

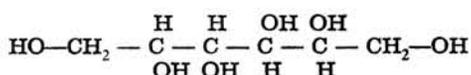
# PAPEL DA DIURESE OSMÓTICA POR MANITOL NA EXPANSÃO DO VOLUME EXTRACELULAR EM RATOS E OBTENÇÃO DO RÍTMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR POR UM MÉTODO QUE DISPENSA COLETA DE URINA

(Ganhador do Prêmio Oswaldo Cruz — Área Básica)

Fumio Miasiro \*

## I. INTRODUÇÃO

O manitol é um derivado da glicose por redução eletrolítica, seu peso molecular é de 182,17. Sua fórmula química e estrutural são as seguintes:  $C_6H_{14}O_6$ .



Reabsorção proximal de água (isosmótica).

Como é sabido, a maior parte da água filtrada, ao nível do glomérulo renal, é reabsorvida ao longo dos túbulos renais, sendo eliminada na urina somente uma fração muito reduzida. Esta reabsorção renal de água pode ser estudada nos diferentes segmentos do nefron, principalmente através de dois tipos de medida. A primeira é a determinação da concentração de inulina, tomando-se como valor de referência a concentração glomerular ou, o que é equivalente, a plasmática. Deste modo podemos calcular o volume de água reabsorvido ao longo dos vários segmentos. Assim, a razão F/P de inulina, igual a 1 no glomérulo, se eleva até cerca de 3 no fim do túbulo proximal, ou melhor, de sua porção acessível à punção a partir da superfície cortical que corresponde em média a cerca de 65% do seu comprimento total. Isto significa que até este local ocorreu a reabsorção de 2/3 do fluido filtrado, permanecendo na luz tubular ainda 1/3, que, pelo fato de ainda conter a totalidade da inulina filtrada vai apresentar concentração três vezes maior que ao nível do glomérulo.

Outro importante meio para conhecer os mecanismos de reabsorção de água é a medida da pressão osmótica, ou osmolaridade do fluido tubular, pois esta é que irá indicar os gradientes ao longo dos quais se movimentará a água. Foi verificado por Gottschalk e cols.<sup>1</sup> que a osmolaridade ao longo do túbulo proximal sempre se mantém idêntica à do plasma, independentemente das condições do animal e da osmolaridade fi-

nal da urina. Portanto, no túbulo proximal o transporte de fluido é isosmótico, isto é, ocorre transferência de fluido entre dois compartimentos de osmolaridade igual. Esta transferência é estritamente dependente do transporte ativo de sódio, pois quando este cessa, cessa também o movimento de água.

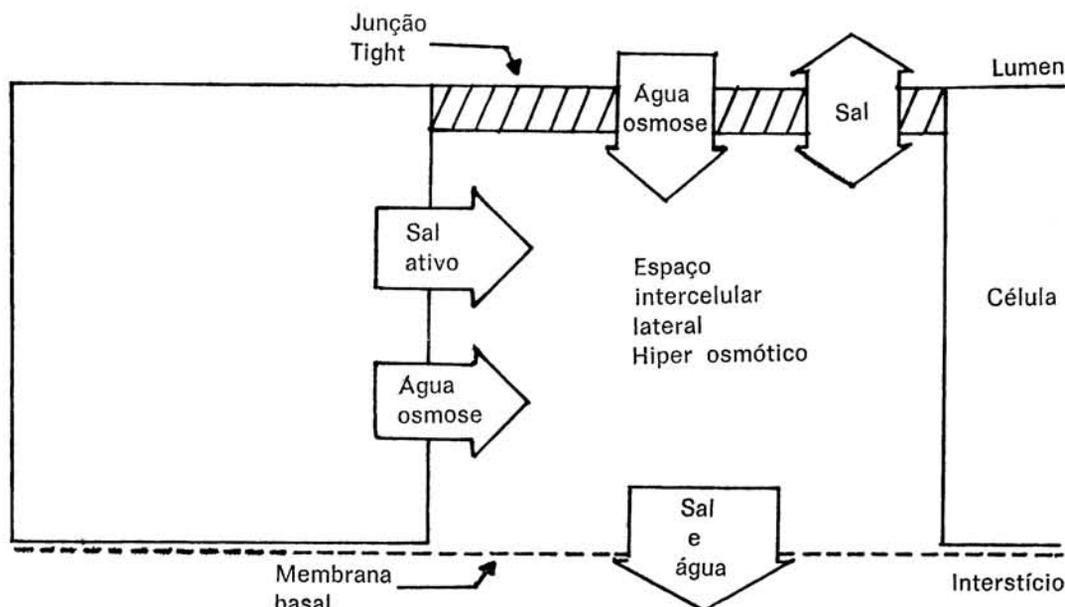
Se o transporte de água através do túbulo proximal for realmente um transporte passivo, deve dar-se a favor de um gradiente de pressão osmótica. Este gradiente, entretanto, não pôde ser detectado pois, mesmo medidas bastante precisas não conseguiram demonstrar diferença significativa de osmolaridade entre fluido e plasma. Surgiu então a necessidade de explicar um fluxo passivo de água entre dois compartimentos de igual osmolaridade, o que levou ao estabelecimento de uma hipótese proposta por Curran e McIntosh<sup>2</sup> baseada na existência de um compartimento intermediário que seria hipertônico. Existiram portanto, três compartimentos.

Transferindo as idéias deste modelo para membranas biológicas, pode-se supor que o compartimento 1, isotônico, seja correspondente à luz tubular e ao interior celular; a membrana entre 1 e 2, à membrana celular peritubular, impermeável ao sódio, mas que transporta NaCl para o compartimento 2, tornando-o hipertônico. O compartimento 2 seria o espaço existente entre a membrana peritubular e a membrana basal. A membrana entre 2 e 3 seria a membrana basal, que é livremente permeável a água e a sais, e o compartimento 3 corresponderia ao interstício e plasma contido nos capilares peritubulares. É bastante evidente que o último compartimento realmente possa ser considerado infinitamente grande, já que sua constituição vai ser mantida constante às custas de sua continuidade com o resto do espaço extracelular do organismo. Como o compartimento 2 é muito pequeno e a membrana basal é pouco distensível, o fluido passa do compartimento 2 para o 3 por gradiente de pressão hidrostática.

Mecanismo de diurese do manitol

Vários estudos demonstraram que a concentração de sódio ao longo do túbulo proximal é normalmente

\* Acadêmico do 4.º ano da F.M.U.S.P.



