



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

PEDRO HENRIQUE SÁ COSTA

MODULAÇÃO DA VIA DAS GUANILINAS PELO ENALAPRIL EM RATOS
SUBMETIDOS À NEFRECTOMIA 5/6

FORTALEZA-CE

2015

PEDRO HENRIQUE SÁ COSTA

**MODULAÇÃO DA VIA DAS GUANILINAS PELO ENALAPRIL EM RATOS
SUBMETIDOS À NEFRECTOMIA 5/6**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA-CE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

C875m Costa, Pedro Henrique Sá.
Modulação da via das guanilinas pelo enalapril em ratos submetidos à nefrectomia 5/6. / Pedro Henrique Sá Costa. – 2015.
100 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. Insuficiência Renal Crônica. 2. Enalapril. 3. Angiotensina II. 4. Natriurese. I. Título.

CDD 616.614

PEDRO HENRIQUE SÁ COSTA

**MODULAÇÃO DA VIA DAS GUANILINAS PELO ENALAPRIL EM RATOS
SUBMETIDOS À NEFRECTOMIA 5/6**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dra. Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

A Deus, antes de tudo, por Seu infinito amor.

Aos meus pais, Pedro Costa Neto e Rosalba Bilro Sá pelos exemplos que representam e pelo legado da educação.

Aos meus irmãos Paulo Henrique e Ana Adélia pelo companheirismo.

À minha orientadora, professora Helena Serra Azul Monteiro pelo incentivo e total apoio.

Ao professor Alexandre Havt pelos ensinamentos e contribuição no projeto.

Ao amigo Rafael Ximenes pelos conselhos e ensinamentos.

Aos professores Rodrigo Siqueira e Daniel Freire e à professora Cláudia pela contribuição no exame de qualificação.

Aos doutorandos Delvane, Natacha e Mara, e ao mestrando Pedro Henrique Quintela. Sou muito grato a vocês pelo apoio e ajuda nos experimentos.

Aos mestrandos Alison e Laura pelas contribuições na execução do projeto.

Às doutorandas Roberta, Aline, Priscila e Socorro. Aos ICs Letícia, Mariana, Alejandra, Pedro Luiz, Yuri e Jeanine pela ajuda nos experimentos. A toda a equipe do LAFAVET que não citei mas que também deram sua contribuição.

Aos meus grandes amigos Filipe, Carlos Celso, Marcos, Lara e Flávia.

E a todos que não foram citados, mas que de alguma forma, direta ou indiretamente, ajudaram-me durante essa jornada.

Ao CNPQ, CAPES e FUNCAP pela contribuição financeira para a realização deste estudo.

RESUMO

MODULAÇÃO DA VIA DAS GUANILINAS PELO ENALAPRIL EM RATOS SUBMETIDOS À NEFRECTOMIA 5/6

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda normalmente lenta, progressiva e irreversível da função renal. Sugere-se que, nesta patologia, a resposta natriurética do organismo à ingestão de sal e a expansão de volume encontra-se reduzida em consequência da lesão dos néfrons. Nesse contexto, mostram-se necessários estudos que estabeleçam uma relação entre a DRC e a regulação de peptídeos natriuréticos, como guanilina (Gn), uroguanilina (UGn) e peptídeo natriurético atrial (PNA), e o efeito da angiotensina II (AngII) sobre a regulação destes peptídeos. Assim, buscou-se avaliar uma possível modulação da via das guanilinas pelo enalapril no modelo de nefrectomia 5/6 (nx5/6). Utilizou-se ratos Wistar, machos, com peso entre 250-300g. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=8): grupos controle sem tratamento ou tratado com enalapril (10mg/kg v.o.) (SHAM e SHAM+E) e grupos submetidos à nx 5/6 sem tratamento ou tratado com enalapril (10 mg/kg v.o.) (Nx e Nx+E). Ao final da 10ª semana após a cirurgia, foram determinados alguns marcadores de função renal. As amostras de rim foram encaminhadas para análise histológica e avaliação expressão de RNAm para Gn, UGn, PNA e dos receptores da guanilato ciclase de membrana, GC-A e GC-C e do receptor de *clearance* (NPR-C). No intestino, determinou-se a expressão de RNAm para Gn, UGn e G-C. Nx apresentou os níveis séricos de creatinina (Nx= 1.28 ± 0.07; SHAM= 0.67 ± 0.02 mg/dL), uréia (Nx=108.0 ± 5.57; SHAM=96.83 ± 4.08 mg/dL), proteinúria (Nx=129.10 ± 13.87 SHAM=96.83 ± 4.07; mg/24hrs) e FENa⁺ (Nx=3.552 ± 0.56; SHAM=1.43 ± 0.16) aumentados, e a TFG (Nx=0.44 ± 0.10 ± 0.04; SHAM=0.97 ± 0.07 mL/min) diminuída. Nx+E, quando comparado a Nx, apresentou níveis reduzidos de creatinina (Nx+E= 0.97 ± 0.08; Nx=1.28 ± 0.07 mg/dL), de proteinúria (Nx+E=31.94 ± 6.46 Nx= 129.10 ± 13.87 mg/24hrs) e da FENa⁺ (Nx+E= 2.02 ± 0.28; Nx=3.55 ± 0.56), além elevar a TFG (Nx+E=0.70 ± 0.08; Nx=0.44 ± 0.10 mL/min). Nx apresentou aumento da expressão gênica intra-renal de Gn (Nx=13.92 ± 5.13; SHAM=1.08 ± 0.20), UGn (Nx=12.77 ± 7.00; SHAM=1.04 ± 0.13), GC-A (Nx=5.91 ± 1.36; SHAM=1.06 ± 0.17) e NPR-C (Nx=7.835 ± 1.72; SHAM=1.15 ± 0.27), e Nx+E teve genes reduzidos para UGn (Nx+E=0.10 ± 0.03; Nx=1.75 ± 0.96), GC-A (Nx+E=0.031 ± 0.01; Nx=1.18 ± 0.27) e NPR-C (Nx+E=0.03 ± 0.01; Nx=1.08 ± 0.24) quando comparados a Nx. No intestino, houve uma redução da transcrição de GC-C (Nx=0,22±0,04; SHAM=1.12 ± 0.22) em Nx, e o enalapril aumentou os níveis de expressão deste gene

($Nx+E=3.94 \pm 0.57$; $Nx=1.15 \pm 0.22$). Em conjunto, estes dados sugerem uma hiperativação na via das guanilinas na DRC, além de modulação dessa classe de peptídeos por parte da AngII.

Palavras-chave: Doença Renal Crônica. Enalapril. Angiotensina II. Uroguanilina. Natriurese.

ABSTRACT

MODULATION OF GUANYLIN PATHWAY BY ENALAPRIL IN 5/6 NEPHRECTOMIZED RATS

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by loss usually slow, progressive and irreversible of renal function. It is suggested that, in this pathology, the natriuretic body's response to salt intake and to volume expansion is reduced as a result of damage of the nephrons. In this context, more studies are necessary for establishment of a link between DRC and regulation of natriuretic peptides, as guanylin (Gn), uroguanylin (UGn) and atrial natriuretic peptide (ANP), and the effect of angiotensin II (Ang II) on regulation of these peptides. Thus, we sought to evaluate a possible modulation of the guanylin by enalapril in the 5/6 nephrectomy model (nx5/6). We used male Wistar rats, weighing between 250-300g. The animals were divided into 4 groups (n = 8): untreated control group treated or not with enalapril (10 mg/kg oral) (SHAM and SHAM+E) and group subjected to nx5/6 treated or not with enalapril (10 mg / kg oral) (Nx and Nx+E). At the end of the 10th week after surgery, we measured some markers of renal function. Kidney samples were sent for histological analysis and evaluation of mRNA expression of Gn, UGn, ANP and membrane guanylate cyclase receptors, GC-A and GC-C, and the clearance receptor (NPR-C). In the intestine, we determined the mRNA expression of Gn, UGN and GC. Nx presented increased levels of serum creatinine (Nx= 1.28 ± 0.07 ; SHAM= $0.67 \pm 12/02$ mg/dL), urea (Nx= 108.0 ± 5.57 ; SHAM= 96.83 ± 4.08 mg/dL), proteinuria (Nx= 129.10 ± 13.87 SHAM= 96.83 ± 4.07 ; mg/24hrs) and FENa⁺ (Nx= 3.55 ± 0.56 ; SHAM= 1.43 ± 0.16), while GFR (Nx= $0.44 \pm 0.10 \pm 0.04$; SHAM= 0.97 ± 0.07 mL/min) was decreased. Nx+E, compared to Nx, showed reduced levels of serum creatinine (Nx+E= 0.97 ± 0.08 ; 1.28 ± 0.07 Nx= mg/dL), proteinuria (Nx+E= 129.10 ± 31.94 Nx= 13.87 ± 6.46 mg/24hrs) and FENa⁺ (Nx + E = 2.02 ± 0.28 ; Nx= 3.55 ± 0.56), and higher levels of GFR (Nx + E= 0.70 ± 0.08 ; Nx= 0.44 ± 0.10 ml/min). Nx showed increased intrarenal gene expression of Gn (Nx= 13.92 ± 5.13 ; SHAM= 1.08 ± 0.20) UGn (Nx= 12.77 ± 7.00 ; SHAM= 1.04 ± 0.13), GC-A (Nx= 5.91 ± 1.36 ; SHAM= 1.06 ± 0.17) and NPR-C (Nx= 7.84 ± 1.72 ; SHAM = 1.15 ± 12.27), and Nx+E had reduced genes for UGn (Nx+E= 0.10 ± 0.03 ; Nx = 1.75 ± 0.96), GC-A (Nx + E= 0.031 ± 0.01 ; Nx= 1.18 ± 0.27) and NPR-C (Nx+E= $0,03 \pm 0.01$; Nx= 1.8 ± 0.24) when compared to Nx. In the intestine, a reduction of transcription of GC-C (Nx = 0.22 ± 0.04 ; SHAM = 1.12 ± 0.22) in Nx group. Enalapril increased expression levels of this gene (Nx+E = 3.94 ± 0.57 ; Nx = 1.15 ± 0.22). Together, these data suggest a

hyperactivation the path of guanylin in CKD, and modulation of this peptide class by Ang II.

Keywords: Chronic kidney disease. Enalapril. Angiotensin II. Uroguanylin. Natriuresis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs – Produtos finais de glicosilação avançada

Ang (1-9) – Angiotensina (1-9)

Ang(1-7) – Angiotensina (1-7)

AngII – Angiotensina II

AT-1 – Receptor de angiotensina II - tipo 1

CFTR - Canal regulador transmembrana da fibrose cística

DM – Diabetes Melito

DRC – Doença renal crônica

ECA – Enzima conversora da angiotensina

ECA-2 – Enzima conversora da angiotensina – 2

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EROs – Espécies reativas do oxigênio

GC-A – Guanilato ciclase - A

GC-B – Guanilato ciclase - B

GC-C – Guanilato ciclase – C

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

Gn – Guanilina

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HCO₃⁻ - Bicarbonato

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HIF-1 α -

IL-6 – Interleucina - 6

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LEC – Líquido extracelular

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

MCP- α – Proteína quimiotática de monócitos

RNA m – Ácido ribonucleico mensageiro

NF κ -B – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

NO $_2^-$ - Nitrato

NO $_3^-$ - Nitrito

NOS – Óxido nítrico sintase

NPR-C – receptor de *clearence*

Nx5/6 – nefrectomia 5/6

O $_2^-$ - Superóxido

OH $^-$ - Hidroxila

ONOO 10 – Peroxinitrito

PCR – Proteína C reativa

PDE-III- Fosfodiesterase - III

PKG-II – Proteína quinase - II

PKC – Proteína quinase C

PNs – Peptídeos natriuréticos

PNA – Peptídeo natriurético atrial

ROMK – Canal de potássio da medula externa renal

rpm – rotações por minuto

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

STa – Toxina termo-estável

TFG – Taxa filtração glomerular

TGF- β – Fator de transformação do crescimento o - beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral - alfa

UGn – Uroguanilina

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Estimativa do total de pacientes em tratamento dialítico no Brasil entre os anos de 2000 e 2011	18
Figura 02	Visão simplificada do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	26
Figura 03	Ações gerais da uroguanilina no eixo intestino rim	31
Figura 04	Etapas do modelo cirúrgico de nefrectomia 5/6 em ratos	36
Figura 05	Desenho experimental dos grupos sem tratamento (SHAM e Nx)	38
Figura 06	Desenho experimental dos grupos tratados com enalapril (SHAM+E e Nx+E)	38
Figura 07	Curva de crescimento animal no decorrer do protocolo experimental	46
Figura 08	Efeito do tratamento com enalapril no peso renal após nefrectomia 5/6	47
Figura 09	Efeito do enalapril sobre a razão do peso renal pelo peso corpóreo dos animais 10 semanas após a nefrectomia 5/6	47
Figura 10	Efeito do enalapril no volume urinário em animais controles e nefrectomizados	48
Figura 11	Efeito do tratamento com enalapril na TFG em animais com DRC experimental	49
Figura 12	Efeito do tratamento com enalapril nos níveis de creatinina sérica em animais com DRC experimental	50
Figura 13	Níveis de uréia sérica em ratos nos diferentes grupos em estudo	51
Figura 14	Efeito do enalapril na proteinúria em animais submetidos a nefrectomia 5/6	52
Figura 15	Efeito do enalapril na fração de excreção de sódio em animais submetidos à nefrectomia 5/6	53
Figura 16	Efeito do enalapril nos níveis de sódio séricos em animais submetidos à nefrectomia 5/6	54
Figura 17	Efeito do enalapril nos níveis de sódio urinário em animais submetidos à nefrectomia 5/6	55
Figura 18	Determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato (NOx) em tecido renal	56
Figura 19	Efeito da ablação renal sobre a transcrição gênica de PNA em tecido renal	57

Figura 20	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de PNA em tecido renal de animais submetidos à nx5/6	58
Figura 21	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de Gn em tecido renal	59
Figura 22	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de Gn em tecido renal de animais submetidos à nx5/6	60
Figura 23	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de UGn em tecido renal	61
Figura 24	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de UGn em tecido renal de animais submetidos à nx5/6	62
Figura 25	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica sobre o receptor GC-A em tecido renal	63
Figura 26	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de GC-A em tecido renal de animais submetidos à nx5/6	64
Figura 27	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de NPR-C em tecido renal	65
Figura 28	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de NPR-C em tecido renal de animais submetidos à nx5/6	66
Figura 29	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de GC-C em tecido renal	67
Figura 30	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de GC-C em tecido renal de animais submetidos à nx5/6	68
Figura 31	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de Gn no intestino	69
Figura 32	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de Gn no intestino de animais submetidos à nx5/6	70
Figura 33	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de UGn no intestino	71
Figura 34	Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de UGn no intestino de animais submetidos à nx5/6	72
Figura 35	Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de GC-C no intestino	73

- Figura 36** Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de GC-C no intestino de animais submetidos à nx5/6 74
- Figura 37** Imagens representativas da morfologia glomerular em animais submetidos ao procedimento cirúrgico 76
- Figura 38** Imagens representativas da morfologia túbulo-intersticial em animais submetidos ao procedimento cirúrgico 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: Senso e A: Anti-senso).	43
Tabela 02	Parâmetros de função glomerular nos diferentes grupos experimentais	52
Tabela 03	Processamento do sódio nos diferentes grupos experimentais	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Doença Renal Crônica (DRC): aspectos gerais e epidemiológicos	17
1.2 Fisiopatologia da DRC	20
1.3 O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).	24
1.4 Papel nefroprotetor dos inibidores da ECA	26
1.5 Peptídeos natriuréticos e a via das guanilinas	28
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo principal	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Animais	35
4.2 Indução da DRC	35
4.3 Protocolo experimental	36
4.4 Avaliação de parâmetros gerais	38
4.5 Análise da função renal	39
4.5.1 Procedimentos realizados nas amostras	39
4.5.2 Dosagem da creatinina sérica e urinária	39
4.5.3 Cálculo da Taxa de Filtração Glomerular (TGF)	39
4.5.4 Dosagem de uréia sérica	40
4.5.5 Determinação de proteínas na urina	40
4.5.6 Cálculo da fração de excreção de sódio (FENa ⁺)	40
4.6 Dosagem de nitrito/nitrato (NO _x) no tecido renal	40
4.7 Avaliação da transcrição gênica	41
4.7.1 Extração do RNA total	41
4.7.2 Síntese do cDNA	41
4.7.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	41
4.8 Análise histopatológica	43

4.9 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Taxa de sobrevivência dos animais	45
5.2 Peso corpóreo e renal	45
5.3 Determinação do fluxo urinário	48
5.4 Avaliação de parâmetros de função renal	49
5.4.1 Função glomerular	49
5.4.2 Função tubular	53
5.5 Quantificação de nitrito/nitrato (nox) em tecido renal	56
5.6 Avaliação da transcrição gênica	56
5.6.1 Avaliação da transcrição relativa para os genes de peptídeo natriurético atrial (PNA), guanilina (Gn) e uroguanilina (UGn) no rim.	56
5.6.2 Avaliação da transcrição relativa para genes de receptores de guanilato ciclase A e C (GC-A e GC-C) e do receptor de <i>clearance</i> (NPR-C) no rim	62
5.6.3 Avaliação da transcrição relativa para genes de guanilina (Gn) e uroguanilina (UGn) no intestino	68
5.6.4 Avaliação da transcrição relativa para genes de receptores de guanilato ciclase C (GC-C) no intestino.	73
5.7 Análise histopatológica	74
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica (DRC): aspectos gerais e epidemiológicos

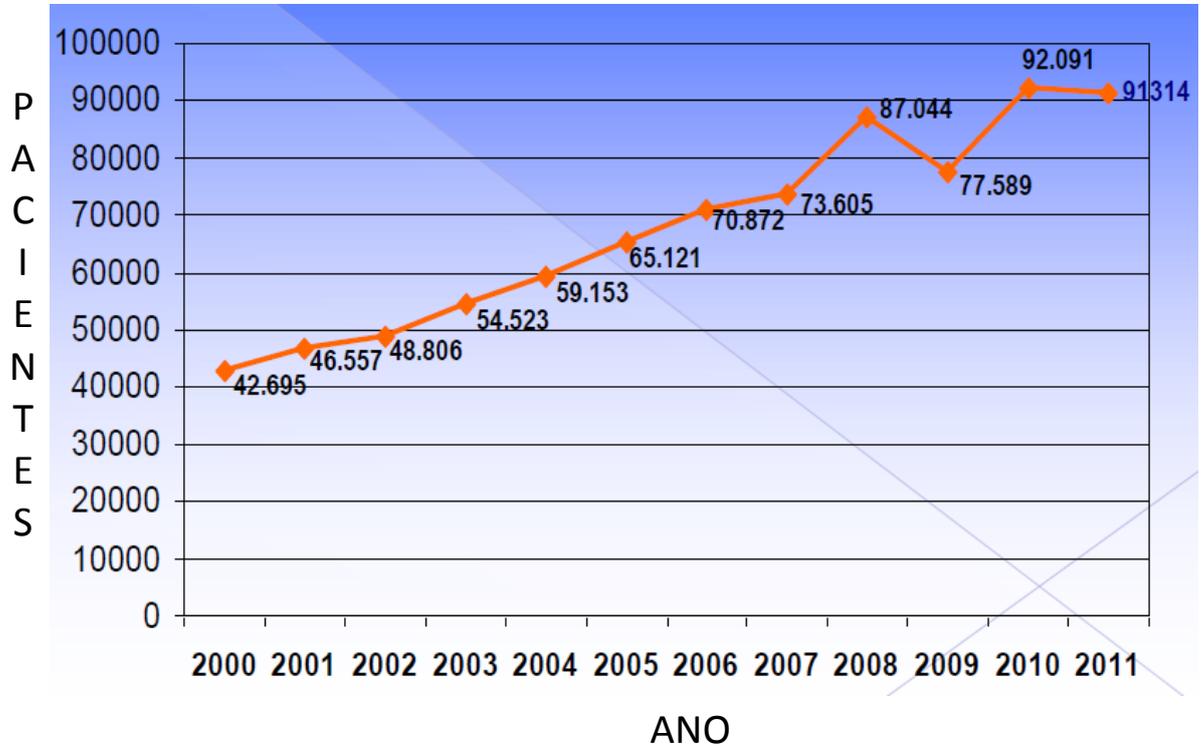
Descrita inicialmente em meados do século XIX pelo médico inglês Richard Bright, a Doença Renal Crônica (DRC) constitui atualmente um importante problema de saúde pública (SESSO; GORDAN, 2007). A DRC pode ser definida como uma perda progressiva, normalmente lenta e irreversível da capacidade excretória dos rins. Essa condição reduz as funções globais dos rins, ou seja, glomerulares, tubulares e endócrinas (RIELLA; PERCOITS-FILHO, 2010).

Atualmente, um paciente com redução na taxa de filtração glomerular (TFG), com ou sem lesão no parênquima renal, caracterizado por presença de albuminúria, por pelo menos três meses, é considerado portador de DRC (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011). A TFG nessa situação pode chegar até valores abaixo de 15 mL/min no estágio mais avançado da doença (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2012).

No Brasil, a DRC vem alcançando “proporções epidêmicas”, levando os órgãos governamentais a elevados gastos com terapia de substituição renal. Dados epidemiológicos mostram que o número de pacientes portadores de DRC vem aumentando a cada ano. Em 2009, um estudo estimou um total de 77.589 pacientes submetidos a diálise no Brasil, o que reforça a relevância clínica desta condição (SESSO et al., 2009).

De acordo com uma estimativa realizada pelo censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia em 2011, houve um aumento crescente do número de pacientes submetidos à diálise nos últimos dez anos, como mostrado na figura 01.

Figura 01: Estimativa do total de pacientes em tratamento dialítico no Brasil entre os anos de 2000 e 2011



Fonte: Sociedade Brasileira de Nefrologia (2011).

Nos Estados Unidos, um estudo revelou que cerca de 13% da população adulta tem DRC nos estágios 1 a 4, o que representa apenas a fase pré-dialítica da doença. Esse estudo considera a prevalência da DRC relacionada à albuminúria persistente e à diminuição progressiva da TFG. Em todo o mundo, estipula-se que aproximadamente um milhão de pacientes são submetidos a transplante renal devido à doença renal terminal (CORESH et al., 2007).

A DRC tem sido atribuída a inúmeras causas, entre elas o diabetes melito (DM), que constitui a causa mais comum de DRC, seguida de hipertensão arterial sistêmica (HAS). Estudos apontam que aproximadamente 30% dos diabéticos acabam evoluindo para o estágio final da DRC (ATKINS, 2005). As glomerulopatias, especialmente a glomeruloesclerose segmentar e focal, além da glomerulonefrite membranoproliferativa, também constituem fatores que levam à DRC (SESSO; GORDAN, 2007).

Alguns distúrbios de origem genética, como as doenças císticas, são capazes de alterar a estrutura do néfron, resultando em lesão renal (LÓPEZ-NOVOA et al., 2011). Outros fatores,

como a presença de infecções, o uso abusivo de analgésicos, a intoxicação por pesticidas, bem como a ingestão de alimentos com aditivos não regulamentados podem contribuir para o desenvolvimento da DRC, especialmente em países em desenvolvimento (JHA et al., 2013). Nos últimos anos, tem se intensificado a investigação do papel de fatores de riscos não-clássicos na fisiopatologia da DRC, como desnutrição, inflamação e estresse oxidativo (BRUNINI et al., 2006)

A progressão da DRC mostra-se bastante variável, e depende das condições clínicas de cada paciente. Os fatores que contribuem para o início da lesão, quando não devidamente controlados, também são responsáveis pela progressão para o estágio final da doença. Além deles, fatores intrínsecos, como sexo, idade, raça e fatores genéticos podem influenciar no ritmo da perda da função renal (NAHAS; BELLO, 2005).

