. Salman, I.M., et al., *Renal sympathetic nervous system hyperactivity in early streptozotocin-induced diabetic kidney disease*. *NeuroUrol Urodyn*, 2011. 30(3): p. 438-46.
45. Gerich, J.E., C. Meyer, and M.W. Stumvoll, *Hormonal control of renal and systemic glutamine metabolism*. *J Nutr*, 2000. 130(4S Suppl): p. 995S-1001S.
46. Luippold, G., M. Beilharz, and B. Muhlbauer, *Chronic renal denervation prevents glomerular hyperfiltration in diabetic rats*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. 19(2): p. 342-7.
47. Lida Feyz 1, Sjoerd van den Berg 2, Robert Zietse 3, Isabella Kardys 1, Jorie Versmissen 3, Joost Daemen 1 Effect of renal denervation on catecholamines and the renin-angiotensin-aldosterone system; *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2020;21(3):1470320320943095.
48. Arita, D.Y., et al., *Purification and characterization of the active form of tyrosine hydroxylase from mesangial cells in culture*. *J Cell Biochem*, 2002. 87(1): p. 58-64.
49. Pfeil, K., T. Staudacher, and G. Luippold, *Effect of L-dopa decarboxylase inhibitor benserazide on renal function in streptozotocin-diabetic rats*. *Kidney Blood Press Res*, 2006. 29(1): p. 43-7.
50. Zhang, M.Z., et al., *Intrarenal dopamine inhibits progression of diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2012. 61(10): p. 2575-84.
51. Iidaka, K., J. McCoy, and P. Kimmelsteil, *The glomerular mesangium. A quantitative analysis*. *Lab Invest*, 1968. 19(6): p. 573-9.
52. Marwaha, A., A.A. Banday, and M.F. Lokhandwala, *Reduced renal dopamine D1 receptor function in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 286(3): p. F451-7.