Esquema demonstrando como se dá a reabsorção isosmótica de fluido pelo túbulo renal. (Brenner, B. M. e Rector, F. C. Jr. *The Kidney*, vol. I, pag. 277).

igual à do plasma em toda sua extensão. Quando entretanto se infunde manitol ou outra substância filtrável e pouco reabsorvível, no animal em estudo, a concentração de sódio intraluminal se torna menor que a plasmática, caindo a cerca de 80 a 100 mEq/l. O fluido tubular, por outro lado, continua isotônico ao plasma sendo, o sódio reabsorvido, substituído pelo manitol, cuja, concentração cresce ao longo do túbulo.

A explicação para esse fenômeno é a seguinte: normalmente, o sódio é o principal íon do fluido tubular, sendo com, o cloro, o responsável praticamente exclusivo da osmolaridade desse fluido. Portanto, à medida que o NaCl é reabsorvido, também haverá a reabsorção de água, já que a parede do túbulo proximal não tem a capacidade de manter um gradiente de pressão osmótica. Se, porém tivermos no fluido tubular um outro soluto, osmoticamente ativo mas não reabsorvível, este será concentrado na luz tubular à medida que cai a concentração de NaCl. Sendo o transporte de sódio um movimento contra gradiente de potencial eletroquímico, ativo, a queda da concentração luminal de sódio vai dificultar este transporte, tendendo-se ao estabelecimento de um gradiente de concentração que a bomba de sódio não pode mais vencer. Reduz-se então a reabsorção de sódio, e temos o que se chama diurese osmótica, isto é, uma grande elevação do fluxo urinário devido à presença na luz tubular de uma substância não reabsorvível.

Portanto, a infusão de manitol e outros diuréticos osmóticos, aumenta igualmente a osmolaridade do plasma e do fluido tubular proximal<sup>3,4</sup>, porém ocorrendo uma diminuição na concentração de sódio no fluido tubular proximal. A reabsorção de Na<sup>+</sup> ocorre contra um gradiente eletroquímico transepitelial aumentado, o qual pode retardar a reabsorção ativa de sódio<sup>5</sup>. Embora esse mecanismo tenha sido amplamente aceito<sup>6</sup>, alguns estudos sobre metabolismo energético renal não são compatíveis com essa hipótese: a diurese por manitol, não modifica o consumo de O<sub>2</sub> antes<sup>7</sup> ou após administração de ácido etacrínico<sup>8</sup>, e a produção de calor na porção cortical ou medular externa não varia durante a

diurese por manitol<sup>9</sup>. Esses dados sugerem que o manitol inibe o transporte de sódio que não requer energia (passivo).

Após inibição da reabsorção transcelular de NaCl na porção distal do néfron por ácido etacrínico, variações na reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> estão associadas com variações de reabsorção de NaCl<sup>10</sup>. Para cada mol de NaHCO<sub>3</sub>, aproximadamente 2 moles de NaCl são reabsorvidos. Foi proposto então que, a reabsorção de NaHCO<sub>3</sub> através das células proximais, provenha a força osmótica principal para a reabsorção de H<sub>2</sub>O e NaCl ao longo da via paracelular. Esse acoplamento entre reabsorção transcelular de NaHCO<sub>3</sub> e reabsorção paracelular de NaCl é responsável pela relação linear entre reabsorção de Na<sup>+</sup> e RFG (balanço glomerular tubular)<sup>10</sup>. Um estudo recente sobre metabolismo energético renal apoiou o conceito de uma reabsorção passiva de NaCl dependente da reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> através do epitélio tubular proximal<sup>11</sup>.

Solutos poucos reabsorvíveis, como o manitol, enfraqueceriam a reabsorção de H<sub>2</sub>O e NaCl no túbulo proximal, mesmo em condições de reabsorção constante de NaHCO<sub>3</sub>. O balanço glomérulo-tubular seria mantido, porém para cada mol de NaHCO<sub>3</sub> reabsorvido transcelularmente, menos água e menos que 2 moles de NaCl seriam reabsorvidos.

Para examinar esta hipótese, foram feitos experimentos em cães anestesiados após expansão do VEC e após inibição da reabsorção transcelular de NaCl por infusão contínua de ácido etacrínico, em doses que não afetam a reabsorção HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Sendo também o efeito da acetazolamida, um inibidor de anidrase carbônica, estudado durante a diurese por manitol, chegando a conclusões de que: é provável que o manitol iniba a reabsorção paracelular de água e NaCl no túbulo proximal por redução da força osmótica propulsora, ou seja, a redução da reabsorção de H<sub>2</sub>O aumenta a concentração de NaHCO<sub>3</sub> no fluido paracelular, tanto quanto a concentração de manitol aumenta no plasma e no filtrado glomerular. Portanto, ao longo do túbulo proximal, a força

osmótica resultante está progressivamente reduzida, sendo então a concentração de manitol, aumentada progressivamente, responsável pela redução da reabsorção de água e NaCl<sup>12</sup>.

#### Expansão isotônica do volume extracelular

A queda da reabsorção proximal de sódio representa um dos mais importantes mecanismos de defesa contra a expansão isotônica do volume extracelular, não só por ser grande o volume de fluido que escapa à absorção mas, igualmente, pelo fato da concentração osmolar desse fluido ser idêntica (isotônica) ao plasma.

Além da natriurese, é observada uma concomitante queda na reabsorção absoluta proximal (APR) em ratos submetidos à sobrecarga de salina<sup>22</sup>. Experimentos foram realizados em ratos, observando-se que essas respostas são mascaradas marcadamente quando a pressão de perfusão renal é imediatamente reduzida antes, porém não depois, da carga de volume<sup>23</sup>. Para encontrar o mecanismo responsável por essas diferenças entre o clameamento inicial da artéria renal (EC) e o tardio (LC), determinantes intracapilares e intersticiais responsáveis pela APR foram medidas em ratos antes e após sobrecarga de salina correspondendo a 8% do peso corporal. Nos animais com LC e expansão de volume, foi observado um declínio marcado na APR (em média 11 ± 1 nl/min), associado com um grande aumento na excreção urinária de sódio (em média 8 ± 2 µEq/min). Nos animais com EC e expansão do volume, as modificações na excreção de sódio (1 ± 0 µEq/min) e na APR (3 ± 1 nl/min) eram pequenas.

Desde que o coeficiente de reabsorção capilar peritubular e a diferença da pressão hidráulica transcáprilar média não se modificaram com a sobrecarga de salina nos animais com LC, a queda marcada da APR foi atribuída primariamente a uma grande queda na diferença de pressão oncótica transcáprilar peritubular média ( $\Delta\pi$ ).