No intuito de otimizar o monitoramento, e na busca de alternativas terapêuticas adequadas em pacientes portadores de DRC, mostra-se necessário o estadiamento da doença (FINK et al., 2012). Para tal, a TFG, estipulada pelo clearance de creatinina, constitui um parâmetro de função renal indispensável na prática clínica. Uma queda de TFG precede em diferentes graus a falência renal (PERCOITS-FILHO, 2004). O monitoramento da proteinúria e a aferição da pressão arterial constituem avaliações essenciais, pois o aumento destes dois parâmetros está diretamente associado a progressão mais rápida da DRC e a elevado risco cardiovascular (ABBOUD; HENRICH, 2010).

Na prática clínica atual, a substância mais comumente utilizada para a estipulação da TFG ainda é a creatinina. No entanto, a depuração da creatinina não constitui o marcador mais adequado para a detecção dessa patologia, por apresentar baixa sensibilidade nas fases iniciais. Na busca de marcadores mais sensíveis, o clearance de inulina e a dosagem sanguínea de cistatina C poderiam ser utilizados marcadores mais eficientes no estadiamento da DRC. No entanto, o primeiro apresenta dificuldades na execução e elevado consumo de tempo, o que dificulta sua adequação na prática clínica (LEVEY et al., 2005). Já a última é afetada por várias condições relacionadas a outras patologias, como inflamação, uso de glicocorticoides e disfunção tireoidiana (YASHIRO et al., 2009).

De acordo com a *National Kidney Foundation* a DRC pode ser dividida em 5 fases. O estágio 1 apresenta ausência de alterações significativas na TFG. Apesar da normalidade na função renal, essa fase inicial, desencadeada por fatores de riscos clássicos, já demonstra potencial de estimular a esclerose glomerular e fibrose intersticial, aspectos histopatológicos importantes na progressão do dano renal. O segundo estágio é caracterizado por leve redução

da TFG e como a fase 1, é normalmente assintomático, apesar da possibilidade de detecção de aumento moderado nos níveis plasmáticos de uréia (LEVEY et al., 2005). A fase 3 é caracterizada por uma redução mais significativa da TFG, quando a mesma encontra-se abaixo de 60 mL/min por 1.73 m², ou seja, nessa fase já existe uma queda em mais de 50% da função renal (LEVEY; CORESH, 2012). Na fase 4, o dano renal é considerado acentuado, e as complicações relacionadas a uremia começam a se manifestar clinicamente. Neste estágio (TFG varia entre 15 e 29 mL/min por 1.73 m²), o risco cardiovascular mostra-se elevado. Outras possíveis complicações nessa fase incluem anemia e distúrbios hidroeletrólíticos (ABBOUD; HENRICH, 2010).

Por fim, a fase 5 representa o estágio de falência renal, quando a TFG encontra-se a níveis abaixo de 15mL/min por 1.73m². Esse estágio responde pelo maior índice de mortalidade da doença, já que os distúrbios presentes na fase 4 se intensificam, e o rim perde a capacidade de manter a homeostase, o que leva a necessidade de terapia dialítica e em muitos casos, de transplante renal para manutenção das condições básicas à sobrevivência (LEVEY et al., 2005).

Embora a hemodiálise desempenhe algumas funções primordiais dos rins, como a depuração de excretas nitrogenadas da circulação, ela é considerada um procedimento invasivo e deletério ao organismo. Estudos têm relacionado a hemodiálise a diversas complicações, como aumento do índice de infecções e do estresse oxidativo, além de sua ineficácia em eliminar algumas das toxinas urêmicas (BAGDASARIAN; HEUNG; MALANI, 2012). Um estudo atribuiu diferentes sintomas em pacientes de um hospital durante a terapia dialítica, entre eles, cefaleia, hipotensão, fraqueza e desmaio (TERRA et al., 2010).

Devido a progressão da uremia mesmo no tratamento dialítico, o transplante renal se faz necessário na fase final da DRC. Apesar de seu elevado índice de sucesso, ainda hoje o transplante renal é responsável por diversas complicações, incluindo diversos problemas inerentes ao processo cirúrgico e clínicos a curto, médio e longo prazo, como a rejeição do órgão, infecções e aumento do risco de neoplasias (MANFRO; CARVALHAL, 2003).

1.2 Fisiopatologia da DRC

Independente da etiologia, os néfrons não são afetados de forma homogênea no decorrer da DRC. A medida que a patologia avança, um aumento da população de néfrons lesionados ou mesmo destruídos tem sido comumente observado (LOPEZ-NÓVOA et al., 2010). Estudos em modelos experimentais animais, como a uninefrectomia e a nefrectomia 5/6, mostram que

a retirada abrupta de massa renal causa uma série de alterações adaptativas aos néfrons remanescentes, que visam aumentar o trabalho destes, no intuito de evitar uma queda brusca na TFG, além da necessidade manter normal o equilíbrio hidroeletrólítico (TAAL; BRENNER, 2012).

A nível glomerular, as principais alterações em resposta a perda de massa renal se manifestam através do aumento do fluxo sanguíneo pelos néfrons remanescentes. Esse processo é decorrente da redução da resistência da arteríola aferente e, em menor grau, da arteríola eferente, acarretando em aumentos na pressão do capilar glomerular (P_{CG}) e no coeficiente de filtração (K_f), o que, conseqüentemente, gera o processo de hiperfiltração (BROWN et al., 1990; HOSTETTER et al., 2001). Enquanto isso, a nível tubular, verifica-se um aumento do volume do conteúdo luminal, e alterações na regulação de transportadores nas membranas apical e basolateral das células tubulares, no intuito de manter constante o equilíbrio hidroeletrólítico (TAAL; BRENNER, 2012).

No entanto, para que o rim continue a manter a homeostase em detrimento da perda de parte do parênquima renal, uma série de prejuízos ocorre na estrutura dos néfrons funcionantes. A sobrecarga imposta a esta população de néfrons causa aumento de P_{CG} . Esta hipertensão no glomérulo tem sido associada ao estresse mecânico a vários componentes da parede glomerulo, resultando ativação do processo inflamatório, do estresse oxidativo e gerando aumento da permeabilidade a proteínas de médio e alto peso molecular, causando a proteinúria. (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2012).

Dessa forma, a DRC envolve múltiplos mecanismos que favorecem à progressão ao estágio final da doença. Alguns destes eventos constituem tanto causa para uma lesão inicial, como consequência da sobrecarga aos néfrons remanescentes. Entre estes fatores, incluem-se aumentos no total de citocinas pró-inflamatórias, no estresse oxidativo, e na produção de angiotensina II (AngII) intra-renal, além da injúria endotelial e aterogênese, que são fatores determinantes na fisiopatologia da glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial (LOPEZ-NOVOA et al, 2010). A inflamação atinge o parênquima renal como um todo em reposta produção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas induzidos por um conjunto de fatores de riscos anteriormente citados. Estudos têm demonstrado concentrações alteradas de proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em pacientes em diferentes fases da DRC (OBERG et al., 2004). Ademais, na biópsia renal de pacientes portadores de DRC, é comumente verificada presença de matriz extracelular, além de aspecto fibroso em espaços onde seria esperada a presença parênquima renal (LOPEZ-NOVOA et al., 2010).

Ainda no contexto da inflamação, a HAS tem papel fundamental no desenvolvimento e na progressão da DRC, podendo ser tanto causa como consequência da lesão renal, contribuindo para o decréscimo da função renal. A ativação do processo inflamatório e a disfunção endotelial são alguns dos componentes fisiopatológicos gerados pela hipertensão. Adicionalmente, a combinação da HAS com a DRC favorece o surgimento e a progressão de doenças cardíacas (ROSARIO; WESSON, 2006). De modo geral, a HAS se faz acompanhar de uma constrição reflexa da arteríola aferente na maioria dos glomérulos, evitando que a P_{CG} se eleve. Entretanto, essa resposta não é homogênea em todos os néfrons, e em alguns deles não há constrição aferente adequada, o que resulta em hipertensão glomerular, e posteriormente, na nefrosclerose hipertensiva (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2012). Além disso, estudos experimentais têm relatado que a HAS contribui para a redução da produção de óxido nítrico, o que leva a vasoconstrição, e conseqüentemente, hipóxia do tecido renal (LOPEZ-NOVOA et al., 2010).

Além da hipertensão, distúrbios gerados pela síndrome metabólica, em situações como obesidade e resistência à insulina, desempenham um papel central na progressão da DRC (EROs) (GUEBRE-EGZIABHER et al., 2010). No contexto do metabolismo dos lipídios, estudos têm indicado que as dislipidemias, caracterizadas pelo aumento nos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de redução da lipoproteína de alta densidade (HDL), têm participação essencial na progressão do dano renal (CHEN et al., 2013). Nos últimos anos, tem-se intensificado os estudos sobre o papel dos níveis de adiponectina, uma citocina produzida exclusivamente pelo tecido adiposo, no contexto da esclerose renal. Apesar do papel antiaterogênico e cardioprotetor da adiponectina, estudos que avaliam os efeitos de altos níveis plasmáticos de adiponectina ainda mostram-se controversos na função renal do paciente urêmico (JIA et al., 2012). A redução da gordura corporal em pacientes obesos portadores de DRC em diferentes estágios parece produzir benefícios ao rim, o que é evidenciado pela melhora em parâmetros relacionados a função renal, entre eles TFG e microalbuminúria (BOLIGNANO; ZOCCALI, 2013).

Ainda no contexto da síndrome metabólica, a prolongada hiperglicemia presente em portadores de DM leva a uma série de alterações metabólicas e hemodinâmicas. Estas provocam danos estruturais irreversíveis nos rins, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão da DRC. Nas últimas décadas, tem sido demonstrado que o DM participa da modulação de vias de sinalização celular que levam a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (SOLDATOS; COOPERS, 2008). Inúmeros mecanismos que acometem a microvasculatura renal de portadores de DM têm sido atribuídos a eventos moleculares presentes no DM. Tais

mecanismos são variados, e envolvem o aumento do estresse oxidativo, a hiperatividade na via dos polióis, ativação da proteína quinase C (PKC), liberação do fator de transformação do crescimento (TGF- β) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (SUNG et al., 2013). Um mecanismo adicional envolve a formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), que constituem um grupo de compostos biologicamente ativos derivados da glicosilação não-enzimática de proteínas e lipídeos que ocorrem de maneira exacerbada no DM, principalmente em pacientes com glicemia descompensada (BADAL, DANESH, 2014). Os AGEs interagem com receptores específicos na superfície de membrana celulares afetando a morfologia dos vasos sanguíneos renais (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2008). O elevado estresse oxidativo presente na DRC, por sua vez, é outro fator que favorece a geração de AGEs (SUNG et al., 2013).

O estresse oxidativo é resultante de vários fatores intrínsecos à lesão renal, como disfunção endotelial, inflamação, uremia e Ang II. Níveis elevados de peroxidação lipídica e protéica, além de redução nas defesas antioxidantes têm sido relatados em pacientes urêmicos (DUMMER; THOMÉ; VERONESE, 2007). Reforçando a importância dos radicais livres na progressão da DRC, verificou-se que um fármaco antioxidante denominado tempol foi capaz de atenuar a hipertensão e a lesão renal induzida pela retirada de 5/6 da massa renal em camundongos (QUIROZ et al., 2009).

Por último, outro fator essencial na fisiopatologia da DRC constitui a disfunção endotelial, que está diretamente relacionada a aterosclerose e o excesso de radicais livres comumente presentes em lesões renais progressivas. Neste sentido, tem sido demonstrado alterações na síntese do óxido nítrico (NO), uma pequena molécula envolvida no tônus vascular, agregação plaquetária, inflamação e neurotransmissão (DUMMER; THOMÉ; VERONESE, 2007).

Desse modo, os mecanismos fisiopatológicos presentes na DRC, são inúmeros, e agem de modo a contribuir para a lesão, e finalmente, a destruição progressiva do parênquima renal, levando os néfrons a uma sobrecarga sobre a função glomerular e tubular. A medida que TFG declina, ocorre um aumento da fração de excreção de sódio ($FENa^+$), no intuito de evitar excessiva retenção deste no LEC. Este controle ocorre as custas de uma pequena expansão do LEC e conseqüentemente da hipertensão, o que leva ao aumento de forças natriuréticas direcionadas aos néfrons remanescentes, resultando em elevação da $FENa^+$ (SLATOPOLSKY, 1968). Nesse contexto, o ajuste de sódio no organismo tem papel essencial na progressão do dano renal na DRC. Em condições normais, o sódio é mantido dentro de limites

estreitos no meio interno, mesmo em quantidades extremamente altas ou baixas de sua ingestão (ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012). No entanto, quando o total de néfrons encontra-se reduzida, a margem de ingestão de sódio encontra-se estreitada, o que torna o paciente mais vulnerável a distúrbios hidroeletrolíticos. Considerado que a dieta ocidental apresenta níveis de sódio elevados, faz-se necessário reduzir a ingestão de sódio na dieta no intuito de evitar hipernatremia, com conseqüente aumento da hipertensão e agravamento da doença renal (ZATZ, 2010).

1.3 O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

O SRAA é conhecido por seu papel essencial nos sistemas cardíaco e renal: manutenção da pressão arterial e controle de fluidos e eletrólitos, como sódio e potássio. Sua ação tem início através da produção de renina pelo aparelho justaglomerular. Essa enzima proteolítica converte o angiotensinogênio em angiotensina I. Esta última é clivada em angiotensina II (AngII) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Em adição, a ECA promove a degradação de bradicinina, um potente vasodilador, por sua ação no sistema caliceína-cininas. A AngII responde pela maioria absoluta dos efeitos vasoconstrictores e antinatriuréticos do SRAA. Estes efeitos são mediados pela ação de Ang II no receptor AT-1. (INAGAMI,1998). É válido ressaltar a presença de outro subtipo de receptor para este peptídeo, o AT-2, que promove efeitos natriuréticos e vasodilatadores, contrapondo os efeitos observados m AT-1 (KEMP et al., 2014).

No rim, observa-se vasoconstrição da microvasculatura glomerular em resposta ativação de AT-1 pela Ang II, o que altera a dinâmica do néfron, além de contribuir para o crescimento celular (BADER; GANTEN, 2008). Nos túbulos renais, esta interação hormônio-receptor modifica a atividade de diversos trocadores iônicos de membrana, incluindo o transportador Na^+/H^+ (NHE3), canais de sódio epiteliais (ENaC) e co-transportadores $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ (NKCC2) e Na^+Cl^- (NaCC). Entre essas ações, destaca-se o aumento da reabsorção de Na^+ nos túbulos proximais e distais via NHE3. Adicionalmente, a Ang II promove liberação do hormônio mineralocorticoide aldosterona, que age no ductor coletor aumentando a atividade da Na^+/K^+ ATPase. Dessa forma, o transporte de Na^+ é alterado, acarretando em retenção deste íon no LEC (KOBORI et al., 2007; LI; ZHUO, 2008).

Com o avanço da biologia molecular, houve a possibilidade da clonagem e sequenciamento dos componentes do SRAA, permitindo aos cientistas o conhecimento de suas localizações no organismo. Assim, o conceito de via clássica expandiu-se, e hoje fala-se em

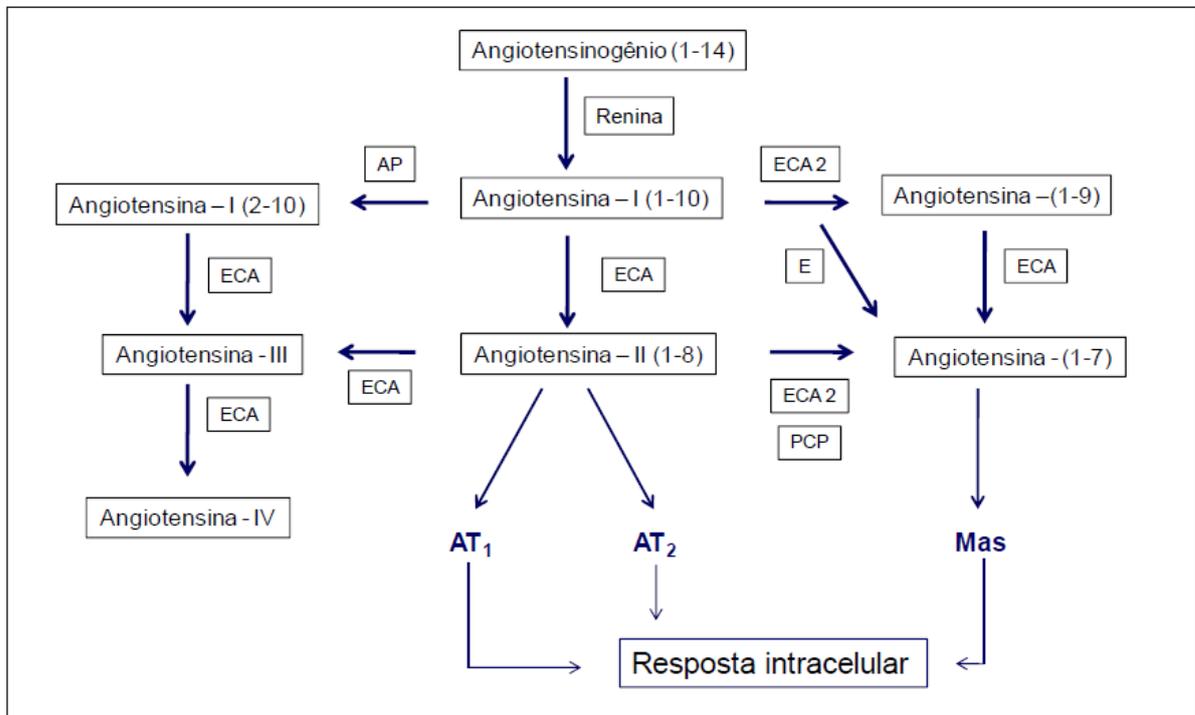
SRAA teciduais, entre eles, destaca-se o intra-renal (RIGATTO; BOHLKE; IRIGOYEN, 2004). Há anos, muitas das ações órgão-alvo da hipertensão têm sido atribuídas à hiperatividade no SRAA. Atualmente, está claro que o excesso de Ang II na DRC tem papel central na hiperfiltração dos néfrons funcionantes, levando a hipertrofia e alterações na estrutura do glomérulo que propiciam o surgimento de proteinúria. Assim como as ações hemodinâmicas, o papel pró-inflamatório da AngII ocorre via AT-1. Essas alterações são vistas em nefropatias diabética e não-diabética (REMUZZI; BERTANI, 1998).

Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o papel da AngII na progressão da DRC vai além das ações hemodinâmicas. Além das ações vasoativas, a AngII apresenta-se como uma citocina, que regula o crescimento celular, a inflamação e a fibrose (REMUZZI et al., 2005). Estudos *in vivo* relacionaram a AngII à produção de TNF α , IL-6, proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator nuclear - kappa B(NF- κ B), contribuindo para a inflamação glomerular e intersticial (SUZUKI et al., 2003). Este último é um complexo protéico que age como fator de transcrição, estimulando genes pró-inflamatórios relacionados a citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (LAWRENCE, 2009). Além do aumento dos fatores de crescimento citados, pesquisadores verificaram ativação de MAPK e TGF β em experimentos *in vitro* com células epiteliais em resposta a AngII. A presença destes dois fatores de crescimento é também verificada na fisiopatologia do DM, o que evidencia o papel sinérgico da AngII junto a outras doenças com potencial de lesar o parênquima renal, exacerbando o processo inflamatório (LAUTRETTE et al., 2005).

Outro impacto gerado pela AngII constitui a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no músculo liso e no endotélio vascular renal pela ativação das enzimas NADPH oxidases (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma reduzida). Estas enzimas encontram-se nas mitocôndrias e são consideradas os maiores mediadores de estresse oxidativo pela formação dos anions superóxido (O_2^-) e, indiretamente hidroxila (OH^-). Além disso, tem importante papel na redução de NO endotelial no sistema cardio-renal em virtude da formação de peroxinitrito ($ONOO^{-10}$) (MOLLNAU et al., 2002).

A figura 02 mostra o SRAA de acordo com conceitos recentes. A presença de uma grande variedade de enzimas conversoras, resulta na formação de peptídeos com diferentes potências e funções. Entre os mais estudados, a angiotensina 1-7 (Ang1-7) tem recebido atenção especial. Ang(1-7) é formada a partir da formação da enzima conversora de angiotensina - 2 (ECA-2) em angiotensina 1-9 Ang(1-9); esta última, pela ação da ECA é convertida em Ang(1-7). Outra forma de produção de Ang(1-7) ocorre a partir das ações da 2 ECA-2 ou policarboxipeptidase sobre AngII (PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA; SANTOS, 2013).

Figura 02. Visão simplificada do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.



Representação esquemática do Sistema Renina-Angiotensina e suas enzimas e suas enzimas conversoras de peptídeos. AP: Aminopeptidase; ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2: Enzima Conversora de Angiotensina 2; E: Endopeptidase; PCP: Policarboxipeptidase. Adaptado: Goodman & Gilman, 12ª edição.

Ao contrário dos efeitos da AngII, a Ang(1-7) apresenta perfil nefroprotetor através de efeitos antiproliferativos. Um estudo em macrófagos peritoneais de ratos tratados com Ang(1-7) após estimulação com LPS (lipopolissacarídeos), mostrou melhora na inflamação, evidenciado pela redução na expressão de TNF- α e IL-6. Outro efeito benéfico da Ang(1-7) é a sua ação vasodilatadora e natriurética. Ambos efeitos são mediados pela ação deste peptídeo sobre a proteína de membrana Mas, um receptor acoplado a proteína G que apresenta respostas antiproliferativas em patologias cardio-renais (SOUZA; COSTA-NETO, 2012).

1.4 Papel nefroprotetor dos inibidores da ECA

As intervenções terapêuticas em portadores de DRC, especialmente nas fases iniciais, são usualmente eficazes no retardo da progressão das doenças e na redução das complicações relacionadas à uremia, de forma a melhorar a qualidade e expectativa de vida desses pacientes

(LEVEY; CORESH, 2012). Entre os principais fármacos utilizados, os antagonistas do SRAA, representados pelos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs) pelos bloqueadores dos receptores de angiotensina II tipo 1 (BRAs). Existem ainda os inibidores diretos da renina (IDRs), que apresentam potencial efeito nefroprotetor, apesar da necessidade de mais estudos que estabeleçam alguma vantagem sobre as duas primeiras classes (DANDAN, 2012).

O efeito central dos IECAs consiste na inibição da formação de AngII a partir da angiotensina I, o que aumenta a natriurese, contribuindo para a redução da pressão arterial. Adicionalmente, estes fármacos inibem a cininase II, o que aumenta os níveis de bradicinina, um polipeptídeo vasodilador do grupo das cininas (FRANCO, 1998). Em 1993, Lewis e colaboradores publicaram o primeiro grande estudo clínico prospectivo randomizado utilizando o captopril, um IECA, em portadores de nefropatia diabética. Este estudo forneceu base para a utilização de fármacos desta classe visando a nefroproteção e o retardo da progressão para o estágio terminal da DRC.

Apesar do efeito anti-hipertensivo dos IECAs mostrar-se útil na melhora da hipertensão intraglomerular, estes fármacos apresentam outras ações nefroprotetores adicionais. Pelo fato da Ang II ter importante efeito no remodelamento vascular, a diminuição da sua formação têm sido associada à redução na produção de fatores pró-inflamatórios, no estresse oxidativo e na disfunção endotelial (TAAL; BRENNER, 2012). Estes efeitos justificam a maior eficácia na renoproteção dos IECAs, quando comparados aos betabloqueadores e antagonistas dos canais de cálcio (FRANCO, 1998). Em virtude da DRC está associada a expansão de volume, associado a redução na formação de Ang II a nível sistêmico, presume-se que os efeitos deletérios da AngII sejam em virtude de sua formação exacerbada a nível intra-renal (ROSENBERG, et al., 1994).

De acordo com sua estrutura química os IECAs podem ser classificados em três grupos. O primeiro deles apresenta grupo sulfidrila, e é representado pelo captopril. O segundo contém dicarboxila, e está quimicamente relacionado a fármacos como enalapril e ramipril. O último grupo é representado pelos IECAs que contêm fósforo em suas conformações, tendo como principal exemplo o fosinopril (DANDAN, 2012).

Entre os IECAs mais utilizados em modelos experimentais de DRC e na rotina clínica, o enalapril tem recebido atenção especial. Este, constitui um pró-fármaco hidrolisado por esterases no fígado. Seu metabólito mais estável, o enalaprilate, apresenta efeito mais potente em inibir a ECA, além de apresentar meia-vida superior à do próprio enalapril e a maioria dos outros IECAs (MANLEY, 2000).

1.5 Peptídeos natriuréticos e a via das guanilinas

Peptídeos natriuréticos (PNs) constituem um grupo de hormônios secretados por diferentes tecidos, em especial pelo coração, tendo entre suas principais funções a regulação da pressão arterial e o aumento da excreção renal de sódio. A maior parte dos receptores para PNs, apresenta atividade guanilato ciclase, e a ligação de um agonista aumenta a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), um segundo mensageiro que atua diretamente sobre transportadores iônicos de membrana ou pela ativação de proteínas quinases. Entre eles, estão incluídos os receptores da guanilato ciclase A, B e C (GC-A, GC-B e GC-C) (SCHLUETER et al., 2014).

No contexto dos PNs, a produção do peptídeo natriurético atrial (PNA), um hormônio de integração coração-rim, liberado pela fibra miocárdica atrial em resposta ao estímulo do estiramento dos átrios resultante do aumento do líquido extracelular. Sua ação principal se dá por sua ligação ao receptor GC-A, onde também se liga o peptídeo natriurético tipo B (PNB), que assim como o PNA, é produzido pelo coração. Enquanto isso, o peptídeo natriurético tipo C (PNC) liga-se ao receptor GC-B (D'SOUZA; DAVIS; BAXTER, 2004). O PNA tem atuação destacada sobre o rim, ao elevar a excreção renal de sódio e água, através da inibição da bomba de Na^+/K^+ ATPase e pela inibição da liberação de renina e aldosterona (SILVA; PINHEIRO; SANTOS, 2008).

Um receptor adicional onde ligam-se os PNs, é comumente chamado receptor de *clearance* (NPR-C), devido a sua capacidade em reduzir os níveis locais destes peptídeos natriuréticos. No entanto, seu domínio citoplasmático é pequeno e desprovido de atividade guanilato ciclase. O principal papel fisiológico de NPR-C é o de internalizar e degradar PNs, retirando-os da circulação, reduzindo a disponibilidade de PNA e PNB para agirem em GC-A (MIKUSIC et al., 2014). Nesse sentido, a interrupção do gene *Npr3* (responsável pela expressão de NPR-C) em camundongos nocaute, mostrou aumento dos níveis urinários de GMPc e redução da pressão arterial (MATSUKAWA et al., 1999). Adicionalmente, o mesmo induz ativação uma proteína G sensível a toxina pertussis (SINDIC; SCHLATTER, 2006).

Além dos peptídeos natriuréticos cardíacos, sabe-se atualmente, que outros órgãos são capazes de produzir peptídeos capazes de aumentar a excreção de sódio, como os hormônios intestinais. A base para estes achados teve início em 1976, quando demonstrou-se que, em ratos, o sódio ingerido na dieta era excretado mais rapidamente do organismo em comparação a mesma quantidade administrada por via intravenosa (CAREY; SMITH; ORTT, 1976). Esta

observação levou a hipótese da existência de um mediador fisiológico que ligasse o intestino ao rim, que aumentaria a excreção renal de sódio em resposta à ingestão de sal na dieta. Dessa forma, postulou-se que essa substância apresentava homologia sequencial muito próxima à da toxina termoestável (STa), presente na diarreia similar à observada na cólera, popularmente conhecida como diarreia do viajante (FORTE, et al., 1999). A STa constitui uma enterotoxina secretada por algumas cepas de *E. coli*, levando ao aumento da secreção de eletrólitos e de água pelo intestino. Os primeiros efeitos dos peptídeos STa sobre a atividade guanilato ciclase foram determinados *in vitro*, relacionando-os a alterações no transporte iônico intestinal (FIELD et al., 1978).

Uma década após a descoberta da STa e de seus efeitos intestinais, foram determinadas duas outras classes de mediadores capazes de aumentar a concentração intracelular de GMPc, sendo a primeira delas a do PNA, quando pesquisadores observaram que a administração de extrato contendo átrios cardíacos induzia expressiva natriurese e diurese em ratos (DE BOLD, 1985). A segunda classe foi denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT; ZAWADZIKI, 1980). Menos de sete anos mais tarde, foi descoberto que este fator era uma molécula gasosa, conhecida como óxido nítrico (NO), que era capaz de ativar a guanilato ciclase solúvel (IGNARRO et al., 1987).

Somente após a descoberta das duas classes de agonistas endógenos da guanilato ciclase, foi determinado um peptídeo endógeno que, assim como a STa, mostrava-se capaz de aumentar os níveis de GMPc no intestino. Este peptídeo foi purificado a partir de extratos de jejuno de ratos, sendo denominado guanilina (Gn) (CURRIE et al., 1992). Posteriormente, houve o isolamento de outro peptídeo, a uroguanilina (UGn), obtida através da urina de gambás (HAMRA et al., 1993).

Os peptídeos STa, Gn e UGn se ligam a um receptor presente na superfície da borda em escova do intestino e do cólon. Esse receptor foi identificado como membro da guanilato ciclase ligada à membrana da família guanilato ciclase, sendo designado GC-C (K). A sua ativação aumenta os níveis intracelulares de GMPc, o que induz uma cascata intracelular que culmina na ativação de proteínas quinases G II e A (PKGII e PKA), levando a ativação do canal regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR), que gera um aumento na secreção de cloreto, bicarbonato e água no intestino (SCHULZ et al., 1990; SINDIC et al., 2005).

A produção das guanilinas não se dá apenas ao nível do intestino. Foi detectada expressão de RNA mensageiro (RNAm) para UGn nas células do TP e do ducto coletor cortical (DCC). Dessa forma, o rim mostra-se capaz de sintetizar peptídeos reguladores de sódio no estado pós-prandial. Nesse sentido, Potthast e colaboradores (2001) sugeriram que a UGn seria

produzida no rim não em resposta a sinalização intestinal à ingesta aguda de sal, mas à hipertonicidade renal no epitélio tubular.

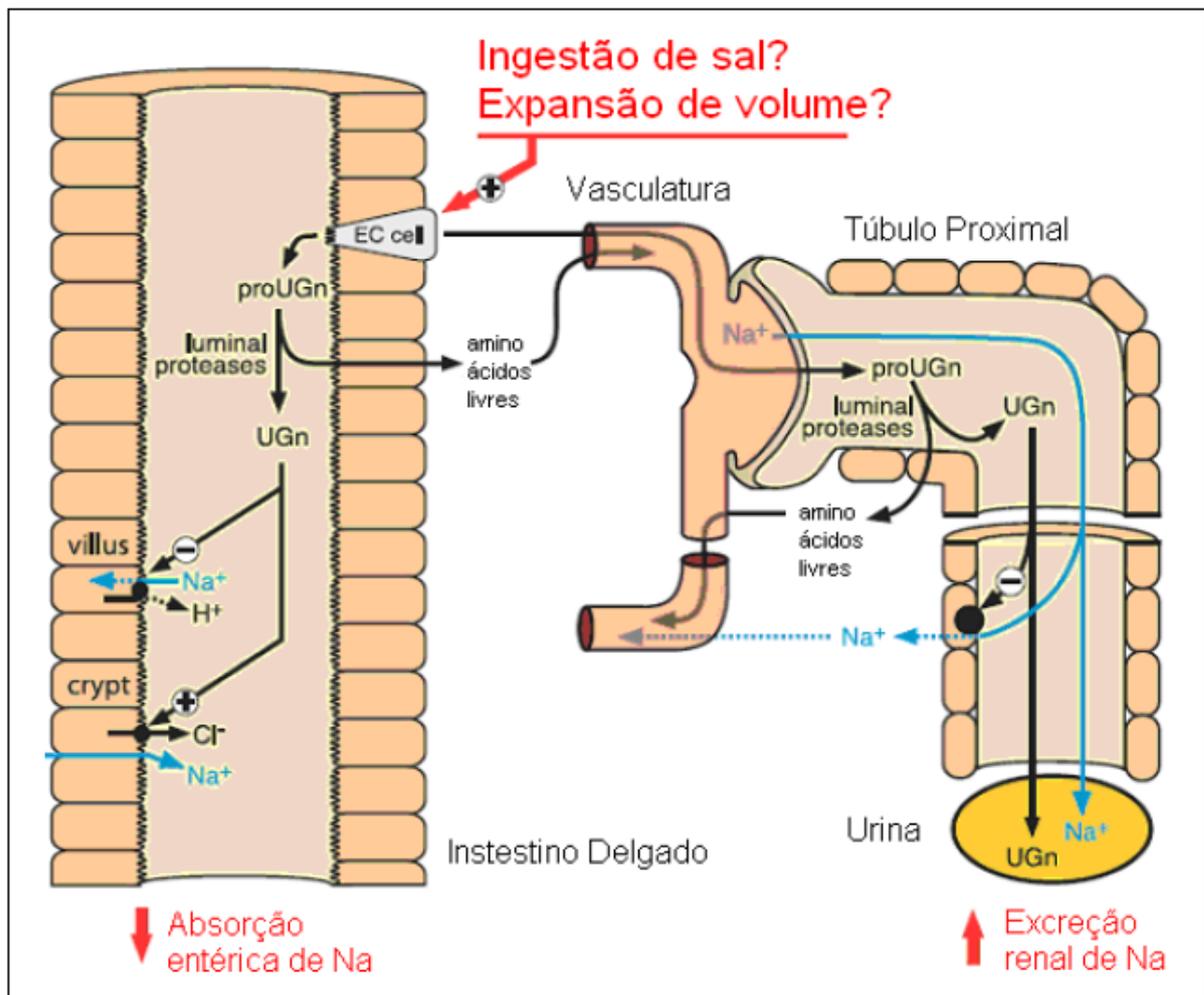
Embora atuem no sentido de aumentar a secreção de eletrólitos, Gn, UGn e peptídeos STa apresentam diferentes potências, determinadas pela afinidade de cada peptídeo ao receptor GC-C. Nesse sentido, Fonteles e colaboradores (1998), utilizando a técnica de rim isolado em ratos, observou que a UGn produzia efeito natriurético mais pronunciado que a Gn. Esta observação pode ser justificada pela interação do agonista com o receptor, de modo que a afinidade dos peptídeos STa ao receptor GC-C é dez vezes maior que a UGn, que por sua vez é cem vezes maior que a Gn (BASU; ARSHAD; VISWESWARIAH, 2010). A quantidade de pontes dissulfeto entre as cisteínas em cada peptídeo pode explicar a diferença na estimulação da produção de GMPc. Gn e UGn possuem apenas duas pontes dissulfeto, enquanto STa apresenta três. (CURRIE et al., 1992).

Com relação a estrutura, potência e locais de ação a STa, Gn e UGn apresentam algumas diferenças. Peptídeos STa e UGn possuem em suas sequências, resíduos de asparagina, o que conferem resistência a endoproteases presentes no rim. Enquanto isso, na Gn, esses resíduos estão ausentes, tornando-a sensível à hidrólise por quimotripsinas nos túbulos renais, fato que justifica a ausência de guanilina na urina (FORTE et al., 1999). Outra diferença está nas diferenças de ativação de GC-C dependentes de pH. Enquanto a Gn provoca maior aumento de GMPc em pH 8,5, a UGn o faz em pH 5,5 (BASU; ARSHAD; VISWESWARIAH, 2010). Gn e UGn são expressas inicialmente na forma de pré-pró-peptídeos, sendo posteriormente convertidos e armazenados na forma de pró-peptídeos inativos, denominados pró-Gn, nas células caliciformes intestinais, e pró-UGn, nas células enterocromafins do intestino (LI et al., 1995; PERKINS; GOY; LI, 1997). Através da ação de proteases no lúmen intestinal ocorre a conversão das formas inativas em formas ativas, Gn e UGn. Ambos os peptídeos apresentam a maioria das ações intestinais em decorrência do aumento intracelular de GMPc. Dessa maneira, as secreções de sódio, cloreto e bicarbonato encontram-se aumentadas, enquanto a absorção de sódio estaria parcialmente suprimida no intestino em resposta ao aumento de GMPc (QIAN et al., 2008; SINDIC, 2013). A figura 03 mostra algumas ações parácrinas e endócrinas da UGn.

Foi sugerido que, no rim, mais precisamente nas membranas da borda em escova de células do TP, ocorre a conversão proteolítica pró-UGn proveniente da circulação em UGn, que estão presentes em quantidades relativamente elevadas na urina (QIAN et al., 2008). A UGn tem importante papel no TP e no ducto coletor, regiões do néfron onde a regulação do sódio é primordial. No TP, o aumento de GMPc resulta em redução na fosforilação da isoforma NH₃ do permutador Na⁺/H⁺, elevando assim a excreção de sódio (LESSA et al., 2012). Outras

importantes consequências do aumento de GMPc constituem na inibição dos canais de potássio, gerando despolarização da célula e diminuição da força motriz para o transporte de sódio, além da provável inibição da Na^+/K^+ ATPase (SINDIC et al., 2006). Sabe-se também que a UGn atua na redução da expressão da Na^+/K^+ ATPase, reduzindo o gradiente de sódio disponível para o transporte acoplado de sódio (CARRITHERS et al., 2004). Um papel importante em resposta às guanilinas nos transportes de sódio e potássio foi detectado em uma linhagem de células de TP humano, denominada IHKE-1 (SINDIC et al., 2002).

Figura 03: Ações gerais da uroguanilina no eixo intestino-rim.



Representação esquemática do papel das guanilinas nos tecidos intestinal e renal. proGn: pró-Guanilina; proUGn: pró-Uroguanilina; Gn: Guanilina; UGn: Uroguanilina; Adaptado de Qian e colaboradores (2008).

Um mecanismo GMPc independente parece ser o principal efeito da UGn nas células principais do ducto coletor. Através deste mecanismo, ocorre uma ativação de receptor

acoplado a proteína G, com consequente ativação de fosfolipase A2 (PLA2), que cliva o ácido aracdônico dos fosfolídeos de membrana. Livre para agir, o ácido aracdônico inibe os canais ROMK das células principais, resultando em despolarização e consequente diminuição da força motriz para reabsorção de sódio (SINDIC, 2006).

No contexto da DRC, pouco se sabe sobre o papel dos peptídeos natriuréticos na fisiopatologia desta condição. Tem sido demonstrado aumento dos níveis plasmáticos do PNA em pacientes no estado final da DRC (HASEGAWA et al., 1986). Outro estudo, utilizando um modelo experimental de DRC apontou aumento dos níveis de PNA e redução na densidade de seus receptores alvo, o que sugere baixa resposta, como diurese e natriurese, apesar do aumento destes peptídeos (JIN et al. 1990).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A doença renal crônica (DRC) constitui um sério problema de saúde pública, com consequências negativas sobre a qualidade e a expectativa de vida da população, além de levar o Estado a altos gastos anualmente. Esta doença é silenciosa nas fases iniciais, e afeta diretamente os néfrons, através de lesões progressivas em todo o parênquima renal. Como consequência, o manejo de eletrólitos, especialmente o sódio, leva os túbulos a adaptações profundas no intuito de manter a homeostase.

No contexto da regulação do sódio na DRC, estudos têm demonstrado desequilíbrios entre as ações de hormônios que promovem a natriurese, como os peptídeos natriuréticos (PNs), e os que promovem retenção de sódio, como é o caso do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), observando-se uma hiperfunção destes em relação aos primeiros (SILVA; PINHEIRO; SANTOS, 2008).

Entre os PNs, destacam-se os hormônios sintetizados pelo coração, tendo como seu principal representante o peptídeo natriurético atrial (PNA) e os produzidos pelo intestino, denominados guanilina(Gn) e uroguanilina (UGn). Estudos revelaram aumento nos níveis plasmáticos de PNA e UGn em pacientes submetidos a terapia dialítica prolongada, apesar da expansão do volume extracelular, sugerindo que as lesões túbulo-glomerulares afetariam os receptores para estes agonistas (FUKAE et al., 2000). Nesse sentido, a hipótese de que a melhora na injúria renal, obtida na prática clínica através dos supressores do SRAA, acarrete na modulação do sistema dos PNs tem sido considerada por alguns pesquisadores.

Em vista disso, este estudo propõe investigar uma possível modulação dos PNs pela DRC e se o bloqueio do SRAA nesta condição, através da administração oral de enalapril, acarretará em mudanças na expressão de Gn, UGn e de seus receptores tanto a nível renal quanto intestinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a modulação da via das guanilinas na doença renal crônica experimental em resposta ao bloqueio do sistema-renina-angiotensina-aldosterona.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de expressão gênica peptídeos natriuréticos e de seus receptores, no intestino e no rim em resposta a nefrectomia 5/6 e em resposta ao tratamento com enalapril nesta condição;
- Quantificar os metabólitos intra-renais estáveis do óxido nítrico (NO) na DRC e sua resposta no contexto do bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).
- Determinar o efeito do enalapril sobre os parâmetros bioquímicos de função renal em animais submetidos a nefrectomia 5/6;
- Avaliar o tratamento do enalapril sobre o peso do rim remanescente na doença renal crônica experimental;
- Analisar as possíveis alterações histopatológicas pelo enalapril na doença renal crônica (DRC) em ratos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo foi realizado com ratos machos Wistar provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico tinham aproximadamente três meses de idade, com peso entre 250-300g.

Os animais foram devidamente acondicionados em sala aclimatada à temperatura de 23° C, com estantes apropriadas e circulação de ar. Os animais permaneceram sob o ciclo claro-escuro de 12/12h com água e ração *ad libitum*, no Laboratório de Farmacologia de Venenos Toxinas e Lectinas (LAFAVET) no Instituto de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará.

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA) e aprovado sob o número de protocolo 72/14.

4.2 Indução da DRC

Para a indução da DRC, optamos pelo modelo experimental de nefrectomia 5/6 descrito por Fujihara e colaboradores (2005). Um único procedimento cirúrgico realizou-se para a retirada de 5/6 da massa renal dos animais (o rim direito por inteiro e infarto de 2/3 do rim esquerdo).

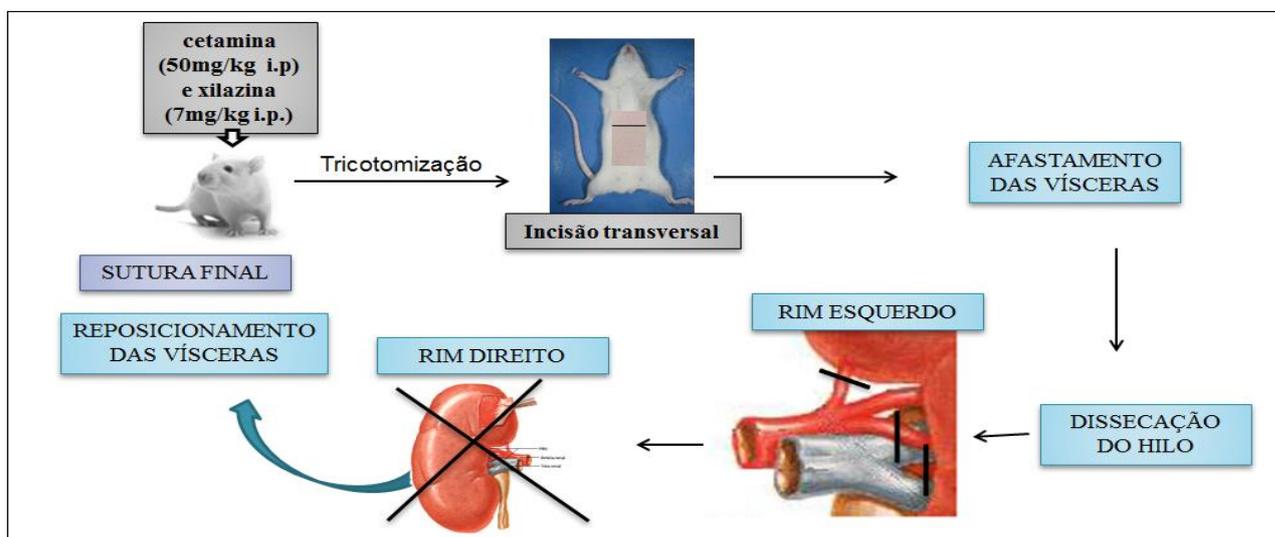
Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Posteriormente, tiveram a região abdominal tricotomizada e a temperatura monitorada através de um termômetro retal. Após assepsia da área com iodo povidona (1% de iodo ativo), foi realizada laparotomia transversal para exposição dos rins. As vísceras foram rebatidas para a esquerda para exposição do rim esquerdo do animal, que tiveram o hilo dissecado para visualização dos ramos anteriores e do ramo posterior da artéria renal. A remoção de 2/3 da massa do rim esquerdo realizou-se por isquemia seletiva de três ramos da artéria renal – os ramos que perfundem as regiões posterior, anterior inferior e anterior média – para a qual utilizamos fio cirúrgico 6.0 com agulha de 13 mm (PROLENE®).

Em seguida, as vísceras foram hidratadas com solução salina estéril e rebatidas para direita para exposição do rim direito, que foi descapsulado – para preservação da glândula suprarrenal – e removido após clampeamento do hilo renal com fio cirúrgico.

As vísceras foram reposicionadas e a parede abdominal suturada, utilizando fio cirúrgico de Nylon 3.0. A figura 04 demonstra as principais etapas do presente modelo experimental.

Antes da cirurgia e após 24 horas, cada animal recebeu dipirona sódica (25 mg/kg) i.p. Logo após a cirurgia, os animais foram mantidos em placa aquecida a 37°C até a recuperação da anestesia, ao fim da qual foram acomodados em caixas individuais com água e ração *ad libitum*.

Figura 04. Etapas do modelo cirúrgico de nefrectomia 5/6 em ratos



Representação esquemática do modelo de Nefrectomia 5/6 realizado no Laboratório de Farmacologia de Toxinas Venenos e Lectinas (LAFAVET). Fonte: o autor.

4.3 Protocolo experimental

O modelo experimental buscou induzir DRC em estágio intermediário através da nefrectomia de 5/6 da massa renal. Nos grupos em que foi administrado enalapril, os animais foram tratados, decorridas quatro semanas da cirurgia, com enalapril numa dose diária correspondente a 10 mg/kg dissolvidos na água ingerida nas gaiolas. Durante os experimentos, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

- **Grupo SHAM**, onde os animais tiveram os dois rins apenas manipulados, sem realização de nefrectomia 5/6, e foram sacrificados após 10 semanas;

- **Grupo SHAM+E**, onde os animais tiveram os dois rins apenas manipulados, mas sem realização de nefrectomia 5/6, sendo submetidos ao tratamento oral com enalapril (10mg/kg) da 5ª a 10ª semana, ao fim da qual foram sacrificados;
- **Grupo Nx**, no qual os animais foram submetidos à nefrectomia 5/6 e foram sacrificados para avaliação da progressão da doença após 10 semanas;
- **Grupo Nx 5/6 + Enal**, no qual animais foram submetidos a nefrectomia 5/6 e tratados com enalapril (10mg/kg) v.o. entre a 5ª e a 10ª semana após o procedimento cirúrgico, ao fim da qual foram sacrificados.