A despeito de uma queda equivalente na  $\Delta\pi$  dos ratos com EC e expansão, a quase constante APR parece estar associada com um simultâneo e equivalente declínio na diferença de pressão hidráulica transcáprilar peritubular média (em consequência da queda da pressão persistente com a opinião de que as forças de Starling, são hidráulica capilar peritubular média), a qual efetivamente compensa a queda da  $\Delta\pi$ . Esses resultados demonstram a importância da pressão hidráulica dos capilares peritubulares na modulação da APR, e são consistentes com a opinião de que as forças de Starling através da microcirculação pós-glomerular têm um papel fundamental na determinação da APR<sup>13</sup>.

Além desses experimentos com ratos, foi examinado o efeito da expansão do volume extracelular nas forças de Starling transcáprilares, na reabsorção capilar e no coeficiente de reabsorção da microcirculação capilar peritubular de rins de cães. Os resultados mostram que a expansão do volume extracelular deprime significativamente a reabsorção capilar no cão e sugerem que a queda de reabsorção pode ser totalmente explicada por modificações das pressões transcáprilares e pela constância do coeficiente de reabsorção<sup>14</sup>.

#### Obtenção do clearance de inulina sem coleta de urina

A medida do ritmo de filtração glomerular pelo método do clearance de inulina comumente utilizado é muitas vezes impraticável em experimentos crônicos. Isso acontece em virtude desse método requerer cateterização da bexiga, coleta cuidadosa das amostras de urina, bem como infusão contínua de inulina. Por outro lado, as contínuas cateterizações da bexiga, necessárias para as

medidas do RFG em experimentos crônicos prolongados, podem provocar infecções na bexiga e/ou pielonefrites. Além disso, em situação de oligúria, os métodos de medida do RFG que requerem coleta de urina são impraticáveis.

No sentido de resolver alguns desses problemas, diferentes investigadores desenvolveram vários métodos de medida do RFG que empregam uma única dose de marcador. Destes, os dois mais conhecidos são: — o método de interceptação da inclinação da reta de desaparecimento da inulina plasmática<sup>13,16,17</sup> e o método que considera que a inulina se distribui em dois compartimentos<sup>16,17,18</sup>.

O primeiro desses métodos assume que, após uma única injeção intravenosa, o indicador é rapidamente distribuído em um só compartimento e que, depois de um período de tempo (de 60 a 80 minutos), o indicador está em equilíbrio entre o plasma e o fluido extracelular extravascular. O RFG é obtido pela equação:

$$RFG = Q k_1 / A$$

onde: Q = quantidade total de indicador injetado  
 $k_1$  = inclinação de reta de desaparecimento de inulina do plasma  
 A = concentração plasmática do indicador no tempo zero (obtida por extrapolação)

No segundo método de medida do RFG, é considerado que a curva de desaparecimento da inulina plasmática se distribui segundo duas exponenciais de acordo com a fórmula:

$$C = A e^{-k_1 t} + B e^{-k_2 t}$$

onde: C = concentração do indicador plasmático a um tempo t  
 A = interceptação do componente lento no tempo zero  
 $k_1$  = constante de velocidade do componente lento  
 $k_2$  = constante de velocidade do componente rápido  
 B = interceptação do componente rápido

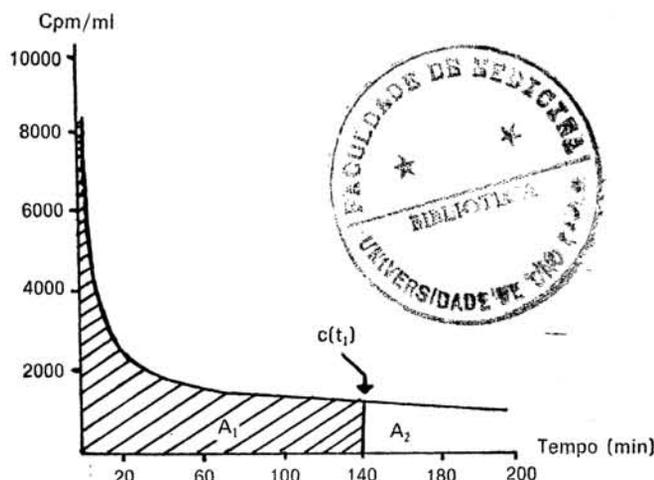
Esses valores foram então substituídos na fórmula desenvolvida por Sapinstein e cols.<sup>19</sup> para obter a medida do RFG:

$$RFG = (Q k_1 k_2) / (A k_2 + B k_1)$$

Entretanto, apesar desses dois métodos terem sido usados por diferentes investigadores, em situações em que há expansão do volume do fluido extracelular ou em casos de ascites, ambos métodos tendem a sobrestimar o RFG, quando comparado pelo método clássico que usa o clearance de inulina.

Por volta de 1977, Hall, Guyton e Farr<sup>20</sup> criaram uma nova metodologia usando também uma simples injeção do marcador, que permite medir o RFG independentemente do estado de expansão do volume de fluido extracelular que o animal se encontra. Neste novo método não importa o número de compartimentos em que o indicador se distribui e nem a forma geral da curva de desaparecimento de inulina plasmática.

Recentemente essa metodologia foi novamente empregada para um estudo das modificações do RFG durante a obstrução complexa dos ureteres de ratos<sup>21</sup>, comprovando-se mais uma vez que os valores obtidos com o seu uso são semelhantes aos obtidos pelo clearance de inulina tradicional.



Esquema mostrando a curva de decaimento da radioatividade plasmática do marcador em função do tempo.

Segundo esses autores:

$$RFG = Q/A_1 + C(t_1)/k$$

onde: Q = quantidade total de marcador injetado  
 $A_1$  = área total do tempo zero até o tempo  $t_1$  (correspondente à última coleta de sangue)  
 $C(t_1)$  = concentração do marcador na última coleta do plasma (por volta de 140 minutos)  
 k = constante de velocidade da parte da curva mono-exponencial

A área  $A_1$  pode ser determinada graficamente (através de um planímetro ou por meio do método dos quadrados) ou por integração numérica com o auxílio de um computador. Em nosso trabalho atual a área  $A_1$  foi calculada por integração numérica, calculada com a ajuda de um programa computacional.

A constante de velocidade (K) usada para cada experimento foi a média das constantes de velocidade encontradas para todos os animais estudados.

## II. RESUMO E OBJETIVOS

Vários trabalhos realizados em nosso laboratório foram feitos em condições de leve expansão do volume extracelular, com infusão de manitol a 3%, o que, além de provocar uma melhor diurese, faz com que os túbulos renais se mantenham cheios de líquido, evitando seu colapso, facilitando assim os trabalhos de micropunção tubular. Entretanto, até agora, tanto em nosso laboratório de fisiologia renal como em outros, não foi feito um estudo sistemático para esclarecer o papel da diurese osmótica por manitol na expansão isotônica do volume do fluido extracelular.

Por outro lado, medindo o volume extracelular pela curva de diluição de inulina radioativa, pretendemos, baseados nessa mesma curva, desenvolver um programa computacional que nos permita avaliar o ritmo de filtração glomerular, sem levar em conta o fluxo urinário.

O desenvolvimento desse trabalho nos possibilitará comparar no mesmo animal esse método de medida do ritmo de filtração glomerular, com o uso convencionalmente pelo clearance de inulina. A criação dessa metodologia será muito útil, pois permitirá a avaliação da função renal em animais com baixo fluxo urinário, em completa anúria, e em determinadas situações nas quais

não é possível medir o fluxo urinário, como ocorre em certos invertebrados.

O presente estudo será feito em três grupos de animais:

- 1.º grupo: animais com volume extracelular normal, com infusão de solução fisiológica mais manitol a 3% na velocidade de 0,05 ml/min;
- 2.º grupo: animais com expansão do volume extracelular por solução fisiológica correspondente a 30 ml/k (velocidade de 0,5 ml/min) e a dose de manutenção será na velocidade de 0,3 ml/min;
- 3.º grupo: animais com expansão do volume extracelular por solução fisiológica mais manitol a 3% correspondente a 30 ml/k (velocidade de 0,5 ml/min). A dose de manutenção será de solução fisiológica mais manitol a 3% na velocidade de 0,3 ml/min.

Em todos os grupos de animais serão determinados os seguintes parâmetros, em cada fase do experimento:

- volume extracelular
- ritmo de filtração glomerular
- volume plasmático
- clearance de sódio
- hematócrito

## III. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos albinos machos com peso entre 200 e 400 gramas. A anestesia foi feita com nembutal sódico na dose de 30 mg/k de peso corporal, por via intraperitoneal, com doses complementares endovenosas.

Canulamos a veia jugular e a artéria carótida para infusão de inulina radiativa, solução fisiológica, solução fisiológica mais manitol a 3%, e retirada de amostras sanguíneas necessárias para as dosagens de sódio e proteínas, respectivamente.

Foi cortada a extremidade da cauda do animal para a retirada de pequenas amostras de sangue em capilares de vidro, previamente heparinizados, com o intuito de avaliar o hematócrito e obter a curva do decaimento da concentração plasmática da inulina radioativa ao longo do experimento.

A traquéia foi canulada com cânula de polietileno para facilitar a respiração e aspiração das secreções das vias respiratórias.

A urina foi coletada diretamente da bexiga canulada com cânula de polietileno desenvolvida no laboratório, a qual permite coleta fácil da urina sem lesão das mucosas e sem perda de fluido.

A inulina utilizada é marcada com  $C^{14}$  e administrada endovenosamente, com dose conhecida, no início do experimento. A obtenção do volume injetado é feita através da diferença de peso da seringa antes e depois de injetado o material radioativo no animal.

O volume do plasma obtido nas diversas fases do experimento necessário para a dosagem de inulina, assim como o volume das urinas obtidas, também são medidos por diferença de peso.

As amostras são colocadas em frascos de vidro contendo 10 ml de uma solução cocktail (PPO 5 g/l + naphthalene 100 g/l + dioxane completado para 1 litro) e contadas durante 10 minutos em um contador (Beckman LS 8000) para  $C^{14}$ .

O volume extracelular foi determinado pelo método do decaimento da concentração plasmática de inulina com o tempo, extrapolando-se a curva desse decaimento para o tempo igual a zero para se obter a concentração inicial do plasma. Temos então:

$$VEC = \frac{\text{dose injetada} - \text{dose excretada na urina}}{\text{concentração plasmática}}$$

A variação do volume extracelular também foi avaliada pelo estudo da variação da concentração plasmática de proteínas e pelo hematócrito, uma vez que estes dois parâmetros refletem variações no volume plasmático, que é função direta do volume extracelular como um todo.

A obtenção da concentração plasmática de proteínas foi obtido pelo método colorimétrico, segundo o método de Lowry<sup>24</sup>.

O ritmo de filtração glomerular foi avaliado pelo clearance de inulina obtido tanto pelo método tradicional, como pelo método de queda da concentração plasmática de inulina radioativa, que dispensa a coleta da urina<sup>17</sup>.

A obtenção da concentração plasmática e urinária de sódio foi avaliada em fotômetro de chama (modelo Evans Electroelenium 1 td (EEL)). Sendo então obtidos o clearance de sódio pelo método tradicional ( $C = \frac{UV}{P}$ ) e a fração de reabsorção (F.A.) segundo a equação

$$FA = \frac{CF - CE}{CF} \times 100$$

sendo FA = fração de reabsorção em porcentagem  
CF = carga filtrada = Cin.Px  
CE = carga excretada = V.Ux

#### IV RESULTADOS

Para o presente relatório final, foram selecionados 5 ratos do 1.º grupo, 4 ratos do 2.º grupo e 5 ratos do 3.º grupo, e os resultados obtidos são a seguir apresentados e analisados nas tabelas e gráficos que se seguem.

A análise estatística de todos os parâmetros estudados foi feita utilizando-se o teste de Scheffé, que permite a comparação pareada entre animais de cada período dos diferentes grupos analisados.

A comparação entre os dois métodos de medida do ritmo de filtração glomerular foi feita pelo teste *t* pareado.

O experimento, em cada grupo de ratos, foi dividido em 3 períodos, cada um com a duração de 40 minutos.

#### V DISCUSSÃO

##### Clearance e Reabsorção Fracional de Sódio

Como podemos acompanhar Gráfico I, a expansão do volume extracelular com sobrecarga de solução fisiológica leva a um significativo aumento do clearance de sódio, nos 3 períodos estudados. Tal aumento não é devido à elevação da carga filtrada de sódio, uma vez que, pelo Gráfico II, vemos que a fração de reabsorção de sódio em porcentagem de sua carga filtrada está diminuída, indicando que houve uma queda da reabsorção tubular desse íon. Como foi comentado na introdução des-

te trabalho, várias poderiam ser as causas dessa inibição. Em virtude de termos feito uma expansão isotônica, é de esperar-se que o rim do animal lance mão de mecanismos que interfiram no transporte isotônico de água, isto é, de mecanismos que atuem ao nível do túbulo proximal. Como está demonstrado na Figura abaixo, em experimentos feitos em cão com sobrecarga de aldosterona (para evitar seu efeito adicional), ficou demonstrada a existência do hormônio natriurético, o qual seria liberado em condições de expansão de volume, indo inibir a reabsorção tubular de sódio. Tal hormônio, denominado fator III, seria deflagrado mesmo na situação de expansão com pinçamento da artéria renal, condição esta em que ainda existe um aumento da carga excretada de sódio em relação ao controle, apesar da queda da sua carga filtrada. É provável pois que, na situação que estamos estudando, haja uma elevação da produção e/ou liberação do fator III.