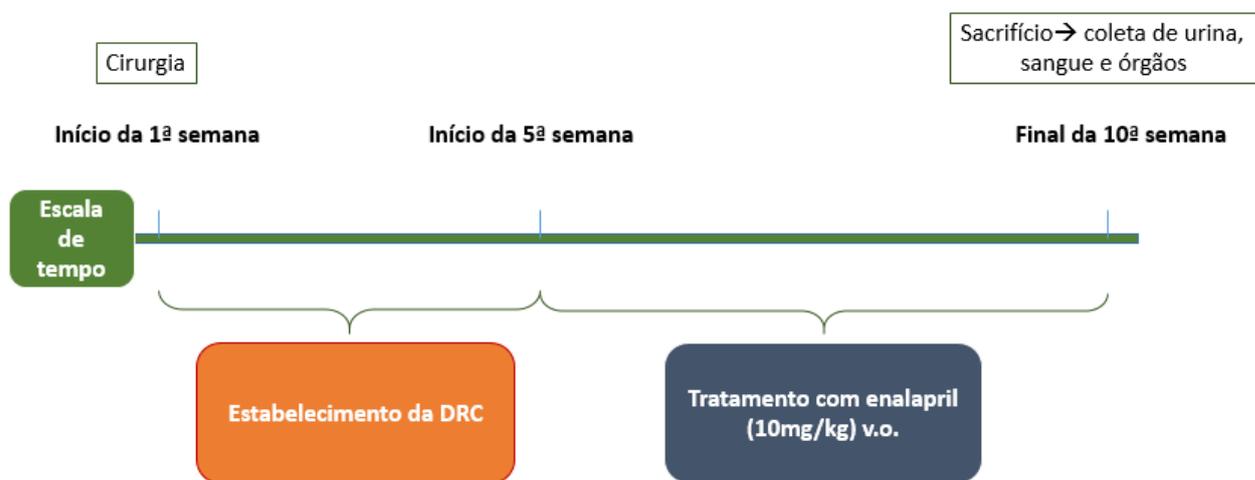
O período de 4 semanas sem intervenção farmacológica após a nefrectomia 5/6 faz-se necessário para o estabelecimento da inflamação e das principais alterações morfológicas encontradas na DRC experimental. A figura 05 mostra o protocolo experimental com os animais do grupo SHAM e Nx, os quais não receberam tratamento durante as 10 semanas do estudo. Por outro lado, a figura 06 mostra que nos grupos SHAM+E e Nx+E o tratamento foi iniciado apenas a partir do início da 5ª semana, quando os animais receberam o enalapril dissolvido na água, calculado para uma dose de 10mg/kg.

Cada grupo continha oito animais (n=8), totalizando 32 animais. O seguinte protocolo foi seguido: antes do sacrifício, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, onde permaneceram por 36 horas sob aclimatação com água e ração *ad libitum*. Nas últimas 12 horas os animais foram submetidos ao jejum, no intuito de evitar contaminação da urina com ração. Após este período, foi determinado o volume e coletado a urina para o cálculo do *clearance* de creatinina e da proteinúria. Realizou-se coleta de 2 mL de sangue por venopunção (veia cava) para dosagem de marcadores da função renal. A seguir os animais foram sacrificados para a retirada do rim remanescente destinado à análise histológica. Coletou-se uma parte do rim esquerdo e porções próximas do jejuno e íleo do intestino de cada animal.

Figura 05. Desenho experimental dos grupos sem tratamento (SHAM e Nx).



Figura 06. Desenho experimental dos grupos tratados com enalapril (SHAM+E e Nx+E).



4.4 Avaliação de parâmetros gerais

Os animais foram acomodados em gaiolas individuais e avaliados num período de 12 horas. Para cada animal, os seguintes procedimentos foram adotados:

- Avaliação do peso corporal;
- Avaliação do volume urinário.

Usando as amostras coletadas de urina e sangue, foram avaliados parâmetros bioquímicos de função renal: creatinina e uréia sérica e creatinina e proteína urinária.

4.5 Análise da função renal

4.5.1 Procedimentos realizados nas amostras de sangue

Após a cirurgia, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rotações por minuto (rpm). Finalizada esta etapa, foi retirado com o auxílio de uma pipeta calibrada o soro das amostras de sangue. Todas as amostras foram armazenadas em freezer à -20°C até o dia das análises bioquímicas.

4.5.2 Dosagem da creatinina sérica e urinária

Para a determinação quantitativa de creatinina no soro e na urina utilizou-se o método de Jaffé modificado, através do kit Creatinina K (Ref.:96) da Labtest. Os resultados foram expressos em mL/min.

4.5.3 Cálculo da Taxa de Filtração Glomerular (TGF)

Para a determinação da função renal dos animais no decorrer do experimento, foi estimada a TFG, através do *clearance* de creatinina (Cl_{creat}). Para o cálculo da função renal, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$Cl_{creat} = CU \times V / Cp \times T \times M$$

Sendo: **CU** = creatinina urinária, em mg/dL; **V** = volume urinário, em mL/min; **CP**= creatinina plasmática, em mg/dL; **T**= tempo, em minutos; **M**=peso do rim esquerdo em grama.

Para coleta de urina de 24 horas os animais foram colocados em gaiolas metabólicas. Em cada frasco coletor de urina adicionou-se 1mL de óleo mineral, no intuito de evitar a evaporação de alguma fração da urina.

4.5.4 Dosagem de uréia sérica

No intuito de determinar quantitativamente a uréia no soro dos animais, utilizou-se o Kit uréia CE (Ref:27), seguindo o princípio do método colorimétrico do azul de indofenol. Ao fim da dosagem, os resultados foram expressos em mg/dL.

4.5.5 Determinação de proteínas na urina

Para dosagem de proteínas na urina, utilizou-se o Kit Sensitprot (Ref.:36) da Labtest, através do método colorimétrico do vermelho de piragalol. Os resultados foram expressos em miligrama por 24 horas (mg/24h), utilizando-se do valor do volume urinário de cada animal nas gaiolas metabólicas.

4.5.6 Cálculo da fração de excreção de sódio (FENa⁺)

Utilizando o método eletrodo íon seletivo, por meio do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil), foi mensurado os níveis séricos e urinários de Na⁺. Posteriormente, calculou-se a FENa⁺, a partir da seguinte fórmula:

$$FENa^{+} = (\text{Clearance de Na}^{+} / \text{Clearance de creatinina}) \times 100$$

4.6 Dosagem de nitrito/nitrato (NO_x) no tecido renal

Imediatamente após o sacrifício, uma alíquota do rim esquerdo foi retirada e armazenada sob refrigeração à -80°C. No dia da análise, amostras foram descongeladas e posteriormente pesadas. Cada tecido foi macerado para uma proporção de 50 mg em 500 µL de cloreto de potássio (KCl) à 1,15%. O homogenato foi centrifugado em tubos à uma rotação de 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido para análise de NO_x. A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador para a produção de óxido nítrico, por meio da determinação total de nitrito/nitrato (NO₂⁻/NO₃⁻) em tecido renal. A dosagem de NO₂⁻ foi feita pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1982). Para o ensaio, 100 µL do homogenato foram adicionados em uma placa de 96 poços e incubados por 12 horas com 40 µL de tampão contendo a enzima nitrato redutase. Em seguida, foram adicionados 80 µL do reagente de Griess em

cada poço da placa e incubados por 10 min à temperatura ambiente, sendo posteriormente determinada a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de NO_2^- foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 (0,78-200 μM), processada de maneira semelhante.

4.7 Avaliação da transcrição gênica

4.7.1 Extração do RNA total

As amostras de intestino e rim foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Para cada amostra foi preparado um homogenato contendo 40 mg de cada tecido e solução de lise. Em seguida, a extração do RNA foi realizada com o kit AurumTM total RNA (Bio-Rad, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, 1 μL de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, USA), com intuito de verificar a qualidade das amostras e quantificá-las para fornecer RNA para a etapa de síntese do DNA complementar (cDNA).

4.7.2 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA), seguindo as instruções do fabricante. O protocolo da reação continha 1 μL da enzima transcriptase reversa, 4 μL do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para 200 ng/ μL aleatório e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para conter 20 μL . O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, USA) foi 25°C por 5 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C até a sua utilização em PCR em tempo real (qPCR).

4.7.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Foram avaliados na transcrição do RNAm os genes relacionados a peptídeos natriuréticos (PNA, Gn e UGn), de receptores da guanila ciclase (GC-A e GC-C) e de clearance (NPR-C). O gene de referência para o rim foi GADPH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), enquanto para o intestino utilizou-se o BM-2.

Para a reação utilizou-se 10 μL de Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), 2 μL de cada iniciador (0,2 μM) e 1 μL do cDNA de cada amostra completando com água livre de nucleases para um volume final de 20 μL . Todos os iniciadores encontram-se tabela 01. As amplificações foram finalizadas com a curva de melting, realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico. Para o gene de GC-C utilizou-se as temperaturas de 95°C por 20 min, para a desnaturação do DNA, 63°C por 20 min, referente ao processo de anelamento dos primers e 72°C por 45 min, para a formação do produto do PCR. Para os demais genes, somente a temperatura da fase de desnaturação do DNA, 60°C, diferiu em relação ao GC-C.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, USA) e os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, onde $\Delta\Delta\text{CT}$ (CT gene alvo – CT gene de referência do grupo tratado) / (CT gene alvo – CT gene de referência do controle) como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 01: Sequências de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: Senso e A: Anti-senso).

Genes	Localização estudada	Sequencia dos iniciadores (5' → 3')
PNA	Rim	S: CTGCTTCGGGGGTAGGATT A: TCGGTACCGGAAGCTGTTG
Gn	Intestino e Rim	S: GGG AAGTACAGGAGCCCACA A: TGTTTGGGTCCTGAGCAATG
UGn	Intestino e Rim	S: GATCCCCAGCAGCAGAAAAG A: AGCCCGTACAGGCAACATTT
GC-A	Rim	S: GAACCGAAGCTTCCAGGTG A: GTGGATATCCCAGAGGCCAGT
NPR-C	Rim	S: TCGTGGAAGAGAGGGGACAA A: GAGGAGGATGGCATCATGGA
GC-C	Rim e intestino	S: ATGACGTCACCTCCTGGGCTT A: GTGGCACTTCTGCCTCACCT
GADPH	Rim	S: GTTACCAGGGCTGCCTTCTCT A: AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA
BM-2	Intestino	S: CGTGATCTTTCTGGTGCTTGTC A: TTCTGAATGGCAAGCACGAC

Fonte: RTprimer: <http://medgen.ugent.be/rtpriimmerdb/search.php>

4.8 Análise histopatológica

O rim esquerdo foi seccionado transversalmente e armazenados em cassetes histológicos que foram imersos em formol 10% tamponado por 48 horas. Após este período as amostras foram armazenadas para o processo de fixação. Após a fixação do tecido as amostras foram processadas para exame histológico em processador automático de tecidos Luper modelo PT09 (histotécnico), para ser então desidratadas em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Ao fim desta etapa, realizou-se a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. Em blocos de parafina o material foi cortado em 5 μ m de espessura e colocado em lâminas para o processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando micrótomo de impacto (Poicut S, Leica, Alemanha), equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). O tipo de coloração utilizada foi a de hematoxilina-eosina. A análise histopatológica foi realizada pelo patologista Msc. Daniel de Araújo Viana e foi registrada através de fotomicrografias.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em diferentes aumentos de lente, sendo fotografadas as principais imagens.

4.9 Análise estatística

Para análise estatística, todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através do programa GraphPad Prism utilizando análise de variância (ANOVA) e pós- teste de Bonferroni para os parâmetros bioquímicos, e teste não paramétrico de Mann-Whitney para análise da transcrição gênica. Valores de $P < 0,05$ foram considerados para a análise.

3 RESULTADOS

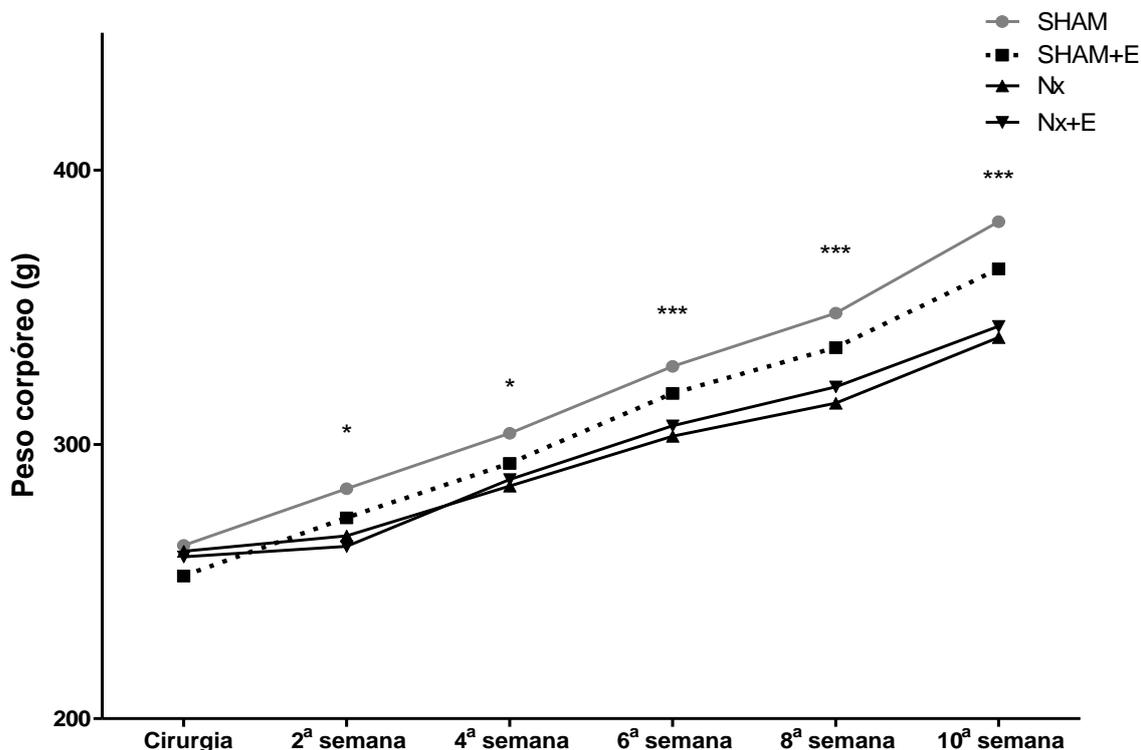
5.1 Taxa de sobrevida dos animais

Durante as 10 semanas do protocolo experimental, não foram verificadas mortes de nenhum animal nos grupos SHAM e SHAM+E. No grupo Nx, a sobrevida foi de 90% até a segunda semana e reduziu-se para 80% ao fim da décima semana. No grupo Nx+E a sobrevida foi de 85% até a segunda semana, permanecendo neste valor ao fim das 10 semanas.

5.2 Peso corpóreo e renal

A nefrectomia 5/6 reduziu significativamente o peso dos animais da 2^a à 10^a semana após o procedimento cirúrgico. O tratamento com o enalapril não foi capaz de reduzir esta queda, conforme observado na figura 07.

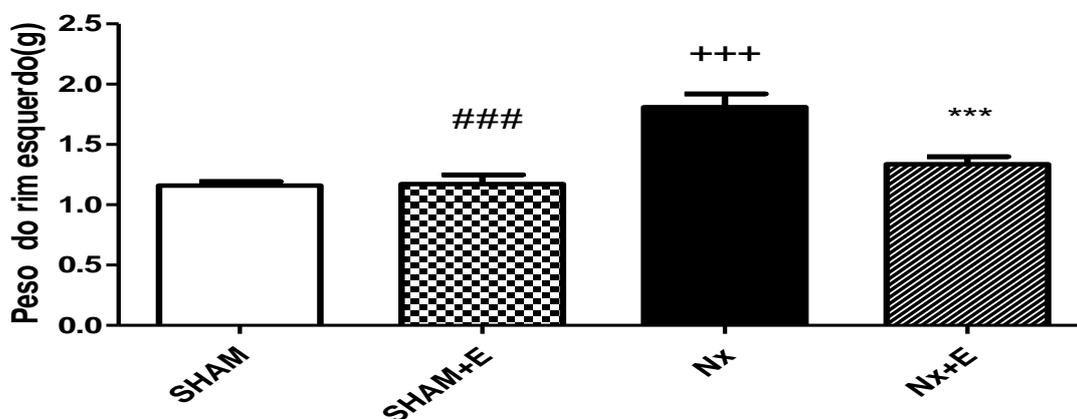
Figura 07: Curva de crescimento animal no decorrer do protocolo experimental



A figura expressa a média \pm E.P.M do peso dos animais em cada grupo a cada duas semanas a partir do procedimento cirúrgico até a semana do sacrifício. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre o grupos SHAM vs Nx (* $P < 0,05$; *** $p < 0,001$)

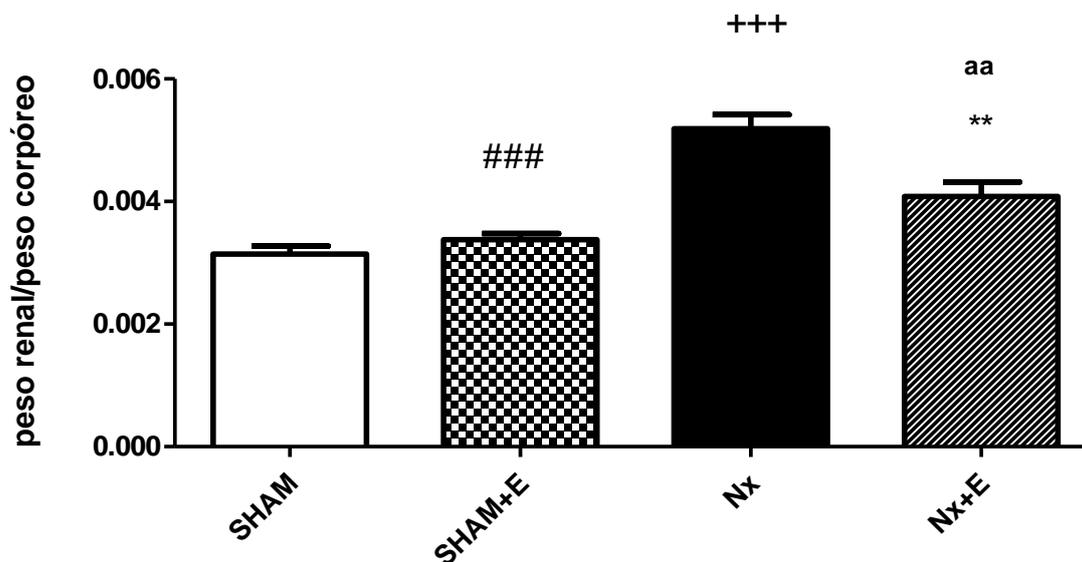
Após a determinação do peso do rim esquerdo de cada animal, foi observado que o grupo Nx apresentou maior massa em relação ao grupo SHAM, o que demonstra que a nefrectomia 5/6 foi eficaz em induzir hipertrofia e edema renal em resposta a sobrecarga dos néfrons remanescentes. O grupo Nx+E apresentou peso renal reduzido comparado a Nx, conforme demonstrado na figura 08. A figura 09 ilustra a razão do peso do rim esquerdo em função do peso corpóreo total dos animais ao final do protocolo experimental, o que reforça o ganho de massa renal.

Figura 08: Efeito do tratamento com enalapril no peso renal após a nefrectomia 5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do peso do rim esquerdo em cada grupo. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. As seguintes diferenças significativas foram determinadas: +++P<0,001 vs SHAM, ***P<0,001 vs Nx.

Figura 09: Efeito do enalapril sobre a razão do peso renal pelo peso corpóreo dos animais 10 semanas após a nefrectomia 5/6.



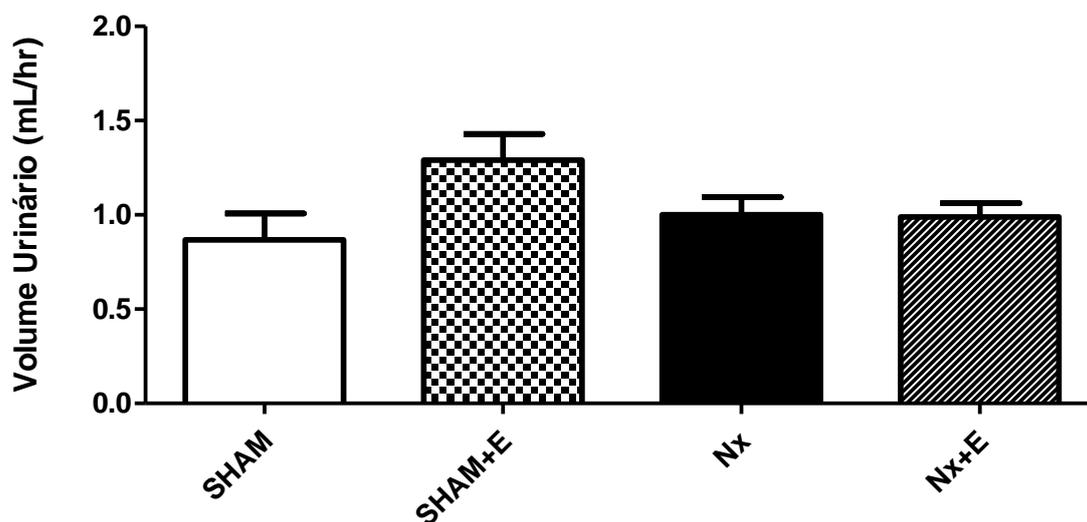
Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da razão do peso do rim esquerdo pelo peso corpóreo total dos animais de cada grupo. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. As seguintes

diferenças significativas foram determinadas: +++ $P < 0,001$ vs SHAM, ** $P < 0,01$ vs Nx; aa $P < 0,01$ vs SHAM.

5.3 Determinação do fluxo urinário

Conforme expresso na figura 10, não houve diferenças significativas no volume urinário dos animais nefrectomizados em relação ao grupo SHAM. O tratamento oral com enalapril em animais nefrectomizados também não resultou em alterações no fluxo urinário em relação ao grupo Nx. Este achado aponta que o período de 10 semanas posteriores à ablação renal não foram suficientes para afetar a diurese dos animais.

Figura 10: Efeito do enalapril no volume urinário em animais controles e nefrectomizados.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do fluxo urinário por hora em cada grupo. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

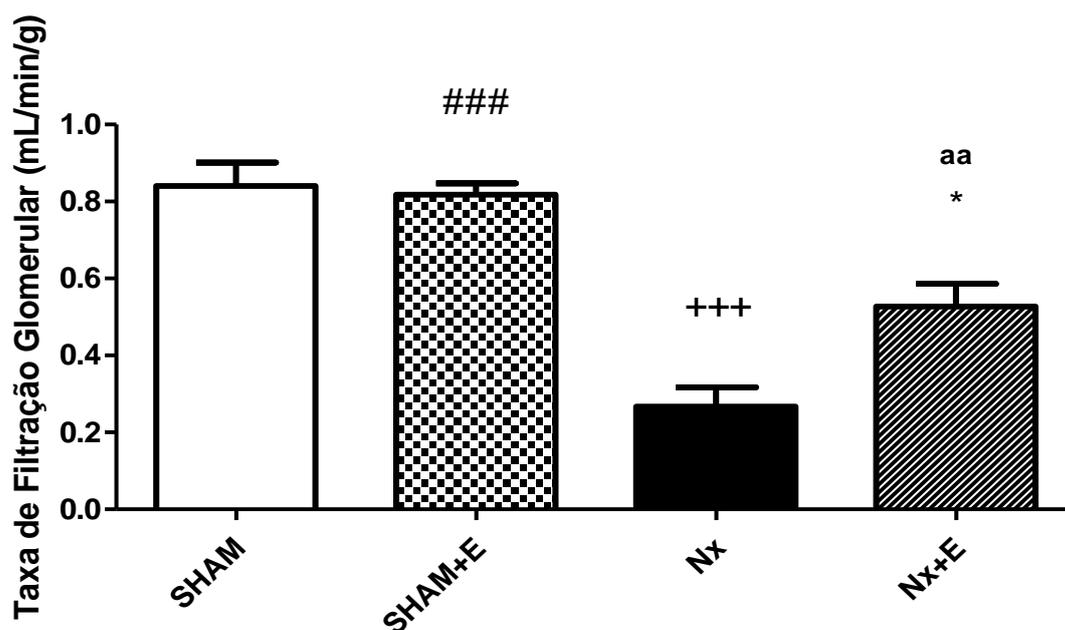
5.4 Avaliação de parâmetros de função renal

5.4.1 Função glomerular

No intuito de avaliar a função glomerular, foram determinados os níveis de creatinina no soro e na urina dos animais, com o intuito de estipular a TFG.