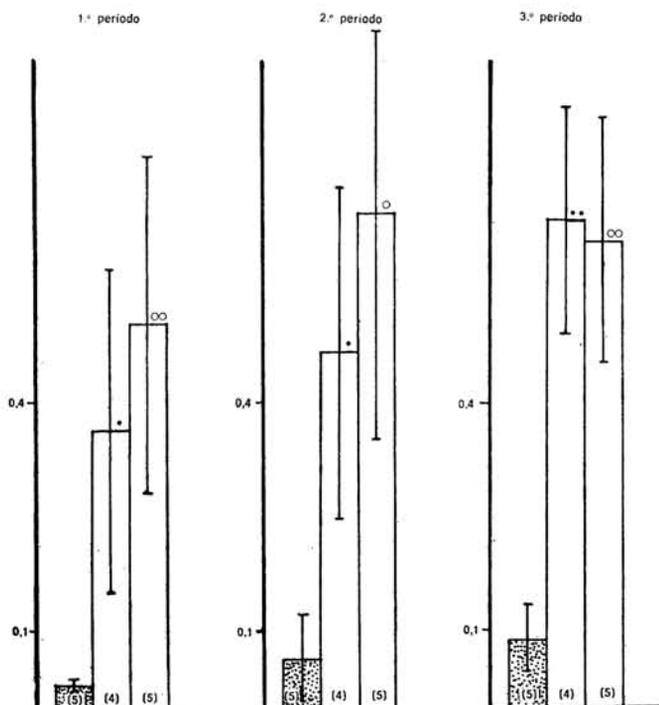
Por outro lado, de acordo com diferentes trabalhos<sup>22,23</sup> as forças de Starling na circulação pós-glomerular tem um importante efeito na queda da reabsorção absoluta proximal. Assim é, que a expansão que fizemos com solução fisiológica provocaria um aumento da pressão hidrostática capilar e uma concomitante queda na diferença de pressão hidrostática capilar e uma concomitante queda na diferença de pressão oncótica transcápilar média, sendo que tais variações desses dois parâmetros poderiam levar a uma queda da reabsorção proximal de solução isotônica. A tendência à queda da concentração de proteínas plasmáticas ao longo do experimento pode ser constatado no Gráfico IV.

Pelo Gráfico I e II, vemos que a expansão do VEC com solução fisiológica mais 3% de manitol (3.º grupo) é mais efetiva no aumento da clearance de sódio e na diminuição da reabsorção fracional de sódio do que no caso dos animais que foram expandidos apenas com solução fisiológica (2.º grupo). Vemos também que nessa situação o fluxo urinário está bem mais elevado.

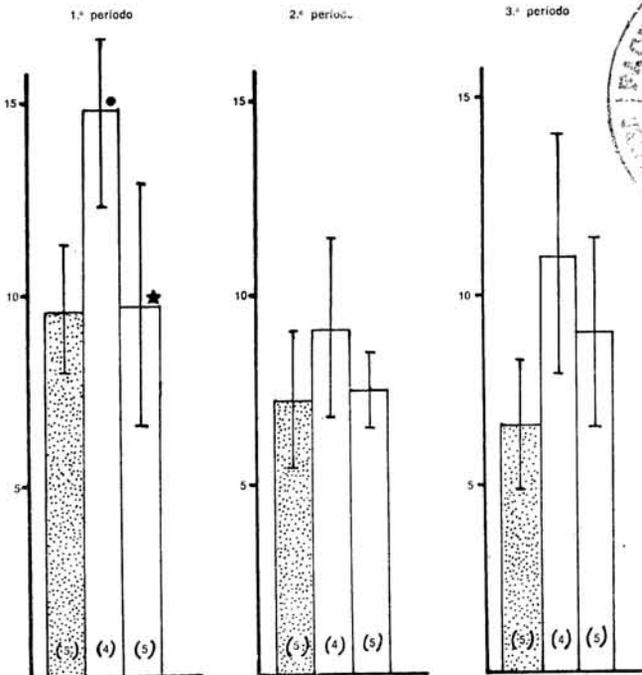
Tal achado era de se esperar, uma vez que, além das forças de Starling estarem atuando no sentido da queda da reabsorção absoluta proximal devido ao efeito da expansão pela solução fisiológica, temos somado a esse efeito uma queda na reabsorção paracelular de água e NaCl no túbulo, por redução da força osmótica propulsora. Ou seja, a redução da reabsorção de água aumentaria a concentração de NaHCO<sub>3</sub> no fluido paracelular proporcionalmente ao aumento da concentração de manitol no plasma e filtrado glomerular<sup>12</sup>. O manitol provavelmente estaria inibindo o transporte de sódio na sua etapa passiva, que não requer energia<sup>7,8,9,10</sup>.

##### Ritmo de Filtração Glomerular (RFG)

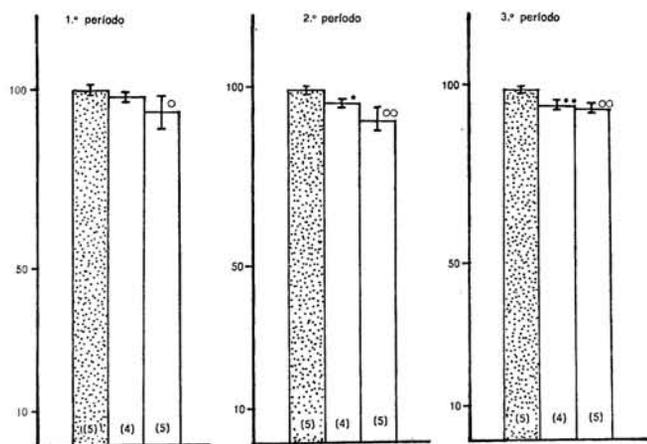
No Gráfico III, notamos que a expansão do volume extracelular por fisiológica provoca um significativo aumento do ritmo de filtração glomerular, sendo que quando a expansão é provocada juntamente com manitol, o RFG não se apresenta significativamente modificado em relação ao controle. Como foi discutido na introdução, a expansão do VEC com salina provoca uma elevação do fluxo sanguíneo capilar sem concomitante variação da pressão hidrostática intracápilar, devido a uma queda da resistência na arteriola aferente e uma elevação na da eferente<sup>23</sup>. Assim é que no caso do clameamento tardio da artéria renal, na situação controle, a resistência arteriolar aferente era de  $1,9 \pm 1 \times 10^{10} \text{ s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e após a expansão caiu para  $1,0 \pm 1$ ; na arteriolar eferente era  $1,1 \pm 1$  e passou para  $1,5 \pm 2$ . Nos animais em que o clameamento da artéria renal foi feito inicialmente, as mesmas variações foram observadas, ou seja, a expansão provocou uma queda da resistência arteriolar aferente ( $1,9 \pm 2$  para  $1,4 \pm 1$ ) e uma elevação na da



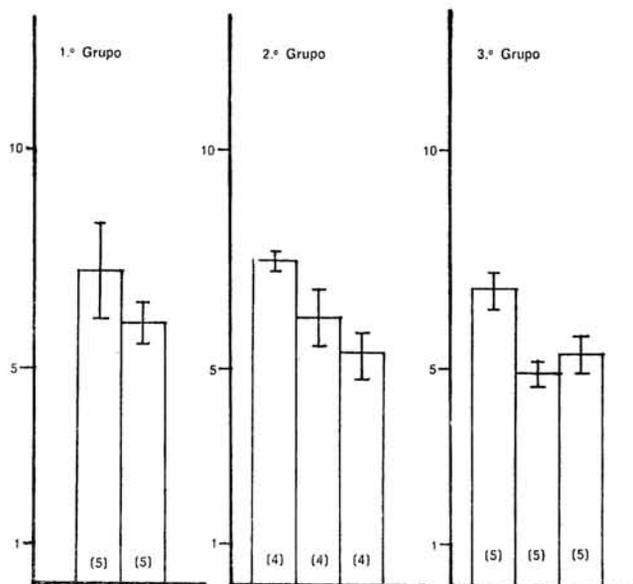
**GRÁFICO I:** Clearance de sódio (ml/min K).  
 Coluna pontilhada: grupo controle (sem expansão)  
 1.ª coluna vazia: grupo com expansão do VEC com solução fisiológica.  
 2.ª coluna vazia: grupo com expansão do VEC com sol. fisiológica + manitol 3%  
 •, ○:  $0,01 < p < 0,05$   
 ••, ○○:  $p < 0,01$   
 •: entre colunas 1 e 2  
 ○: entre colunas 1 e 3



**GRÁFICO III:** RFG medido pelo método tradicional (ml/min.kg).  
 Coluna pontilhada: 1.º grupo (controle) sem expansão do VEC  
 1.ª coluna vazia: 2.º grupo (expansão com sol. fisiológica)  
 2.ª coluna vazia: 3.º grupo (expansão com fisiológica + manitol 3%)  
 •, ••:  $0,01 < p < 0,05$   
 •: entre coluna 2 e coluna 3  
 •: entre coluna 1 e coluna 2



**GRÁFICO II:** Fração de reabsorção de sódio.  
 Coluna pontilhada: grupo controle (sem expansão)  
 1.ª coluna vazia: grupo com expansão do VEC com fisiológica  
 2.ª coluna vazia: grupo com expansão do VEC com fisiológica + manitol 3%  
 •, ○:  $0,01 < p < 0,05$   
 ••, ○○:  $p < 0,01$   
 •: entre coluna 1 e coluna 2  
 ○: entre coluna 1 e coluna 3



**GRÁFICO IV:** Concentração plasmática de proteínas (g%)  
 1.º grupo { 1.ª coluna: antes do experimento  
 2.ª coluna: ao fim do experimento  
 2.º e 3.º grupos { 1.ª coluna: antes do experimento (antes da expansão)  
 2.ª coluna: depois da expansão  
 3.ª coluna: ao fim do experimento

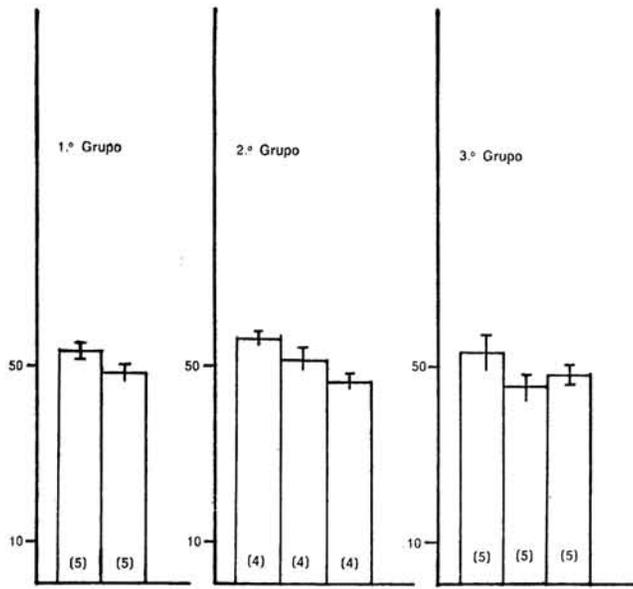


GRÁFICO V: Hematócrito

- 1.º grupo { 1.ª coluna: antes do experimento  
2.ª coluna: ao fim do experimento
- 2.º e 3.º grupos { 1.ª coluna: antes do experimento (antes da expansão)  
2.ª coluna: depois da expansão  
3.ª coluna: ao fim do experimento

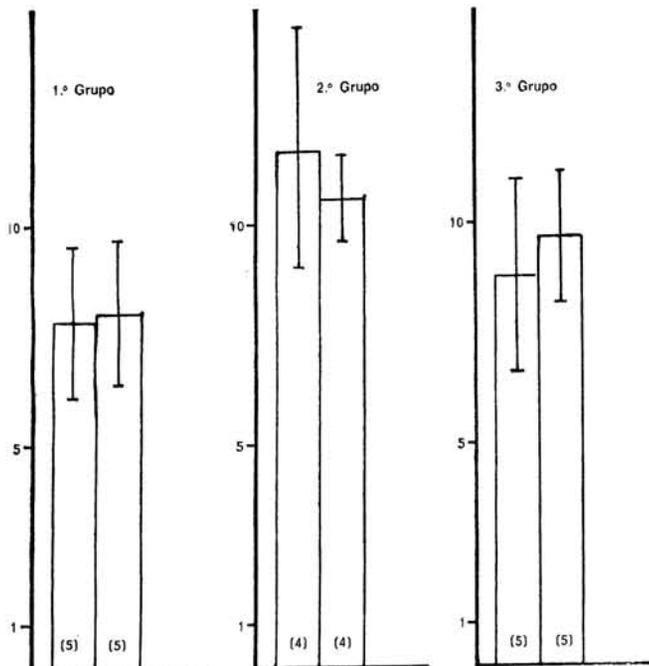


GRÁFICO VI: Comparação entre o RFG (ml/min K) obtido pelo método tradicional, e o método sem coleta de urina.