Observou-se uma acentuada queda na TFG induzida pela nefrectomia 5/6. A figura 11 mostra a reversão parcial da queda da TFG do grupo Nx+E em relação ao grupo Nx. Dessa forma, o tratamento com enalapril constituiu uma alternativa eficaz para a melhora na dinâmica glomerular, retardando a progressão da doença.

Figura 11: Efeito do tratamento com enalapril na TFG em animais com DRC experimental.

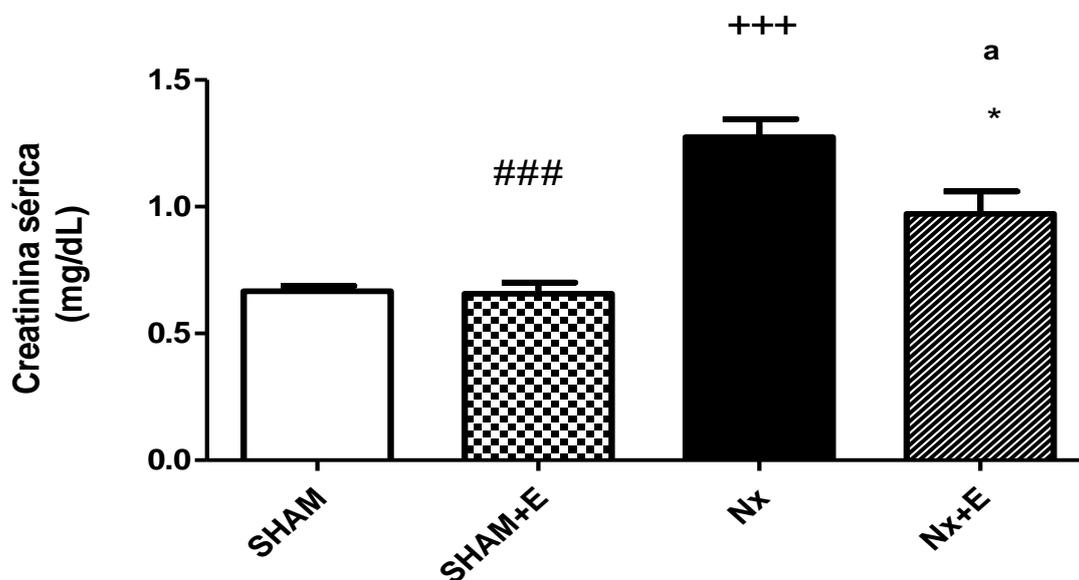


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da taxa de filtração glomerular nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: Nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos SHAM+E vs Nx (### $P < 0,01$); Nx vs SHAM (+++ $P < 0,001$) e Nx+E vs Nx (* $P < 0,05$); aa $P < 0,01$ vs SHAM.

O modelo experimental abordado neste estudo mostrou-se eficaz em induzir aumento significativo dos níveis de creatinina na circulação, o que corrobora com os resultados da DRC observados na clínica. O tratamento oral com enalapril atenuou os níveis elevados de creatinina em relação ao grupo lesado, conforme observado na figura 12.

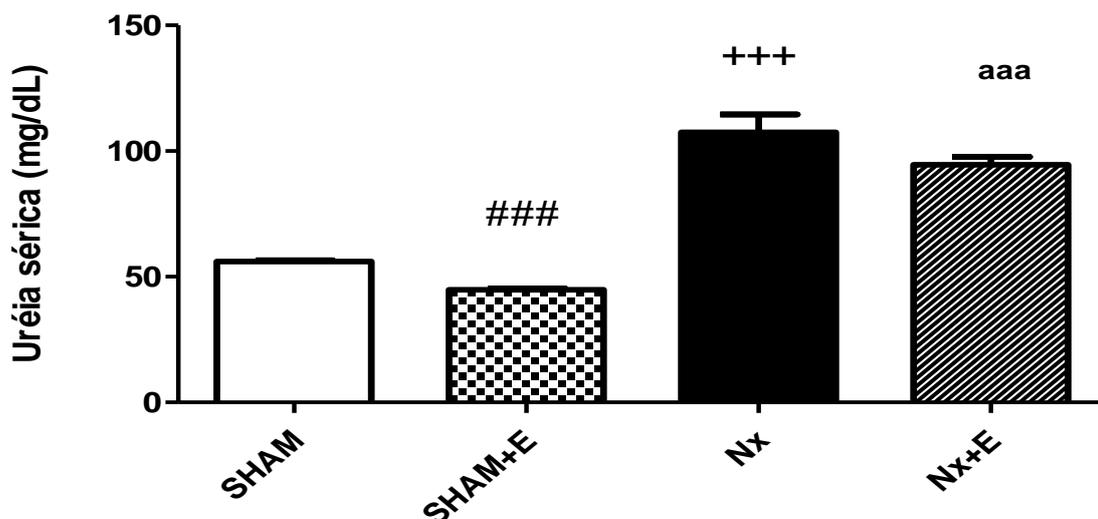
A nefrectomia 5/6 provocou um aumento significativo de uréia nos níveis séricos dos animais, reforçando o achado de uremia na DRC. Apesar da melhora na TFG no grupo Nx+E, o tratamento oral com enalapril durante 6 semanas mostrou-se ineficaz na melhora dos níveis de uréia no sangue, conforme observado na figura 13.

Figura 12: Efeito do tratamento com enalapril nos níveis de creatinina sérica em animais com DRC experimental.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos níveis séricos de creatinina nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos SHAM+E vs Nx (###P<0,01); Nx vs SHAM (+++P<0,001) e Nx+E vs Nx (*P<0,05); Nx+E vs SHAM (aP<0,05)

Figura 13: Níveis de uréia sérica em ratos nos diferentes grupos em estudo.

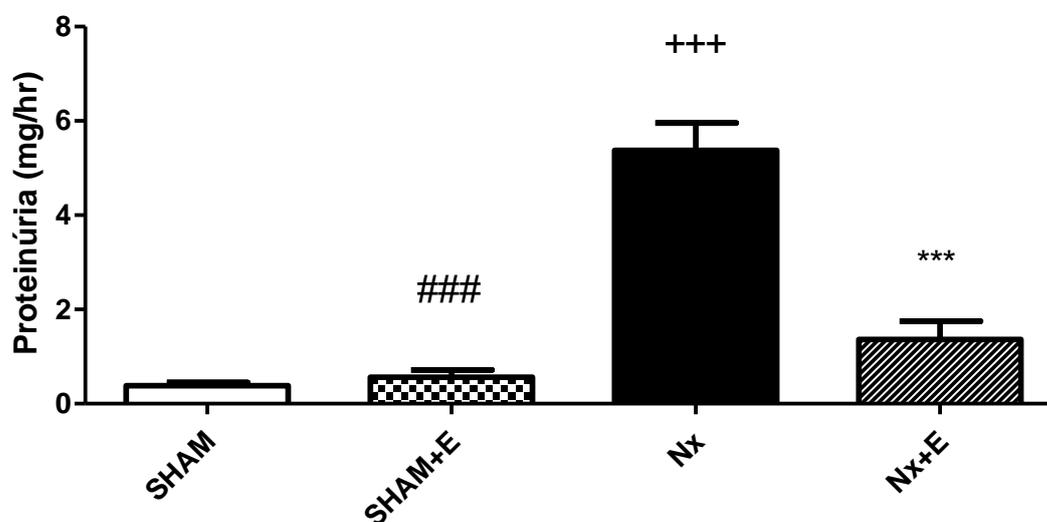


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos níveis séricos de uréia nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas apenas entre os grupos SHAM+E vs Nx (###P<0,01) e Nx vs SHAM (+++P<0,001); Nx+E vs SHAM (aaaP<0,001)

A quantificação de proteínas totais na urina constitui um marcador fundamental para avaliação da função glomerular na DRC.

Observou-se um aumento acentuado dos níveis de proteínas na urina no grupo Nx em relação ao grupo SHAM, conforme observado na figura 14. Essa diferença reflete a injúria ocasionada nos componentes estruturais do glomerulo observada na progressão da DRC. Este estudo demonstrou uma expressiva reversão da proteinúria induzida pelo enalapril, reforçando o papel antiproteinúrico dos inibidores da ECA. A tabela 02 mostra os valores quantitativos dos parâmetros de função glomerular dos grupos em estudo.

Figura 14: Efeito do enalapril na proteinúria em animais submetidos a nefrectomia 5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da proteinúria em miligrama por hora nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos SHAM+E vs Nx (###P<0,01); Nx vs SHAM (+++P<0,001); Nx+E vs Nx (**P<0,001).

Tabela 02: Parâmetros de função glomerular nos diferentes grupos experimentais

PARÂMETROS	SHAM	SHAM+ E	NX	NX+E
TFG (mL/min/g de rim)	0.8400 \pm 0.06122	0.817 \pm 0.0295###	0.2671 \pm 0.04993+++	0.5271 \pm 0.05952*aa
CREATININA (mg/dL)	0.6667 \pm 0.02108	0.657 \pm 0.04286###	1.275 \pm 0.07008+++	0.9714 \pm 0.08921*a
URÉIA (mg/dL)	55.00 \pm 4.012	48.71 \pm 5.532###	108.0 \pm 5.572+++	96.83 \pm 4.078aaa
PROTEINÚRIA (mg/h)	0.3842 \pm 0.06523	0.5667 \pm 0.1488###	5.377 \pm 0.5780+++	1.363 \pm 0.3850***

###P<0,001 vs Nx

+++P<0,001 vs SHAM

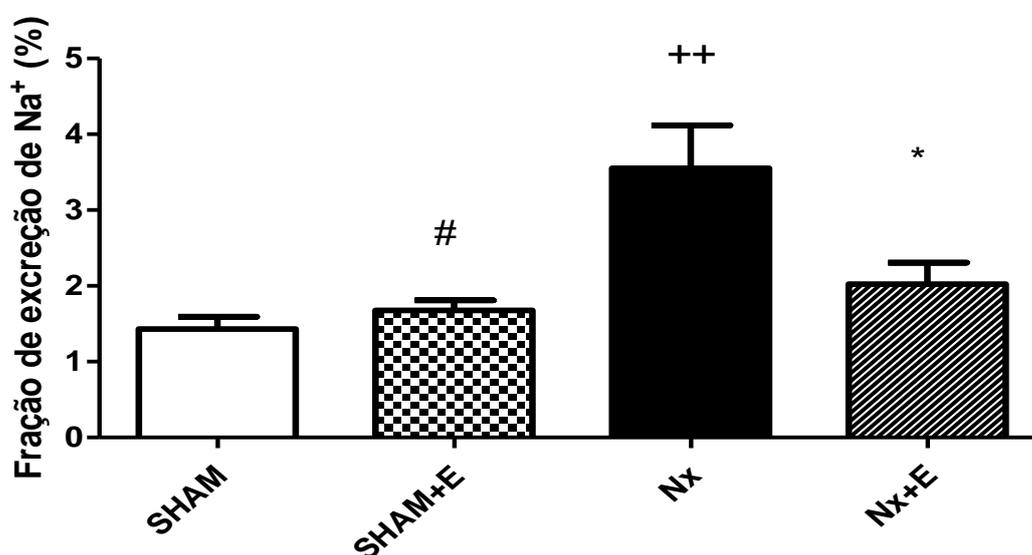
*P<0,05 vs Nx; **P<0,001 vs Nx

^aP<0,05 vs SHAM; ^{aa}P<0,01 vs SHAM; ^{aaa}P<0,001 vs SHAM

5.4.2 Função tubular

A fração de excreção de sódio (FENa⁺) representa o percentual de sódio filtrado pelo glomérulo que não é reabsorvido a nível tubular. O grupo submetido a nx5/6 apresentou maior FENa⁺ em relação aos grupos SHAM e SHAM+E. Enquanto isso, o tratamento oral com enalapril no grupo nefrectomizado resultou em redução da FENa⁺ em relação a Nx, conforme observado na figura 15.

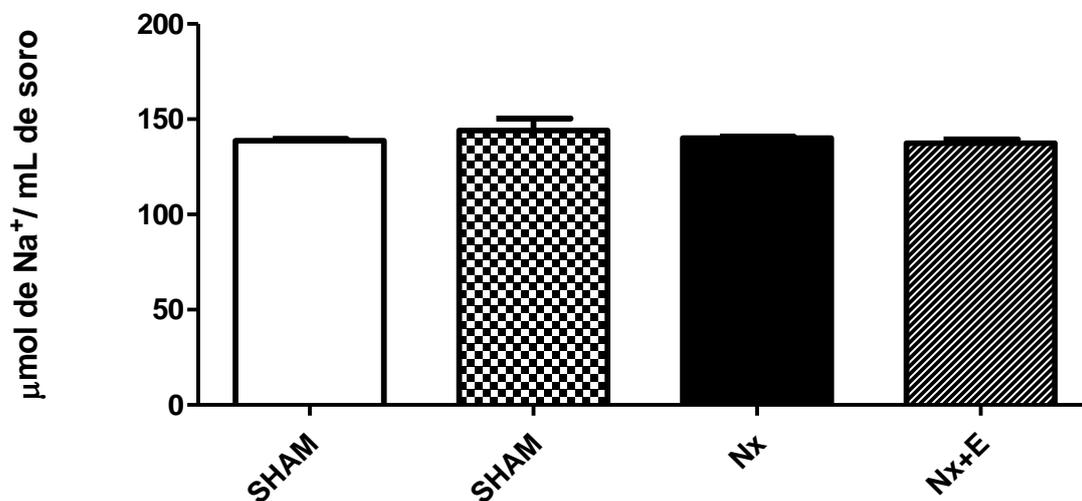
Figura 15: Efeito do enalapril na fração de excreção de sódio em animais submetidos à nefrectomia 5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da fração de excreção de sódio nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos SHAM+E vs Nx (#P<0,05); Nx vs SHAM (++P<0,01); Nx+E vs Nx (*P<0,05).

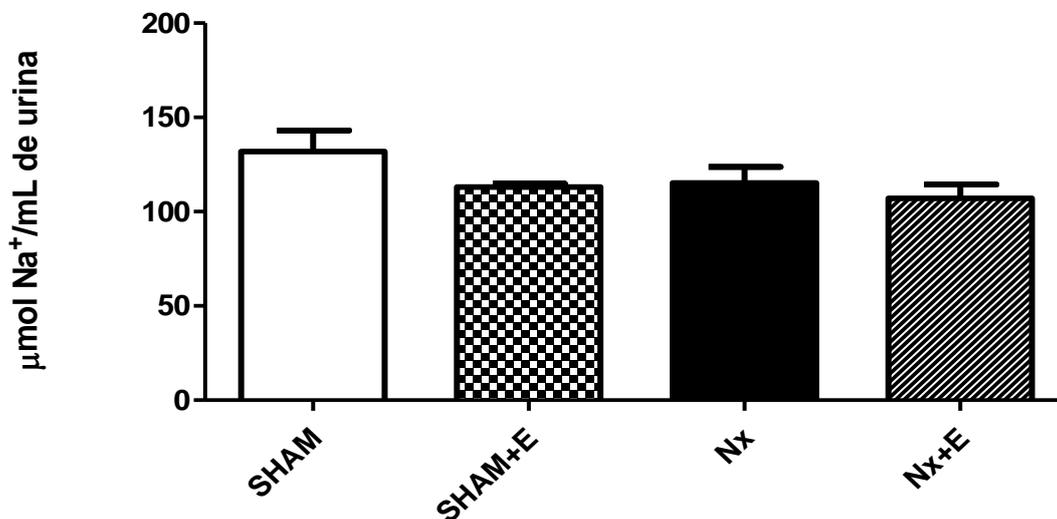
Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de sódio no soro dos animais dos diferentes grupos em estudo, conforme verificado na figura 16. Da mesma forma não houve diferenças entre os níveis de sódio urinário entre os grupos, conforme observado na figura 17. A tabela 03 apresenta os valores dos parâmetros de sódio sérico e urinário, além da FENa⁺.

Figura 16: Efeito do enalapril nos níveis de sódio séricos em animais submetidos à nefrectomia 5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos níveis de sódio séricos nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

Figura 17: Efeito do enalapril nos níveis de sódio urinário em animais submetidos à nefrectomia 5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos níveis de sódio urinários em cada grupo. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 03: Processamento do sódio nos diferentes grupos experimentais

PARÂMETROS	SHAM	SHAM+ ENAL	NX	NX+E
FENa ⁺	1.43 \pm 0.1625	1.677 \pm 0.1322 [#]	3.552 \pm 0.5667 ⁺⁺	2.025 \pm 0.2821 [*]
Na ⁺ sérico (µmol/mL)	138.7 \pm 0.9184	144.0 \pm 6.338	140.0 \pm 0.7071	137.4 \pm 2.021
Na ⁺ urinário (µmol/mL)	131.9 \pm 11.14	113.0 \pm 1.958	115.3 \pm 8.473	107.0 \pm 7.381

[#]P<0,05 vs Nx

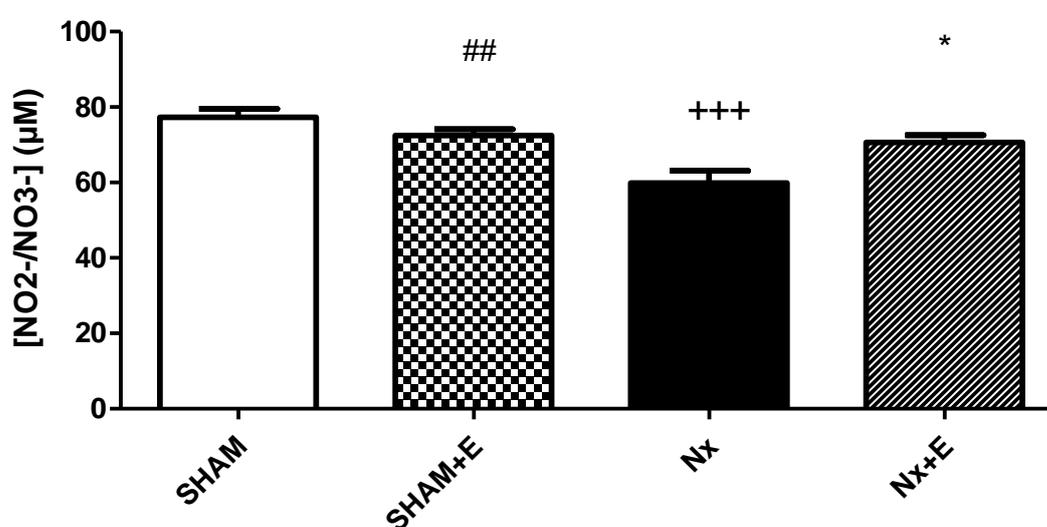
⁺⁺P<0,01 vs SHAM

^{*}P<0,05 vs Nx

5.5 Quantificação de nitrito/nitrato (NOx) em tecido renal

No presente trabalho, foi determinado a quantificação indireta do NO através da quantificação indireta de NOx. O grupo nefrectomizado apresentou redução significativa de NOx, refletindo disfunção endotelial induzida pelo modelo de nefrectomia 5/6. Enquanto isso, o grupo Nx+E foi eficaz em reverter os efeitos da queda de NOx induzida pela DRC, conforme mostrado na figura 18.

Figura 18: Determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato (NOx) em tecido renal.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos taxa de níveis intra-renais de NOx nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos Nx vs SHAM (+++P<0,001); SHAM+E vs Nx (##P<0,01) e Nx+E vs Nx (*P<0,05).

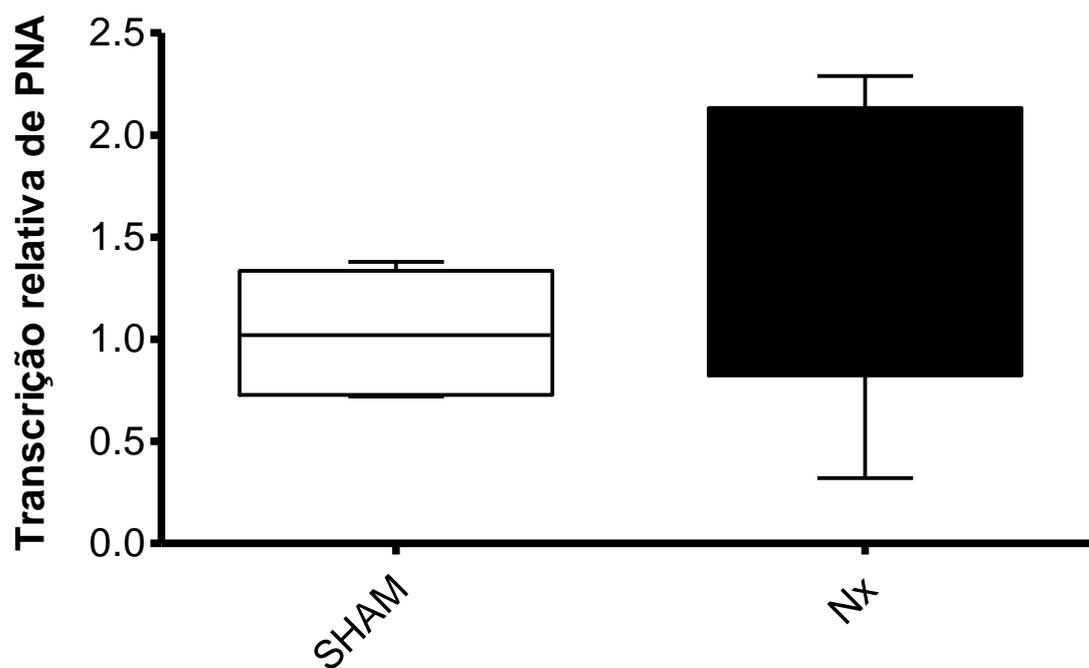
5.6 Avaliação da transcrição gênica

5.6.1 Avaliação da transcrição relativa para os genes de peptídeo natriurético atrial (PNA), guanilina (Gn) e uroguanilina (UGn) no rim.

A figura 19 indica que o presente estudo não mostrou diferenças significativas entre os grupos experimentais na transcrição relativa de PNA no rim, o que revela que a DRC experimental não resultou em mudanças nos níveis deste peptídeo. Da mesma

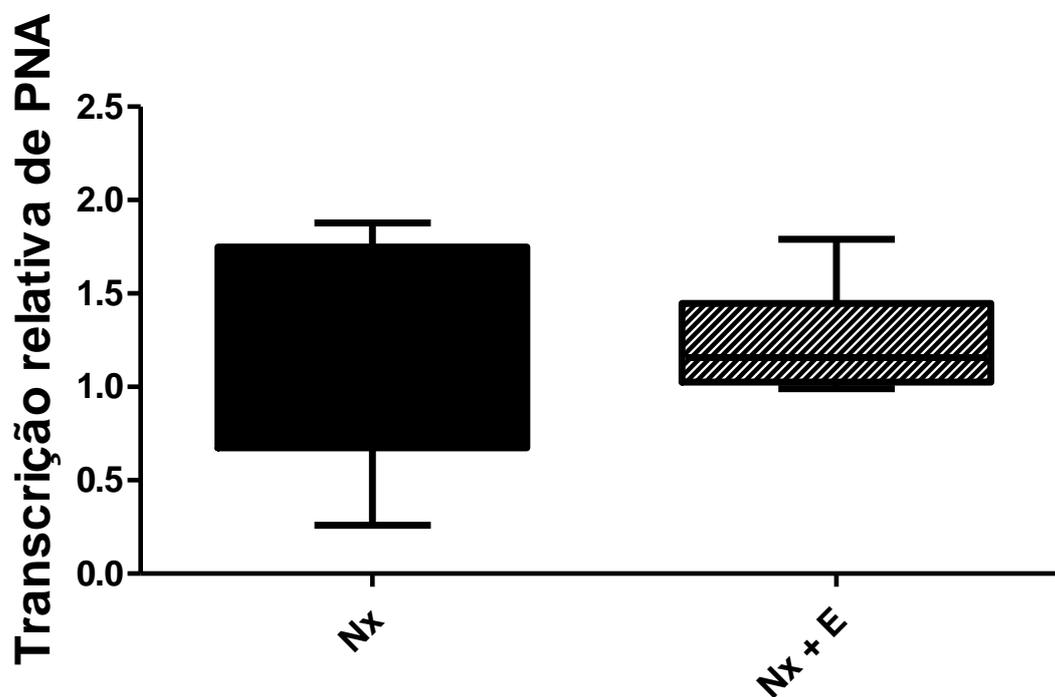
forma, o tratamento com enalapril em animais nefrectomizados não alterou a expressão de RNAm para PNA, conforme observado na figura 20.

Figura 19: Efeito da ablação renal sobre a transcrição gênica de PNA em tecido renal.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de peptídeo natriurético atrial no rim em diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado v.o.; Nx: nefrectomia 5/6. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre todos os dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

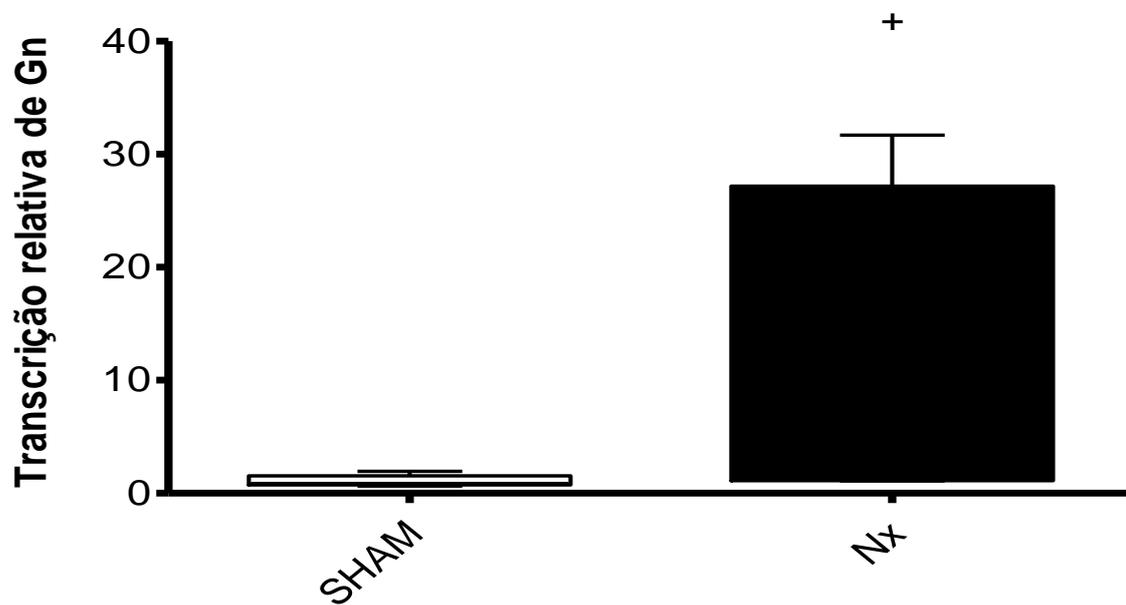
Figura 20: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de PNA em tecido renal de animais submetidos à nx5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de peptídeo natriurético atrial no rim em diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

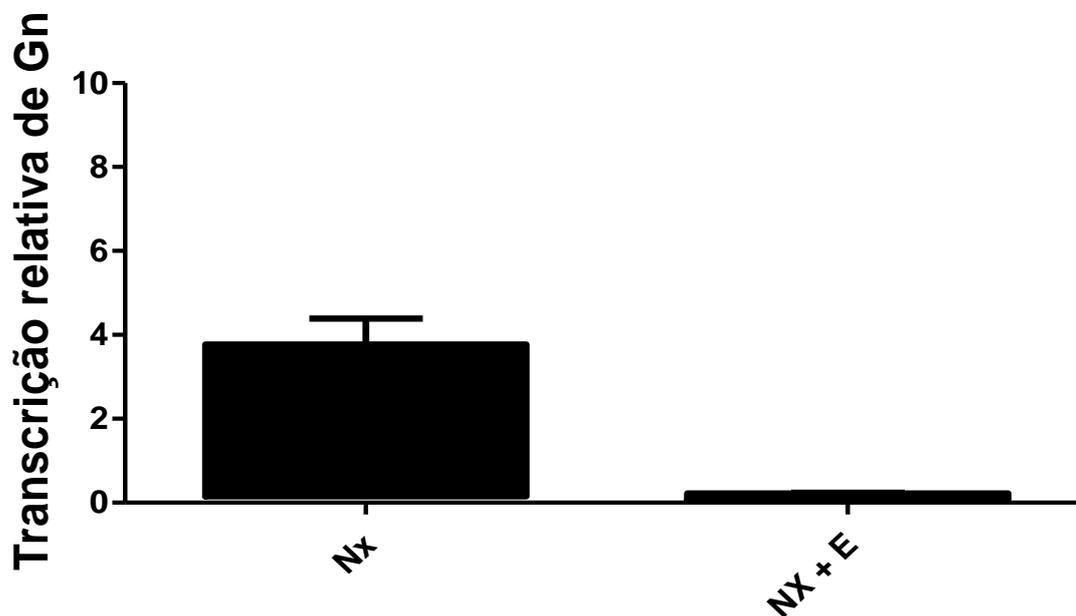
No presente estudo, verificou-se aumento da transcrição gênica para a guanilina induzido pela DRC experimental, onde houve uma elevação em mais de 10 vezes na razão entre os grupos Nx e SHAM, conforme observado na figura 21. O tratamento oral com enalapril não afetou a transcrição deste gene em relação ao Nx, conforme observado na figura 22.

Figura 21: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de Gn em tecido renal.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de guanilina intra-renal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Diferenças significativas foram observadas entre estes grupos (+ $P < 0,05$);

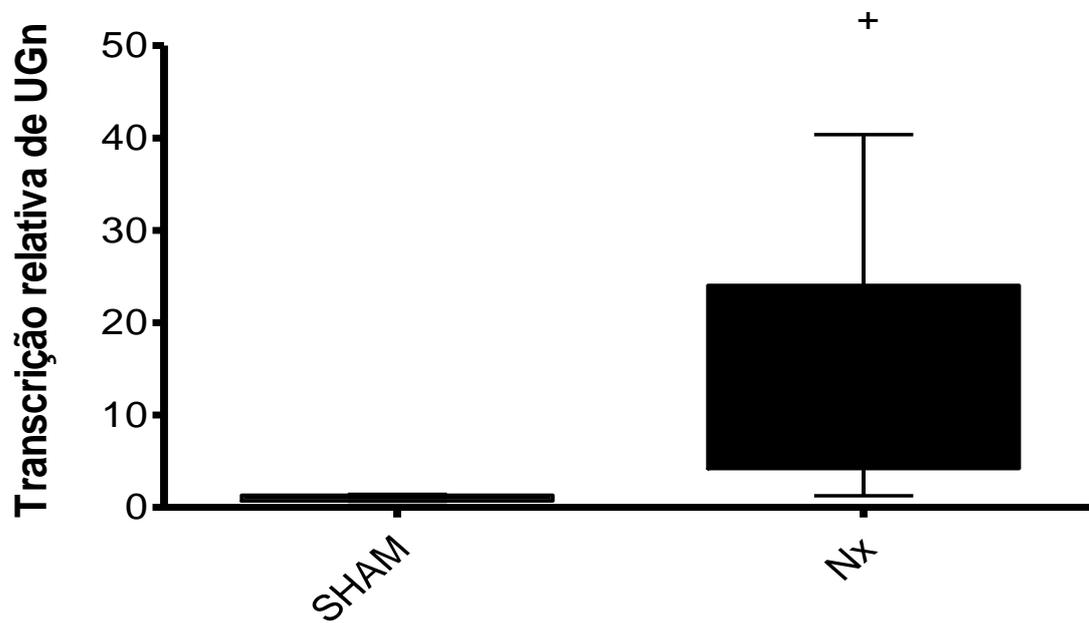
Figura 22: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de Gn em tecido renal de animais submetidos à nx5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de guanilina intra-renal nos diferentes grupos experimentais. Grupos - Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos.

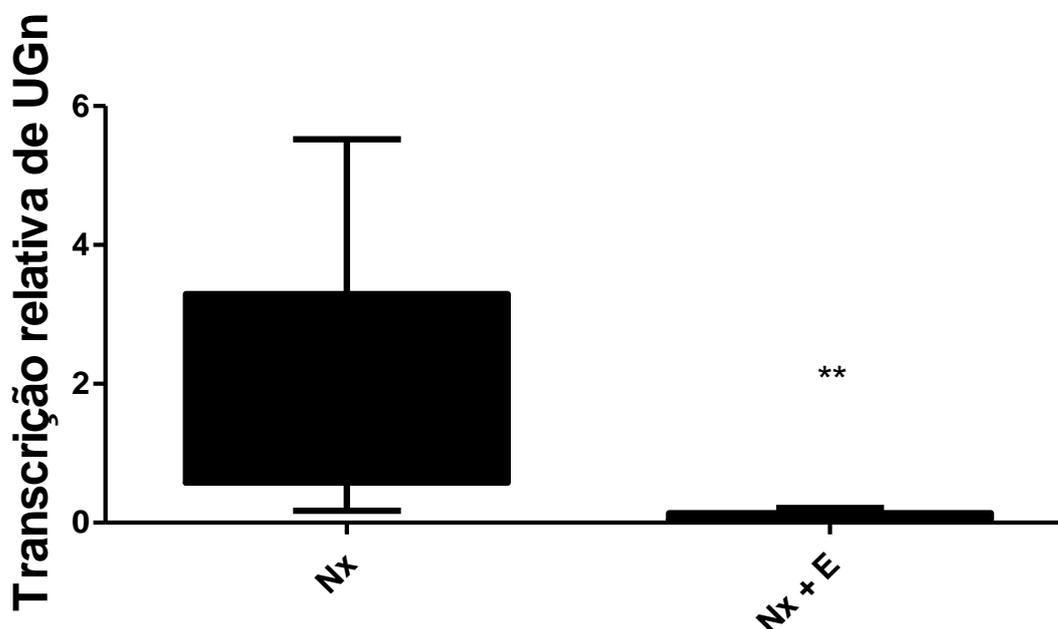
A figura 23 mostra que, para a uroguanilina, houve também um aumento de sua expressão no rim do grupo nefrectomizado comparado ao controle. Além disso, o grupo Nx+E mostrou níveis reduzidos de transcrição gênica deste hormônio quando comparado a Nx (figura 24).

Figura 23: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de UGn em tecido renal.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de uroguanilina intrarenal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; Nx: nefrectomia 5/6. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos (+ $P < 0,05$).

Figura 24: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de UGn em tecido renal de animais submetidos à nx5/6.

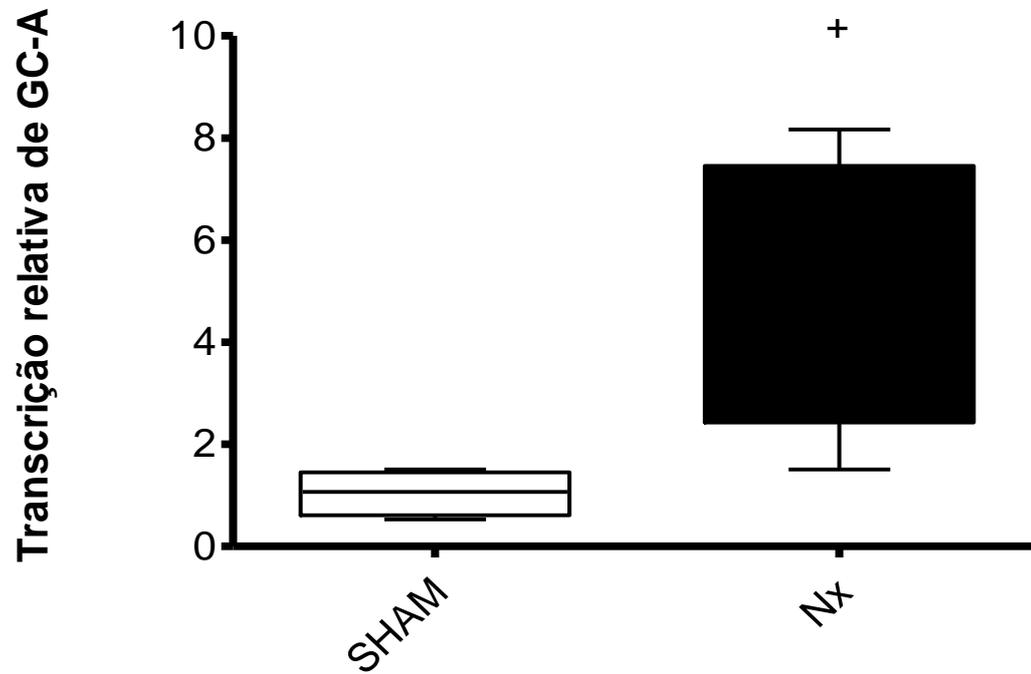


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de uroguanilina intrarenal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Diferenças significativas foram observadas entre estes grupos (**P<0,01).

5.6.2 Avaliação da transcrição relativa para genes de receptores de guanilato ciclase A e C (GC-A e GC-C) e do receptor de *clearence* (NPR-C) no rim

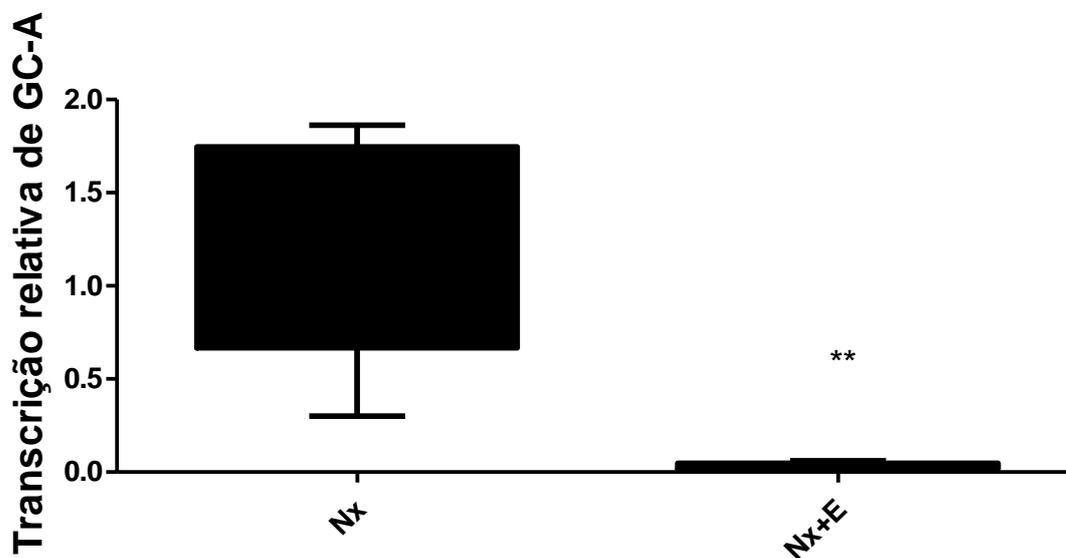
A figura 25 indica um aumento da expressão gênica de GC-A intra-renal em consequência da nefrectomia 5/6 quando comparada ao controle. Já na figura 26, nota-se também redução nestes níveis no grupo Nx+E em relação ao Nx.

Figura 25: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica sobre o receptor GC-A em tecido renal.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica da guanilato ciclase-A intra-renal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; Nx: nefrectomia 5/6;. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Diferenças significativas foram observadas entre estes grupos (+ $P < 0,05$).

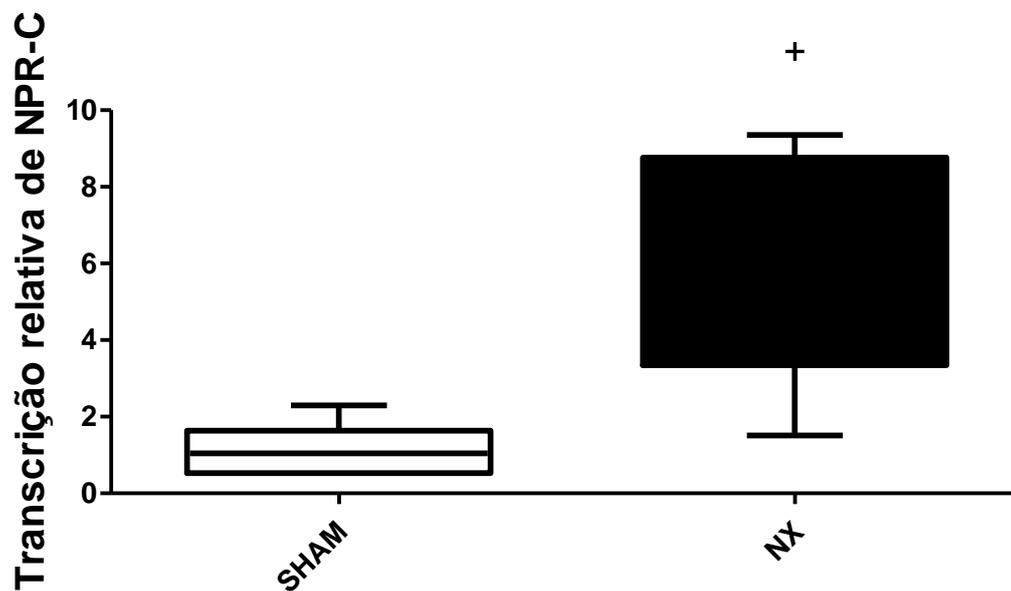
Figura 26: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de GC-A em tecido renal de animais submetidos à nx5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica da guanilato ciclase-A intra-renal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Diferenças significativas foram observadas entre estes grupos (**P<0,01).

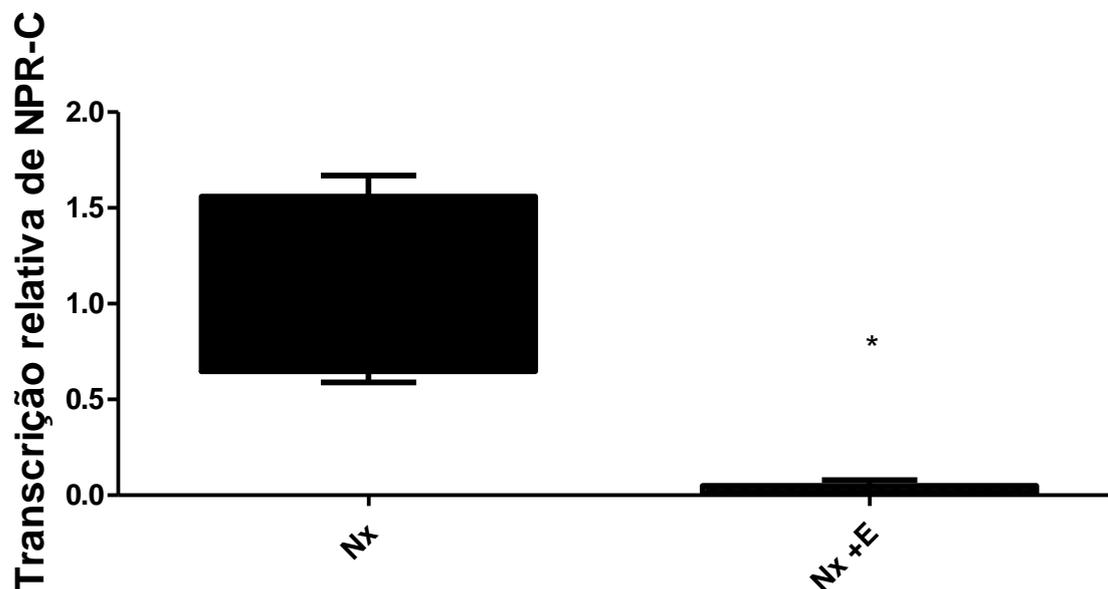
Para o NPR-C, observou-se aumento de sua transcrição em Nx comparado ao SHAM, conforme demonstrado na figura 27. Adicionalmente, observa-se uma diminuição neste parâmetro em Nx+E, comparado ao Nx (figura 28).

Figura 27: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de NPR-C em tecido renal.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica do receptor de *clearence* intra-renal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; Nx: nefrectomia 5/6; A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Diferenças significativas foram observadas entre estes grupos (+ $P < 0,05$).

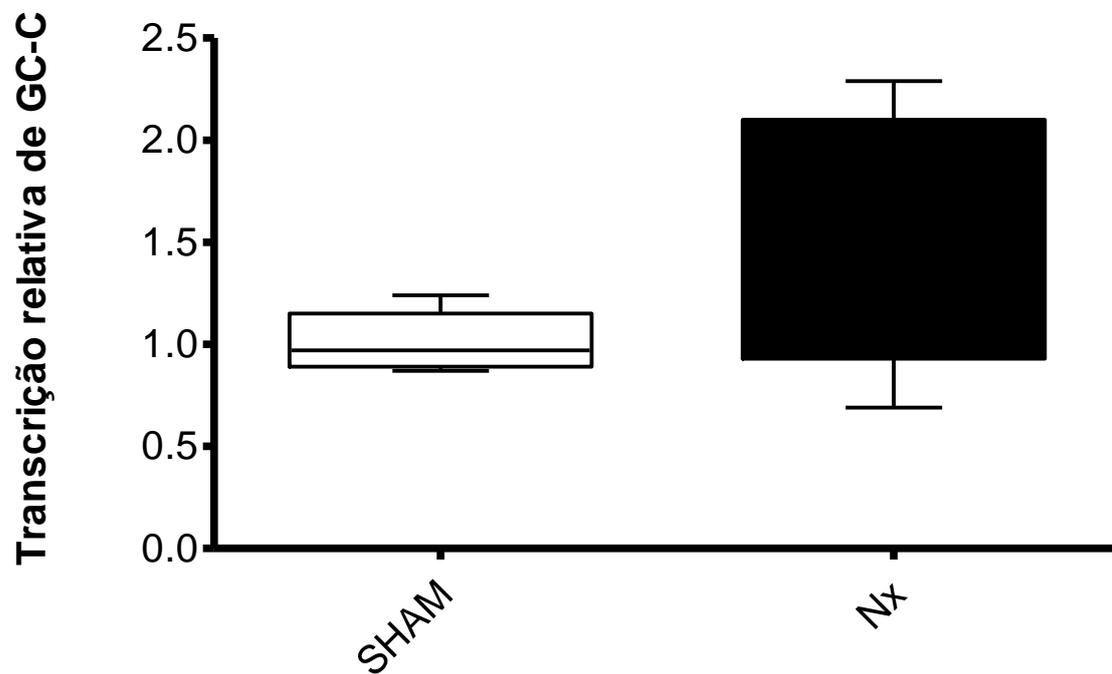
Figura 28: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de NPR-C em tecido renal de animais submetidos à nx5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica do receptor de *clearence* intra-renal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre todos os grupos. Diferenças significativas foram observadas entre estes grupos (*P<0,05).