- 1.ª coluna: Clearance de inulina pelo método tradicional  
2.ª coluna: Clearance de inulina pelo método sem coleta de urina.  
Não houve variação significativa entre um método e o outro a nível de 5%.

eferente (de  $1,1 \pm 1$  para  $1,4 \pm 1$ ). Provavelmente, em nosso presente trabalho, a variação desses parâmetros é que seria a responsável por essa elevação do RFG.

O fato do RFG, sob a ação do manitol, ser praticamente igual ao do controle e sem expansão (1.º grupo), pode ser devido a não elevação do fluxo sanguíneo glomerular, talvez porque essa substância não interfere na resistência arteriolar. Outra possibilidade, que não anula a primeira, seria devida ao fato que esse açúcar, por inibir bastante a reabsorção de fluido no túbulo proximal, eleva consideravelmente a pressão hidrostática intratubular. Em vista da pressão de ultrafiltração glomerular ser dada pela diferença de gradiente de pressão hidrostática e oncótica transcápitulares glomerulares ( $\Delta p - \Delta \pi$ ), uma elevação da pressão hidrostática intratubular diminuiria  $\Delta p$ , caindo conseqüentemente a pressão de ultrafiltração.

### Volume Extracelular

Consultando a Tabela 1, vemos que, para os 3 grupos estudados, o VEC apresenta um valor relativamente coerente somente no 1.º período, sendo que nos demais períodos passa a variar aleatoriamente. Várias possibilidades foram aventadas para explicar esses resultados. Poderia ser devido ao fato da inulina utilizada nos primeiros animais estudados estar com sua molécula degradada, formando cadeias moleculares menores que poderiam penetrar no interior das células, atravessando a membrana citoplasmática. É sabido que a inulina dissolvida a muito tempo é possível dessa quebra. Para verificar essa possibilidade passamos a utilizar uma solução nova de inulina marcada com  $C^{14}$ . Entretanto, o valor do VE continuou a variar aleatoriamente ao longo de cada experimento. Passamos então a admitir a hipótese que o aparelho detector de  $C^{14}$  (cintilador Beckman LS 8000) não apresentasse a mesma sensibilidade para amostras de urina que tivessem uma elevada concentração de inulina  $C^{14}$ . Em vista disso, fizemos testes utilizando a mesma solução mãe de inulina radioativa, diluída em diferentes proporções (1:1, 1:10 e 1:100). Com o intuito de achar um possível fator de correção, para cada diluição contamos triplicatas de 5, 10 e 20 nanolitros. Porém, computando os resultados não nos foi possível achar um fator de correlação. Passamos então a levantar a seguinte hipótese: a técnica de avaliação do VEC pelo método de decaimento plasmático de inulina, amplamente utilizada para medidas em steady state, parece não ser adequada para medidas instantâneas do VEC. Enquanto que a avaliação do VEC inicial deu valores esperados (em média 20% do peso do animal), a medida do valor instantâneo do VEC, feita ao longo de cada experimento, variou aleatoriamente. Isso poderia ser devido ao fato da inulina ser perdida muito rapidamente pela urina, fazendo com que a variação da inulina plasmática seja muito rápida, sendo que pequenos erros na contagem do tempo de coleta possam provocar grandes erros de cálculo. Para o valor da concentração plasmática de inulina ser exato deveria ser obtido ao mesmo tempo que a da urina, o que pela presente técnica de obtenção de amostras de urina (por canulação da bexiga) é impraticável, havendo sempre um espaço morto (nos ureteres, bexiga e cânula).

Além disso devemos considerar que o espaço de distribuição de inulina, em nossos experimentos, está variando continuamente em virtude da expansão contínua que estamos provocando, a qual sobrestima o VEC em virtude da maior diluição do plasma em relação ao interstício.

É possível que, em virtude de ser bem menos excretado que a inulina, o bromo seja um melhor marcador

para medidas instantâneas do VEC. Entretanto, tal hipótese deverá ser comprovada.

#### 1.º Grupo

Ratão	Peso (g)	VEC <sub>0</sub> inicial	VEC <sub>1</sub> aos 40'	VEC <sub>2</sub> aos 80'	VEC <sub>3</sub> aos 120'
I	240	380,6	543,5	—	—
II	395	382,5	224,7	142,0	85,9
III	360	369,3	383,4	568,6	—
IV	230	221,6	—	—	—
V	260	257,0	282,6	—	—

#### 2.º Grupo

I	345	347,9	309,5	279,4	680,5
II	340	333,0	699,5	364,2	—
III	340	431,2	166,5	—	—
IV	320	393,7	178,3	—	—

#### 3.º Grupo

I	370	258,8	391,3	763,5	—
II	370	397,5	—	—	—
III	325	389,6	213,2	88,6	—
IV	285	513,4	441,7	667,8	—
V	420	351,4	283,6	344,4	464,7

VEC: Volume extra celular (ml/k)

Dados recentes obtidos em nosso laboratório, utilizando bromo e inulina para medidas estacionárias do VEC, indicaram que o VEC aumenta mais em animais com expansão feita a partir de uma sobrecarga de solução fisiológica do que em animais expandidos por fisiológica mais 3% de manitol.

#### Obtenção do Ritmo de Filtração Glomerular sem Coleta de Urina

No Gráfico VI estão os valores encontrados na medida do RFG sem utilização de urina. A comparação deste método com o método tradicional de medida do RFG, nos indica que não há diferenças significantes entre os valores encontrados através da utilização dos dois métodos, mostrando que a avaliação do RFG pelo método não convencional indica adequadamente o RFG.