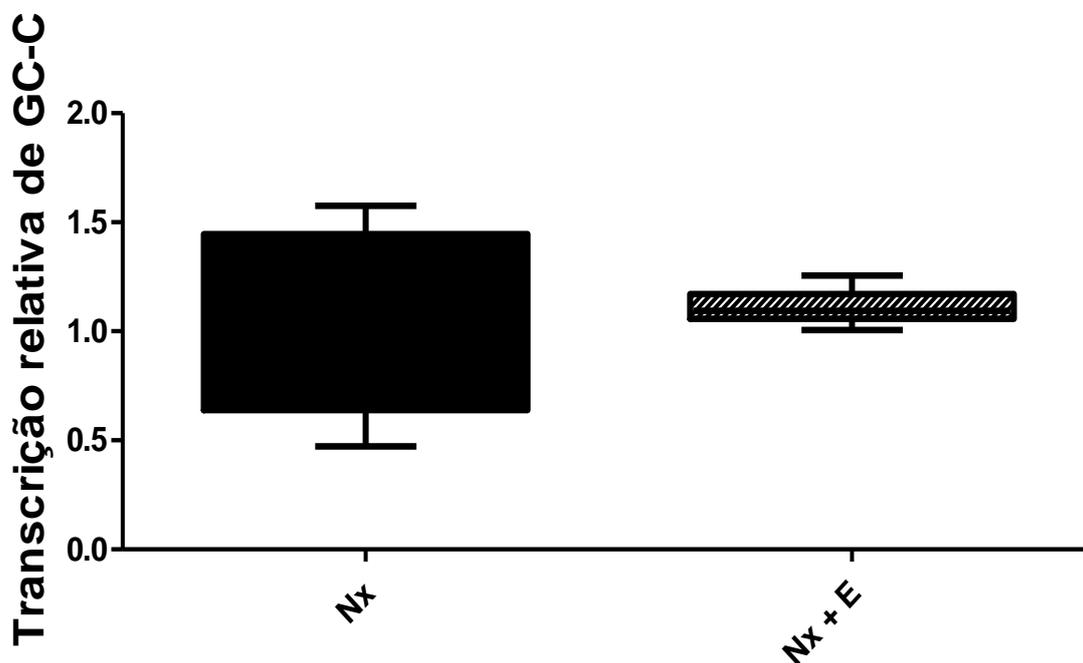
Este estudo não demonstrou diferenças entre quaisquer dos grupos sobre a transcrição para o gene do receptor GC-C, conforme observado na figura 29. Ademais, o tratamento oral com enalapril nos animais nefrectomizados não afetou a transcrição relativa para este gene em relação ao grupo Nx (Figura 30).

Figura 29: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de GC-C em tecido renal.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica da guanilato ciclase-C no rim em diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; Nx: nefrectomia 5/6. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 30: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de GC-C em tecido renal de animais submetidos à nx5/6.

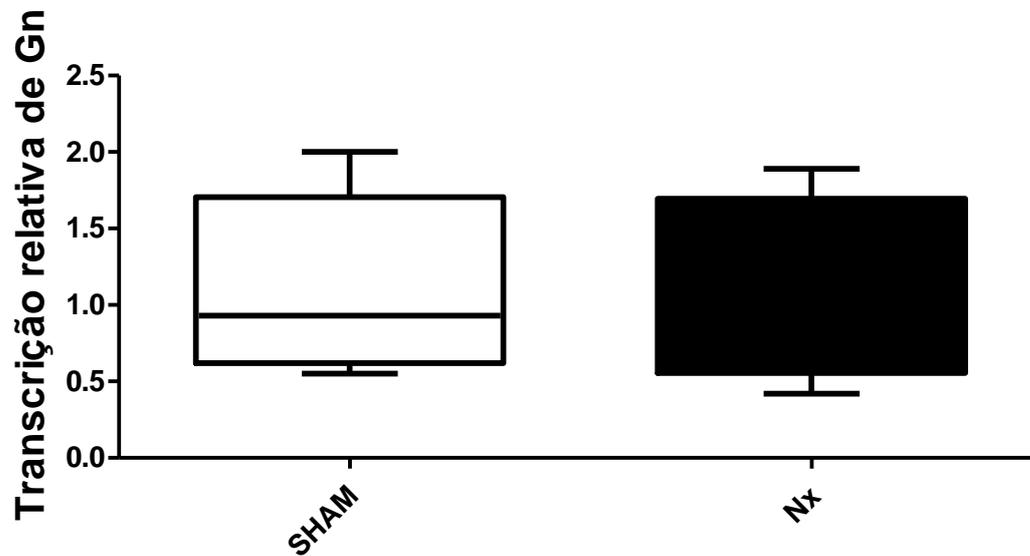


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica da guanilato ciclase-C no rim em diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos.

5.6.3 Avaliação da transcrição relativa para genes de guanilina (Gn) e uroguanilina (UGn) no intestino

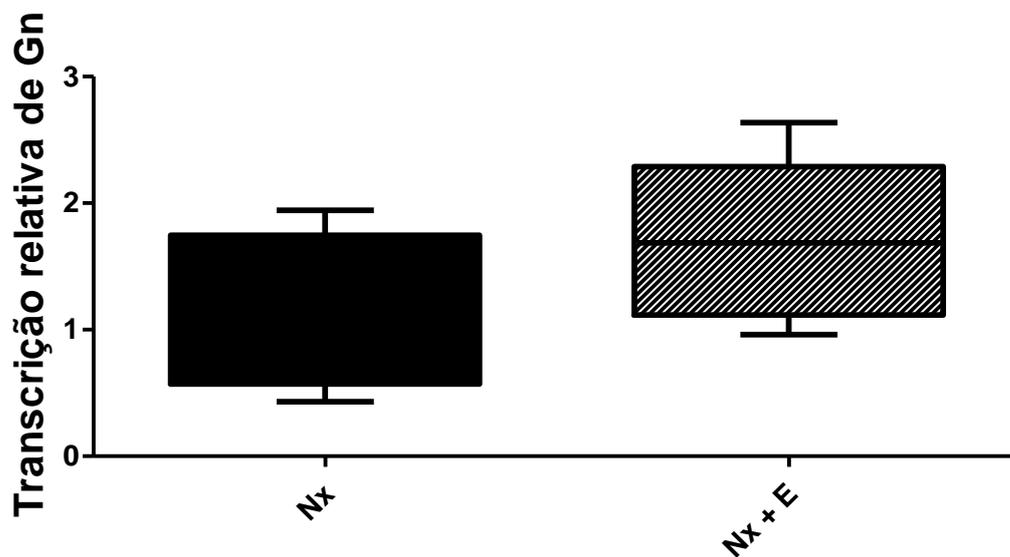
A sobrecarga renal a qual os grupos Nx e Nx+E foram submetidos não alterou significativamente a transcrição gênica de Gn e UGn (figuras 31 e 33). Da mesma forma, o tratamento oral com enalapril não modulou a expressão destes peptídeos, conforme observado nas figuras 32 e 34.

Figura 31: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de Gn no intestino.



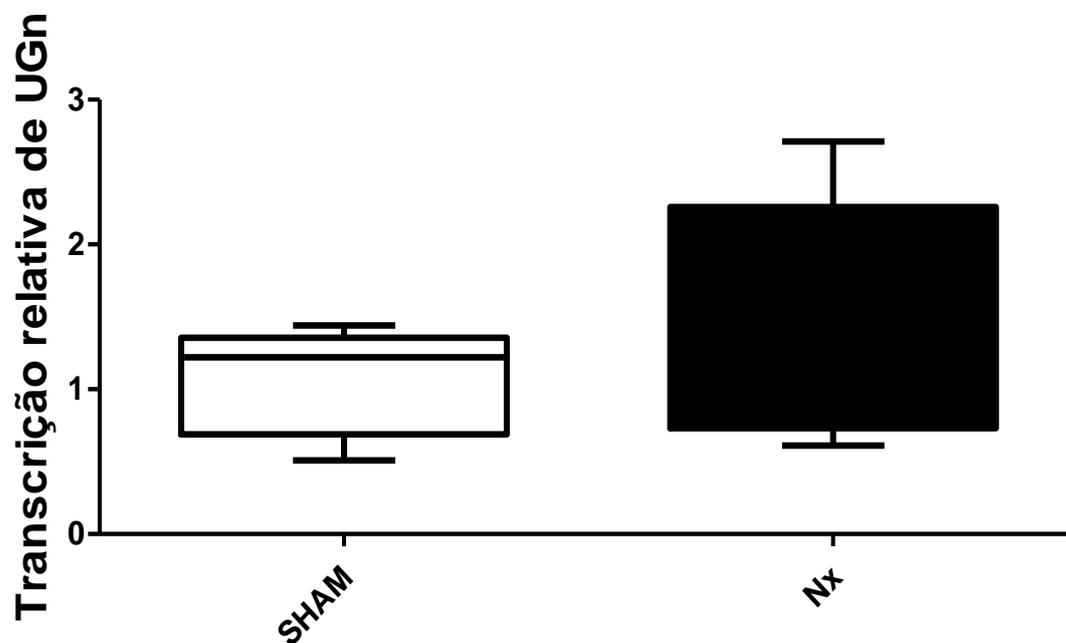
Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de guanilina intestinal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; Nx: nefrectomia 5/6. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças estatísticas entre estes grupos.

Figura 32: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de Gn no intestino de animais submetidos à nx5/6.



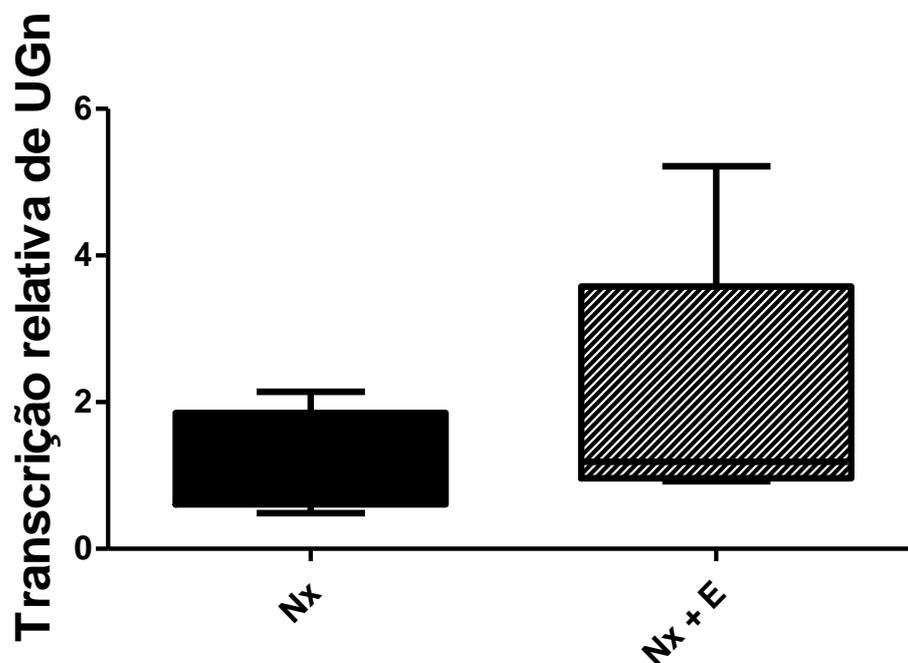
Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica da guanilato ciclase-C no rim em diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos.

Figura 33: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de UGn no intestino.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica de uroguanilina intestinal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado Nx: nefrectomia 5/6. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças estatísticas entre estes grupos.

Figura 34: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de UGn no intestino de animais submetidos à nx5/6.

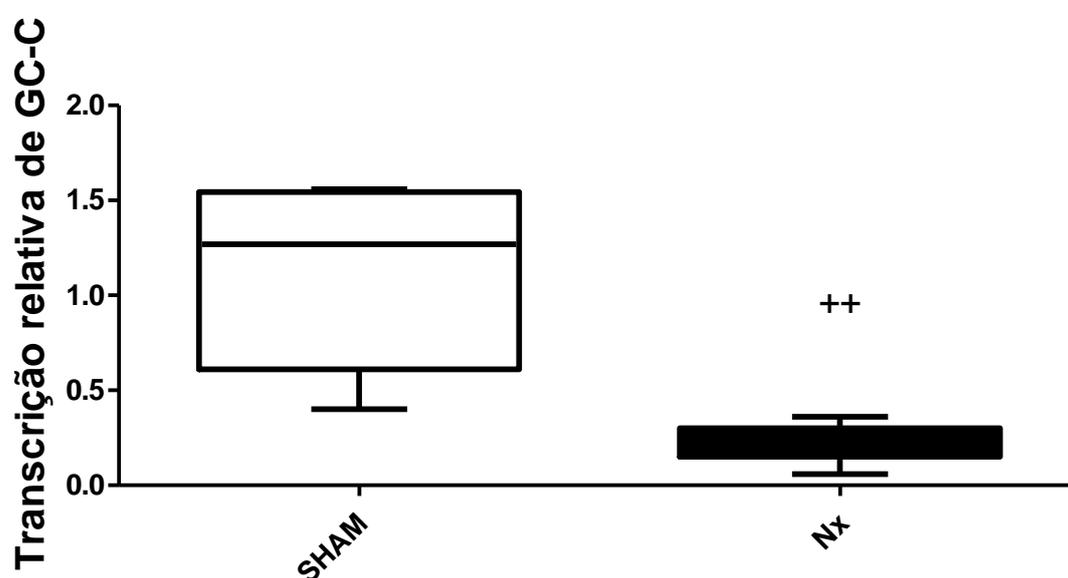


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição de uroguanilina no rim em diferentes grupos experimentais. Grupos: Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos.

5.6.4 Avaliação da transcrição relativa para genes de receptores de guanilato ciclase C (GC-C) no intestino.

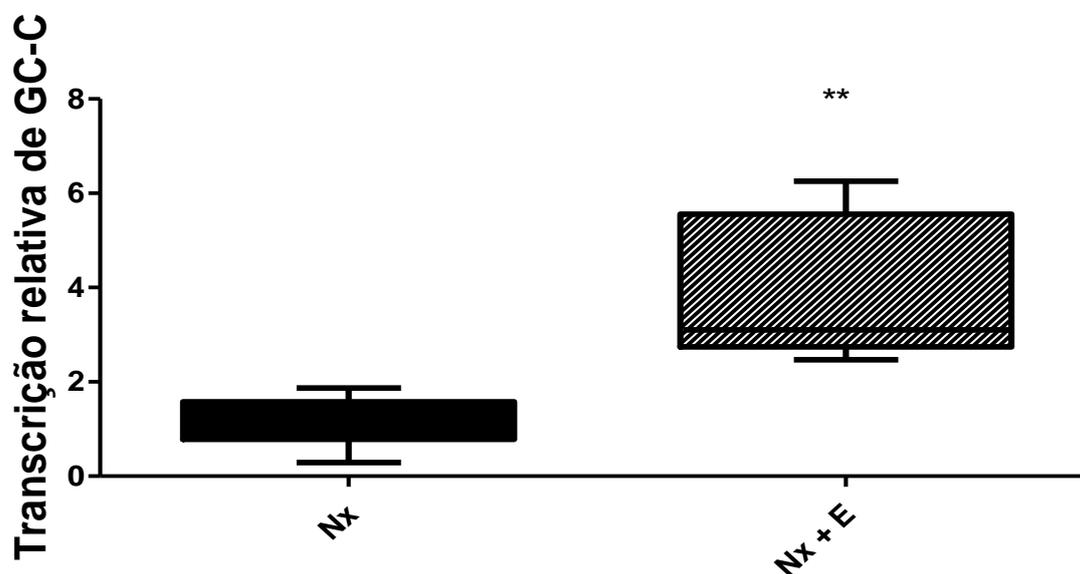
A nefrectomia 5/6 mostrou-se capaz de modular negativamente a expressão de GC-C a nível intestinal quando comparado ao SHAM (figura 35). O grupo Nx+E, por sua vez apresentou valores aumentados para a transcrição deste gene em relação à Nx (figura 36).

Figura 35: Efeito da DRC sobre a transcrição gênica de GC-C no intestino.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica da guanilato ciclase-C no intestino em diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; Nx: nefrectomia 5/6. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre todos os grupos. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos ($++P<0,01$).

Figura 36: Efeito do enalapril sobre a transcrição gênica de GC-C no intestino de animais submetidos à nx5/6.



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos valores de transcrição gênica da guanilato ciclase-C no rim em diferentes grupos experimentais. Grupos - Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney entre os dois grupos. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos (**P<0,01).

5.7 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada nos grupos SHAM, Nx e Nx+E. Em nenhum dos 3 grupos foi encontrado alterações arquiteturais.

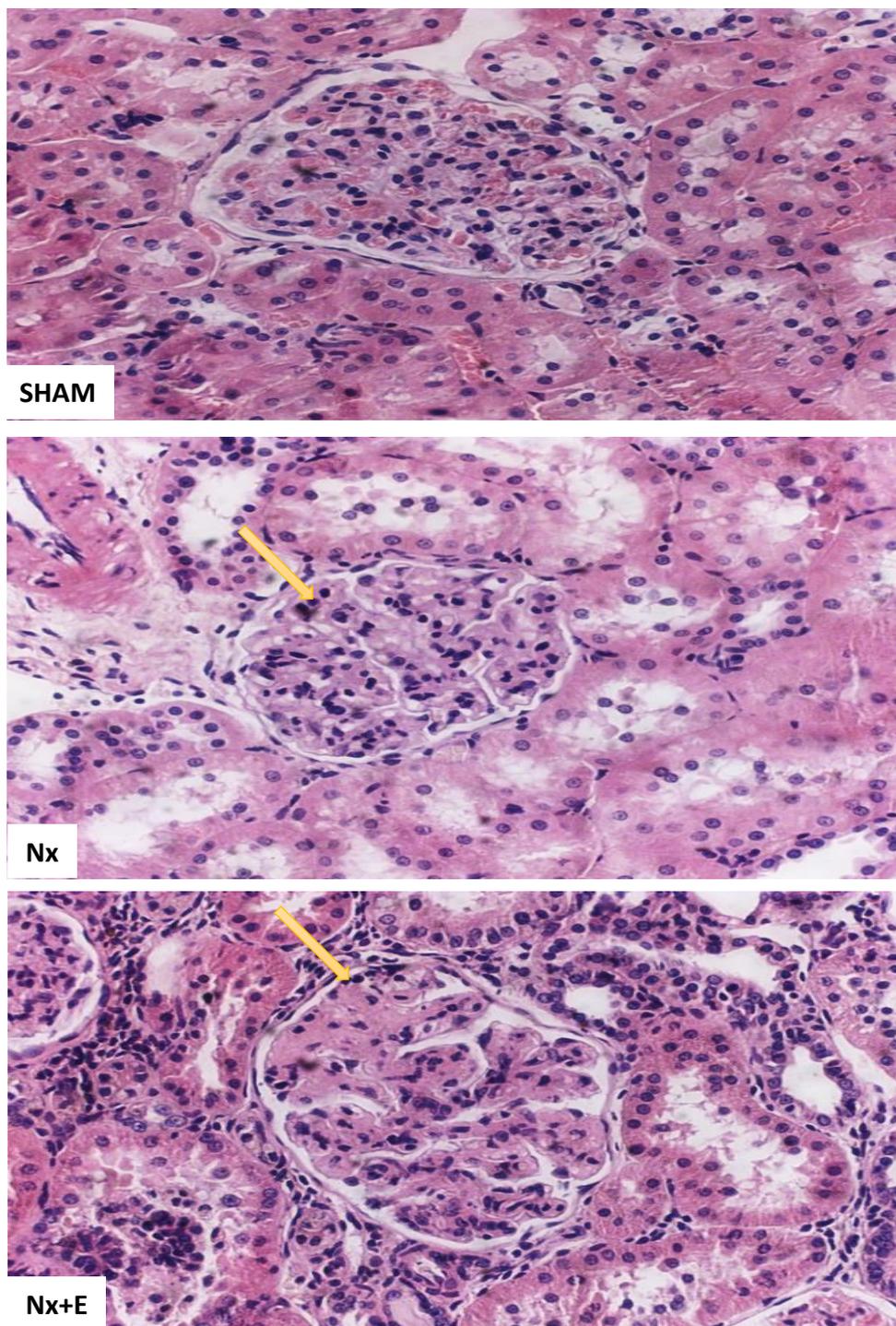
Não foram verificadas alterações a nível glomerular e tubular nos animais do grupo SHAM, não havendo qualquer indício de citotoxicidade. No entanto, em apenas 1 animal deste grupo, foi detectado um pequeno foco de calcificação tubular.

No grupo Nx foi detectado intensa esclerose glomerular multifocal, com atrofia em alguns glomérulos. Verificou-se também dilatação tubular e repleção de material eosinofílico. Observou-se revestimento epitelial da pelve renal na área de infarto, o que demonstra que o procedimento cirúrgico mostrou-se eficaz em abranger todas as camadas do rim.

Conforme observado na figura 37, o tratamento oral com enalapril (10mg/kg) mostrou-se eficaz em reduzir as lesões a nível glomerular, evidenciado pelo achado de

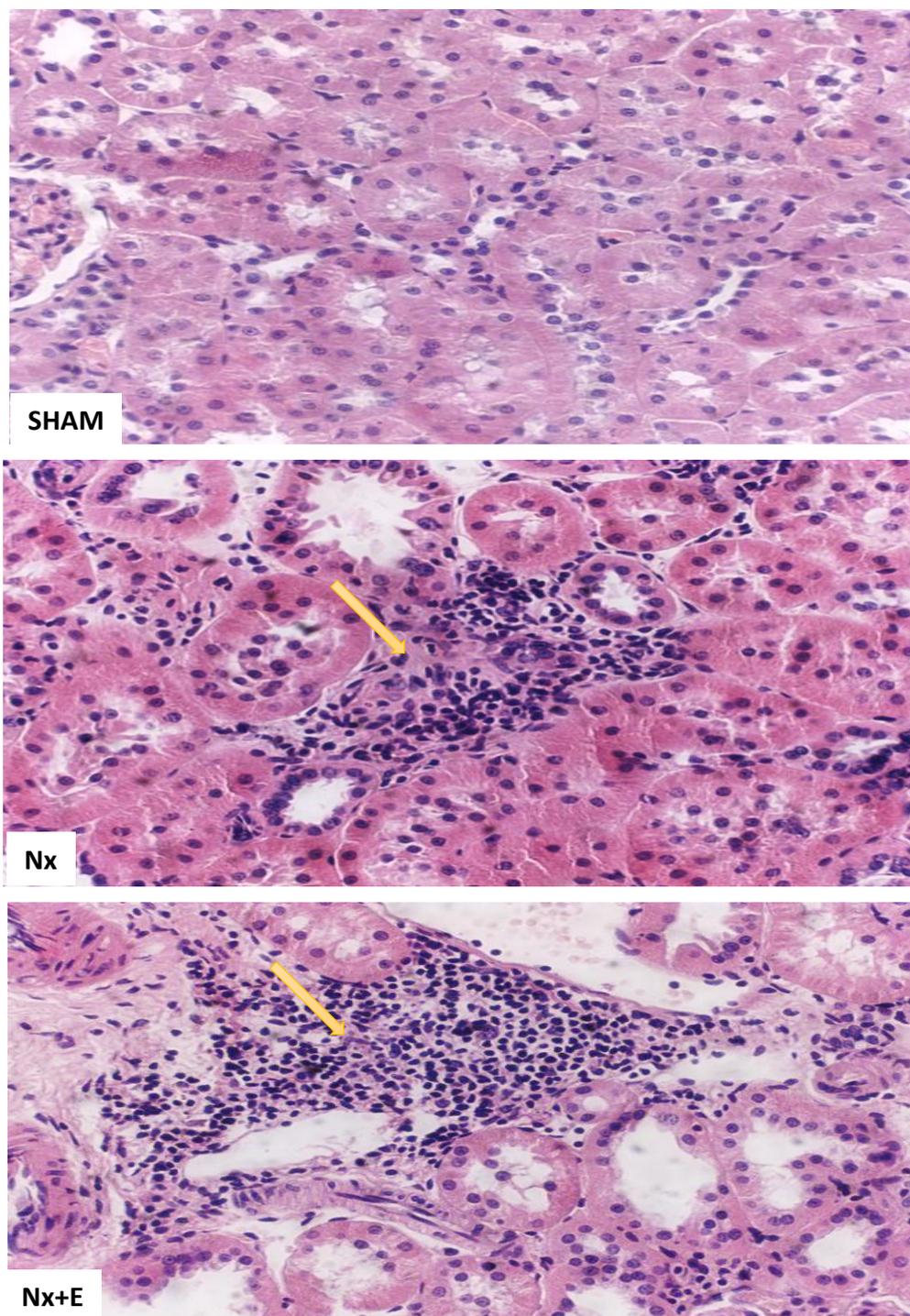
glomeruloesclerose apenas discreta quando comparado à Nx. No entanto, não percebeu-se diferenças entre as alterações tubulares entre os grupos Nx e Nx+E, apresentando estes dois grupos alguns túbulos com degeneração hidrópica e congestão, além da presença de infiltrados inflamatórios em áreas intersticiais (figura 38). Em ambos os grupos submetidos a nefrectomia 5/6, verificou-se a presença de calcificação e algumas áreas de infarto.