O desenvolvimento do presente trabalho nos possibilitou comparar no mesmo animal, sob as mesmas condições, esses dois métodos de medida do RFG. A criação dessa metodologia é bastante útil, uma vez que o método tradicional é muitas vezes impraticável em experimentos crônicos, pois requer cateterização da bexiga, coleta cuidadosa das amostras de urina, bem como infusão contínua de inulina. A contínua cateterização da bexiga em pacientes ou em experimentos crônicos prolongados, pode provocar infecções e ou pielonefrites. Esses métodos permitem também avaliar a função renal em indivíduos com baixo fluxo urinário, ou em situações de anúria, como em pacientes hidronefróticos, e em determinadas situações nas quais não é possível a medida do fluxo urinário, como acontece em certos invertebrados.

#### Proteínas Plasmáticas e Hematócrito

A análise dos gráficos IV e V indica que tanto a concentração de proteínas plasmáticas, como o hematócrito tendem a cair ao longo dos experimentos para os 3 grupos de animais utilizados. Entretanto não foram encontradas diferenças significantes entre os vários períodos e nem entre os grupos. Parece que no 3.º período do 3.º grupo o manitol tenta compensar a expansão pois a concentração de proteínas plasmáticas e o hematócrito sofrem uma pequena elevação em relação ao 2.º período.

#### VI. CONCLUSÕES

O presente trabalho nos permite concluir que:

1. Não existe diferença significativa na avaliação do RFG pelo método tradicional de medida do clearance de inulina, ou pelo método que não necessita de urina, confirmando-se a validade do método, justificando o seu uso inclusive em clínica.
2. As medidas instantâneas do VEC não devem ser feitas pelo método que utiliza o decaimento de inulina plasmática.
3. A diurese e a excreção fracional de sódio são mais elevadas nos animais que recebem sobrecarga de fisiológica mais manitol\*.
4. A expansão por solução fisiológica aumenta significativamente o RFG, enquanto que a expansão com fisiológica mais manitol 3% não altera esse parâmetro renal.

#### VII. REFERÊNCIA

1. Gottschalk, C. W. — *Physiologist*, 4: 35, 1961.
2. Curran, P. F. & MacIntosh, J. R. — A model system for biological water transport. *Nature*, 193: 347, 1962.
3. Gottschalk, C. W. & Mylle, M. — Micropuncture study of the mammalian urinary concentrating mechanism: Evidence for the counter current hypothesis. *Am. J. Physiol.* 196: 927-936, 1959.
4. Windhager, E. E. & Giebisch, G. — Micropuncture study of renal tubular transfer of sodium chloride in the rat. *Am. J. Physiol.* 200: 581-590, 1961.
5. Wesson, L. G. Jr. & Anslow, W. P. — Excretion of sodium and water during osmotic diuresis in the dog. *Am. J. Physiol.* 153: 465-474, 1948.
6. Pitts, R. F. — *Physiology of the Kidney and Body Fluids*. Chicago, Year Book Medical Publishers, 1968, pp. 96-106.
7. Kiil, F.; Aukland, K. & Refsum, H. E. — Renal sodium transport and oxygen consumption. *Am. J. Physiol.* 201: 511-516, 1961.
8. Kjekshus, J.; Aukland, K. & Kiil, F. — Oxygen cost of sodium reabsorption in proximal and distal parts of the nephron. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 23: 307-316, 1969.
9. Mathisen, Ø.; Johannesssen, J. & Aukland, K. — Metabolic rate in renal cortex and medulla during mannitol and saline infusion. *Am. J. Physiol.* 220: 565-570, 1971.
10. Mathisen, Ø.; Raeder, M.; Sejersted, O. M. & Kiil, F. — Effect of acetazolamide on glomerulotubular balance and renal metabolic rate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36: 617-625, 1976.
11. Mathisen, Ø.; Monclair, T. & Kiil, F. — Oxygen requirement of bicarbonate dependent sodium reabsorption. *Am. J. Physiol.* 238: F175-F180, 1980.
12. Mathisen, O.; Raeder, M. & Kiil, F. — Mechanism of osmotic diuresis. *Kidney International*, 19: 431-437, 1981.

\* Tendendo à correção da expansão do VEC provocada pela administração de solução fisiológica.

13. Ichikawa, I. & Brenner, B. M. — Mechanism of inhibition of proximal tubule fluid reabsorption after exposure of the rat kidney to the physical effects of expansion of extracellular fluid volume. *J. Clin. Invest.* **64**: 1466-1474, 1979.
14. Corbern, E. Ott. — Effect of saline expansion on peritubule capillary pressures and reabsorption. *Am. J. Physiol.* **240**: F106-F110, 1981.
15. Chantler, C.; Garnett, E. S.; Parsons, V. & Veall, N. — Glomerular filtration rate measurement in man by the single injection method using <sup>51</sup>Cr-EDTA. *Clin. Sci.* **37**: 169-180, 1969.
16. Ram, M. D.; Holroyd, M. & Chisholm, G. D. — Measurement of glomerular filtration rate using <sup>125</sup>I-diatrizoate. *Lancet*, **1**: 397-399, 1969.
17. Rosenbaum, J. L.; Kramer, M. S.; Raja, R. M.; Manchanda, R. & Lazaro, N. — Determination of inulin and p-aminohippurate clearance without urine collection. *Nephron*, **10**: 347-354, 1973.
18. Blaufox, M. D. & Comen, A. — Single-injection clearances of iohalamate <sup>125</sup>I in the rat. *Am. J. Physiol.*, **218**: 542-544, 1970.
19. Sapirstein, L. A.; Vidt, D. G.; Mandel, M. J. & Hanuser, G. — Volume of distribution and clearances of intravenously injected creatine in the dog. *Am. J. Physiol.* **181**: 330-336, 1955.
20. Hall, J. E.; Guyton, A. C. & Farr, B. M. — A single-injection method for measuring glomerular filtration rate. *Am. J. Physiol.* **232**: F72-F76, 1977.
21. Harris, R. G. & Gill, J. M. — Changes in glomerular filtration rate during complete urteral obstruction in rats. *Kidney International*, **19**: 603-608, 1981.
22. Osgood, R. W.; Lameire, N. H.; Sorkin, M. I. & Stein, J. H. — Effect of aortic clamping on proximal reabsorption and sodium excretion in the rat. *Am. J. Physiol.*, **232**: F92-F96, 1977.
23. Fitzgibbons, J. P.; Gennari, F. J.; Garfinkel, H. B. & Cortell, S. — Dependence of saline-induced natriuresis upon exposure of the kidney to the physical effects of extracellular fluid volume expansion. *J. Clin. Inv.* **54**: 1428-1436, 1974.
24. Lawry, O. H.; Eosebouch, N. J.; Farr, A. L. & Gandall, R. L. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265,