Figura 37: Imagens representativas da morfologia glomerular em animais submetidos ao procedimento cirúrgico.



As 3 imagens representam glomerulos dos grupos controle (SHAM), nefrectomia 5/6 (Nx) e nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (Nx+E). As setas em amarelo apontam para a presença de glomerulosclerose, mais acentuada no grupo Nx. Imagens observadas em microscópio ótico em aumento de 200x.

Figura 38: Imagens representativas da morfologia túbulo-intersticial em animais submetidos ao procedimento cirúrgico.



As 3 imagens representam áreas túbulo-intersticiais dos grupos controle (SHAM), nefrectomia 5/6 (Nx) e nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (Nx+E). O grupo SHAM apresenta morfologia túbulo-intersticial normal. As setas em amarelo apontam para a presença de infiltrado inflamatório, não havendo diferenças entre Nx e Nx+E. Imagens observadas em microscópio óptico em aumento de 200x.

6 DISCUSSÃO

As nefropatias crônicas normalmente evoluem com uma queda gradual da função renal. Nesse sentido, o rim mostra-se capaz de manter a homeostase, através de alterações adaptativas a nível glomerular e tubular. No entanto, quando a perda de néfrons é acentuada, a capacidade máxima adaptativa destes é superada, o que leva à retenção de excretas nitrogenadas e ao desequilíbrio do manejo do sódio, levando a hipertensão e a formação de edema (ZATZ, 2012).

O modelo experimental escolhido para a reprodução da DRC neste trabalho foi o de nx5/6, através da retirada de um dos rins, seguida da ligadura de ramos da artéria que perfunde o rim remanescente. A técnica de infarto aqui utilizada mostra-se superior em relação à técnica de ressecção dos polos renais seguida por electrocauterização (MA; FOGO, 2003). Tal fato é evidenciado por uma ativação mais eficaz do SRAA quando se opta pelo modelo de infarto (EDDY et al., 2012). Hirose e colaboradores (2010), em um estudo com animais submetidos à nx5/6, através bloqueio de ramos da artéria renal, observou aumento dos receptores de renina no rim remanescente, reforçando o papel desta via na DRC. Sabe-se que hiperatividade simpática, evidenciada pelo aumento nos níveis sanguíneos de hormônios do SRAA, constitui um fenômeno intrínseco à fisiopatologia da DRC (SLEE, 2012).

Conforme esperado, o modelo experimental realizado no presente estudo apresentou perfil bioquímico característico de uma nefropatia crônica em fase intermediária: aumento moderado dos níveis de uréia e creatinina plasmática, associado a níveis elevados de proteinúria, o que está de acordo com outros estudos na literatura (EDDY et al., 2012).

Observou-se durante o decorrer do protocolo experimental, redução do peso corpóreo induzido pela nefrectomia. Este resultado está de acordo com o encontrado por Li e colaboradores (2012), onde a nx5/6 provocou uma queda na massa corpórea em todas as semanas analisadas após a cirurgia.

Foi verificado também aumento do peso do rim nos animais Nx em relação ao SHAM, o que representa um indício da hipertrofia renal em resposta a sobrecarga imposta aos néfrons no período de 10 semanas. Este achado pode estar relacionado à presença de acentuada inflamação dos néfrons remanescentes descritos em alguns estudos com nx5/6 (FLECK et al., 2006). A chamada hipertrofia renal, inclui tanto a hiperplasia (aumento no número de células) e a própria hipertrofia (aumento no volume celular) em resposta

ao processo inflamatório (FOGO, 2003). Nesse sentido, o tratamento com enalapril atenuou o aumento do peso renal, conforme visto no grupo Nx+E, o que reforça o papel do enalapril na redução da inflamação induzida pelo excesso de AngII na DRC. (RUIZ-ORTEGA et al., 1995).

Em relação à função glomerular aqui estudada, observou-se uma redução em aproximadamente 70% na TFG nos animais do grupo Nx comparado ao SHAM. Essa escala na queda na função renal se aproxima à encontrada por Kuncová e colaboradores (2009), em que a função renal também foi avaliada 10 semanas decorridas da ablação de 5/6 da massa renal. Vários estudos que utilizaram modelos de ablação de massa renal têm demonstrado que os néfrons remanescentes são capazes de aumentar suas filtrações glomerulares individuais, em virtude das alterações adaptativas, como o aumento do fluxo sanguíneo glomerular. Apesar deste fato, está claro que o aumento da P_{CG} leva à lesão da parede capilar glomerular, ocasionando inflamação, disfunção endotelial e estresse oxidativo, com consequente perda de néfrons e queda global da TFG. Todos esses efeitos são intensificados pelas ações da Ang II no remodelamento vascular (SNIVELY et al., 2004).

Neste estudo, o tratamento oral com enalapril na dose de 10mg/kg/dia foi eficaz em atenuar a queda da TFG induzida pela ablação cirúrgica de massa renal. Este efeito pode ser atribuído à melhora no funcionamento dos néfrons remanescentes, como é mostrado em estudos envolvendo o papel de outros IECA em nefropatias crônicas (ZHANG et al., 2008; GHOSH et al., 2012).

Semelhante ao ocorrido com a creatinina, o grupo Nx apresentou níveis séricos de uréia elevados em relação ao SHAM. Neste sentido, a queda da TFG induzida pela nx5/6 constitui um fator determinante para a retenção dessas excretas. Apesar da melhora da TFG no grupo Nx+E, o enalapril não foi eficaz em reduzir significativamente os níveis de uréia sérica. Este achado contrasta com a reversão dos níveis de uréia por parte do enalapril no modelo de nx5/6 observado por Ghosh e colaboradores (2012). Contudo, causas extra-renais, entre elas a desidratação, podem favorecer o aumento de uréia na circulação, prejudicando este possível benefício gerado pelo IECA (ZATZ,2012).

A sobrecarga imposta aos néfrons remanescentes em resposta à nx5/6, através da hipertensão glomerular, conhecida por causar alterações morfológicas e funcionais em componentes da barreira de filtração, provocou aumento intenso de proteinúria em relação ao SHAM. Este resultado corrobora com a proteinúria encontrada por Li e colaboradores (2012). Estudos têm descrito que essas alterações levam a uma elevação

da filtração de grandes moléculas plasmáticas, ocasionada pelo aumento do tamanho de poros não seletivos (FRANCO et al., 1998). Além de ser consequência da DRC, a proteinúria é capaz de contribuir para a queda da TFG nessa patologia. O excesso de proteínas filtradas leva a uma toxicidade glomerular e tubular, acentuando a lesão nestes locais (FRANCO et al., 1998).

Ao serem filtradas pelo glomérulo as proteínas passam inicialmente pelo túbulo proximal (TP) onde há um transporte de proteínas mediado por endocitose. Neste ponto as proteínas se acumulam, causando toxicidade ao afetar alguns genes reguladores de inflamação e fibrose (FRANCO et al., 1998). Foi descrito que a albumina induz a liberação de TGF- β por células inflamatórias, que é um fator de crescimento capaz de inibir a endocitose efetuada pelo complexo megalina/cubilina no TP, levando a um aumento da albuminúria (GORRIZ; MARTINEZ-CASTELAO, 2012).

Frente a proteinúria e suas implicações na progressão da DRC, a inibição do SRAA tem se mostrado uma alternativa terapêutica eficaz. No presente estudo, verificou-se que o tratamento oral com enalapril reduziu significativamente os níveis de proteinúria causada pela nefrectomia 5/6. Um estudo prospectivo em ratos, demonstrou que, dependendo da extensão da lesão renal antes do início do tratamento, os efeitos antiproteinúricos dos IECA podem ser prejudicados ou até mesmo abolidos (KRAMER et al., 2003). Dessa forma, a melhora da proteinúria aqui observada, reforça que o período de 10 semanas após a nefrectomia 5/6 gerou uma lesão prévia a fase terminal da DRC. Outras estratégias terapêuticas no intuito de inibir o SRAA, atenuando a proteinúria, consistem no uso de inibidores dos receptores de angiotensina II, da aldosterona, e ainda os da renina (REMUZZI, 2005). Todos esses fármacos atuam na DRC ao reduzir os níveis intra-renais de AgII, peptídeo que atua diretamente na elevação da P_{CG} , causando alterações na integridade de diversos componentes do glomérulo, como células mesangiais, membrana basal e podócitos, o que permite a passagem de proteínas de médio e alto peso molecular (RÜSTER; WOLF, 2006).

No presente estudo, observaram-se alterações histopatológicas condizentes com o estado inflamatório crônico no tecido renal dos animais nefrectomizados. Entre elas, podemos destacar a presença de glomeruloesclerose, áreas de calcificação distrófica, infiltrado inflamatório monocuclear e fibrose. A esclerose glomerular no contexto da DRC tem sido atribuída principalmente ao excesso de AgII intra-renal e à proteinúria, que eleva a severidade da lesão glomerular, contribuindo para a síntese de componentes

da matrix extracelular e fibrose de alças presentes no tufo glomerular (REMUZZI et al., 2005).

A disfunção túbulo-intersticial observada nos grupos nefrectomizados tem sido descrita como um evento complexo e decisivo para a progressão à DRC terminal. O início desse processo ocorre pela ativação de células tubulares em resposta a inflamação, disfunção endotelial e estresse oxidativo (HODGKINS; SCHNAPER, 2012). Já a calcificação distrófica encontrada no parênquima renal está diretamente relacionada à necrose tecidual e resulta na formação de cristais de fosfato de cálcio, contribuindo para a disfunção renal (ALPERS, 2005).

Neste trabalho, o tratamento oral com enalapril durante 6 semanas foi eficaz em atenuar a glomeruloesclerose em relação ao grupo Nx. A glomeruloesclerose constitui o acúmulo de componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e proteoglicanos, provocando oclusão das alças capilares, o que dificulta o processo de ultrafiltração (ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012). É provável que no presente estudo, os efeitos benéficos do enalapril na redução da proteinúria e na melhora da disfunção endotelial, evidenciado pelo aumento nos níveis de NOx de Nx+E comparado a Nx aqui observados, sejam fatores importantes para a presença a melhora da glomeruloesclerose no grupo Nx+E.

No contexto das alterações na função tubular, foi verificado aumento da fração de excreção de sódio ($FENa^+$) nos animais nefrectomizados em relação ao controle. O aumento da $FENa^+$ constitui uma alteração adaptativa da função tubular em resposta a perda de néfrons, o que acarreta em rejeição de sódio pelos túbulos renais dos néfrons remanescentes (LOPEZ-NÓVOA et al., 2010). Tal adaptação visa evitar a retenção deste eletrólito na circulação. Isto ocorre às custas de uma elevação inicial no volume do líquido extracelular (LEC), que é detectado pelo rim e coração, acarretando em aumento de fatores que promovem a natriurese, causando elevação na filtração por néfron, inibição da atividade sistêmica de hormônios como AngII e aldosterona, além de aumento na liberação de PNs pelo coração (RIELLA, 2010).

Entre os hormônios liberados pelo coração em resposta ao aumento da expansão de volume, o PNA e o PNB têm sido os mais estudados. Na temática da DRC, alguns trabalhos na literatura têm mostrado aumento plasmático deste na circulação. Tal fato é atribuído à distensão constante do átrio em resposta a elevação da volemia sanguínea e da hipertensão. Estudos vêm relacionando esta supra-regulação a fatores presentes na nefropatia crônica, como a inibição da endopeptidase neutra (NEP), enzima que degrada

os PNs (VOLPE, 2014). Araújo e colaboradores (2009) verificaram uma elevação tempo dependente nos níveis plasmáticos PNB após 2, 10 e 26 semanas da indução de DRC pelo modelo cirúrgico de nefrectomia 3/4. No entanto, este achado não acarretou em respostas natriuréticas adequadas em resposta à expansão de volume.

O presente trabalho não demonstrou elevação na expressão de PNA pelo rim no grupo nefrectomizado. No entanto, já foi verificada retenção de PNA na circulação em resposta à nefropatias crônicas em humanos (CHÂTEL et al., 1991). Tal elevação tem sido atribuída a dois fatores. O primeiro, devido a expansão de volume inerente a DRC, o que estimularia a liberação destes peptídeos pelo coração, enquanto a segunda hipótese sugere que a queda na TFG, levaria a uma menor depuração renal de PNs, o que justifica o acúmulo deste peptídeo na circulação (SMITH et al., 1986; ARAÚJO et al., 2009). Em paralelo a estes dados, estudos têm demonstrado que a liberação de PNA na nefropatia crônica pode estar associada a hipóxia em células tubulares renais (MIKUSIC et al., 2014). Este processo se dá inicialmente pela ativação da enzima NADPH oxidase pela AngII, que aumenta a geração do ânion O_2^- , contribuindo para o elevar o transporte tubular Na^+ , que exacerba a hipóxia tecidual (LAI, et al., 2012).

Apesar do não aumento na expressão de PNA pelo rim, verificou-se uma elevação na transcrição gênica para GC-A, o principal receptor para o PNA, do grupo Nx comparado ao SHAM. Dessa forma, a produção intra-renal de PNA parece não ser essencial para essa modulação de GC-A observada em ratos submetidos a ablação renal.

Observou-se também um aumento da expressão de NPR-C, receptor responsável pela depuração plasmática e local de PNA e PNB. Segundo Matsukawa e colaboradores (1999), NPR-C modula as ações fisiológicas destes peptídeos, processo que ocorre através da redução da disponibilidade destes para atuarem em GC-A a nível local e sistêmico. No rim, GC-A encontra-se mais expresso nos túbulos, enquanto NPR-C está mais presente em células endoteliais do córtex (LEITMAN et al., 1986; ARAÚJO et al., 2009). Em virtude desse fato, supõe-se que a maior expressão do receptor de *clearance* verificada no grupo nefrectomizado pode levar a uma redução na resposta natriurética, mesmo havendo aumento de GC-A. No entanto, é válido ressaltar que algumas ações vasculares antiproliferativas pela ação de PNC, mas não de PNA ou PNB, em NPR-C já foram observadas. Sugere-se que essas ações ocorrem pela ativação da proteína $G_{i\alpha}$ e da via MAPK/fosfatidilinositol 3-quinase/AKT, conforme observado em cultura de células embrionárias de aorta (HASHIM et al., 2006). Dessa forma, o papel do receptor NPR-C na DRC ainda é controverso (VOLPE, 2014).

Outro achado importante, refere-se à redução na transcrição de GC-A e NPR-C pelo tratamento renal com enalapril, sugerindo uma infra-regulação desses receptores em resposta ao bloqueio do SRAA. A Ang II é conhecida por seus efeitos retentores de sódio diretamente nos túbulos renais, e pelo estímulo da liberação de aldosterona na glândula supra-renal. A retenção de sódio, por sua vez, leva a expansão de volume, efeito que é transmitido ao átrio cardíaco, que libera a PNA (REMUZZI et al., 2005). Ghosh e colaboradores (2012) observaram que o tratamento crônico com enalapril na dose de 10mg/kg/dia (v.o.) atenuou o aumento dos níveis intra-renais e plasmáticos de Ang II provocado pela nx5/6. Portanto, supõe-se que o bloqueio da ECA pelo enalapril foi obtido no presente estudo, o que reduziria a concentração local de AngII. Tal ação tornaria mais branda a expansão do LEC, reduzindo a liberação do PNA pelo coração, e por consequência, revertendo o *downregulation* nos receptores GC-A e NPR-C observados no grupo Nx.

Um fator determinante para o controle da expansão de volume e da pressão arterial na DRC consiste na quantidade diária de sódio na dieta (JONES-BURTON et al., 2006). Em situações normais o rim é capaz de manter o balanço controlado deste íon no organismo, mesmo na ingestão de quantidades extremamente baixas ou altas de sal. No entanto, no contexto de uma queda expressiva na TFG, essa faixa encontra-se bastante reduzida, o que reflete uma capacidade máxima de rejeição ou reabsorção de sódio pelo néfron (ZATZ, 2012).

Dessa forma, a alta ingestão de sódio na dieta tende a ser mal tolerada em condições de redução do número de néfrons funcionantes. Estudos clínicos têm associado dietas hipersódicas a uma resistência as ações nefroprotetoras dos inibidores da ECA (KRIKKEN; LAVERMAN; NAVIS, 2009). Ademais, uma dieta hipersódica agrava a proteinúria, a HAS, a P_{CG} e a hiperfiltração, contribuindo para acelerar a progressão para a fase terminal da DRC (JONES-BURTON et al., 2006). O fato do tratamento com enalapril ter reduzido expressivamente os níveis de proteinúria e melhorado a TFG, sugere que os animais dos diferentes grupos operados tenham ingerido uma quantidade de sódio próxima ao normal durante o tratamento, mesmo os nefrectomizados.

Ainda no âmbito da ingestão de sódio, os peptídeos natriuréticos da via guanilinas têm se mostrado essenciais no controle volêmico do LEC. Estes efeitos estão relacionados à ativação do receptor GC-C, que converte GTP em GMPc, segundo mensageiro que age de forma direta, ou indireta, na eliminação do sódio pelo organismo (SINDIC, 2013). Entretanto, devido a observação de que camundongos nocaute para GC-C não apresentam

retenção de sódio, ao contrário dos camundongos nocaute para UGn, alguns estudos vêm questionando o fato de ações da UGn via receptor GC-C sejam relevantes para produzir natriurese (CARRITHERS et al., 2004). Neste trabalho, verificou-se que a nefrectomia 5/6 aumentou a expressão de Gn numa razão de 13 vezes e de guanilina em 12 vezes em relação ao SHAM. Estes resultados corroboram com outros dados na literatura, onde foram observados aumento na expressão de RNAm para UGn no rim, além de elevação deste no plasma e na urina de ratos com síndrome nefrótica experimental, condição que alia lesão renal ao edema generalizado (KIKUCHI et al., 2005). Vale ressaltar que a Gn não parece desempenhar papel natriurético relevante nos túbulos renais, já que estudos verificaram que animais nocaute para UGn apresentam expansão de volume e hipertensão, enquanto animais nocaute para Gn tinham níveis pressóricos e balanço de sódio normais (ELITSUR et al., 2006; LORENZ et al., 2003). Ademais, o fato da Gn ter estrutura química sensível à degradação por tripsinas, reforça a não importância deste hormônio na excreção renal de sódio (FORTE, 1999).

A estimulação para RNAm de peptídeos das guanilinas aqui verificada ocorreu mesmo após um jejum de 12 horas, prévio ao momento do sacrifício dos animais para a retirada do tecido renal para análise. Este achado sugere que, na DRC, um estímulo à produção intra-renal de Gn e UGn pode ocorrer independente de uma resposta aguda a ingestão de sal. Atualmente, não há estudos que quantifiquem níveis de Gn e UGn em modelos experimentais de DRC. Em animais normais, foi demonstrado que Gn e UGn apresentam diferentes distribuições nas porções dos néfrons, sendo o primeiro mais expresso no ducto coletor, enquanto o último no túbulo proximal (SINDIC; SCHLATER, 2007). Portanto, faz-se necessário estudos que estabeleçam uma possível resposta da liberação destes peptídeos em consequência de uma sobrecarga salina na dieta em modelos experimentais de DRC.

O tratamento com enalapril no grupo nefrectomizado reverteu o aumento da transcrição gênica para UGn. O aumento da TFG em Nx+E comparado a Nx reflete melhora do funcionamento dos néfrons remanescentes. Tal fato reduziu a sobrecarga de sódio, evidenciado pela redução na $FENa^+$ induzida pelo enalapril. Este efeito pode ser atribuído a inibição da ECA, que age ao reduzir a formação de AngII e por consequência, a liberação de aldosterona, peptídeos que contribuem para a retenção de sódio no LEC, por ações tubulares, levando a retenção deste eletrólito no LEC (RÜSTER; WOLF, 2006). Adicionalmente, foi observado por Ghosh e colaboradores (2009) que o tratamento oral com enalapril na dose de 10mg/kg reduziu significativamente a elevação da pressão

arterial induzida pela nx5/6. Portanto, é possível que a redução na sobrecarga renal, associada a melhora na hipertensão, contribua para reduzir o estímulo ao rim para liberação da UGn, reduzindo a necessidade do aumento da atividade de forças natriuréticas pelo rim, que seria resultante da diminuição na concentração intra-renal de Ang II pelo enalapril, como tem sido verificado em diversos estudos com inibidores da ECA (REGGENENTI; SCHIEPPATI; REMUZZI, 2001; GHOSH et al, 2012).

Outro achado importante do presente estudo, é o de que a DRC não foi capaz de reduzir a expressão de GC-C no rim, de modo que esta patologia induzida experimentalmente não afetou de forma significativa a quantidade de RNAm para este receptor, mesmo na presença de lesão de caráter inflamatório a nível glomerular e túbulo-intersticial. Assim como para as guanilinas, não há trabalhos que quantifiquem o nível deste receptor na DRC. Em ratos normais foi verificada expressão de GC-C em todos os segmentos tubulares do néfron, embora o túbulo proximal responda pela maior densidade destes receptores (CARRITHERS et al., 2000). Atualmente, não há dados na literatura que forneçam base de como estaria a sensibilidade de GC-C pela ligação de seus agonistas no contexto da patologia aqui estudada. Vale ressaltar que alguns mecanismos GMPc independentes tem sido atribuídos a natriurese (SINDIC; SCHLATTER, 2007). Uma destas vias inclui a ativação da fosfolipase A2 (PLA2) pelas guanilinas, o que leva a um aumento dos níveis intra-celulares de ácido araquidônico, que inibe canais de K⁺ tipo ROMK, reduzindo a secreção de K⁺, e, por consequência, a força motriz para reabsorção de sódio, acarretando em natriurese (MACICA et al., 1996). Portanto, mostram-se necessárias mais investigações no intuito de elucidar os reais mecanismos reguladores da via das guaninas em nefropatias crônicas.

Ao contrário do rim, não foi observado aumento na expressão de Gn e UGn no intestino em resposta a nefrectomia 5/6. Este resultado indica que, no contexto da DRC, a modulação intra-renal das guanilinas pode ser mais importante em induzir natriurese quando comparado ao intestino. Entretanto, o fato de os animais encontrarem-se em estado de jejum, o que representa também um período de privação de sódio, pode ser uma possível explicação para a ausência de modificações nos níveis de guanilinas no intestino quando compara-se Nx em relação ao SHAM.

Apesar da nefrectomia 5/6 não ter induzido modulação das guanilinas, foi observado que esta induziu infra-regulação de receptores GC-C no intestino. Roy e colaboradores (2001) observaram redução na expressão de RNAm para GC-C em células epiteliais intestinais (T84) em resposta a ativação da proteína quinase C (PKC). Portanto,

são necessários estudos que estabeleçam uma possível relação da DRC com a ativação de PKC no intestino.

7 CONCLUSÕES

O modelo de nx5/6 mostrou-se eficaz na reprodutibilidade de uma nefropatia crônica, evidenciado por alterações bioquímicas e histopatológicas aqui observadas. O tratamento oral com enalapril atenuou as alterações dos principais parâmetros de função renal aqui estudados, reforçando seu papel nefroprotetor.

A análise da expressão de diferentes genes revelou que a não modulação do PNA pela DRC experimental, associada a um aumento na transcrição gênica de GC-A e NPR-C, constitui um indício de que a produção intra-renal de PNA não é relevante para a natriurese nessa condição patológica. Por outro lado, foi observado aumento na expressão das guanilinas pelo rim em resposta à nx5/6, efeito não encontrado no intestino, sugerindo hiperativação intra-renal da via das guanilinas na DRC.

O tratamento oral com enalapril reverteu o aumento da transcrição gênica de GC-A e NPR-C observado em Nx, presumindo que a melhora na hipertensão observada em outros estudos com este fármaco, modula a expressão desses receptores. O enalapril também reduziu a expressão de UGn no rim de animais nefrectomizados, sugerindo que o bloqueio do SRAA modula a via das guanilinas à nível renal.

No intestino, não houve modificações quantitativas na expressão de RNAm para as guanilinas. Por outro lado, verificou-se redução na expressão gênica do receptor GC-C no intestino dos animais nefrectomizados, e o enalapril mostrou-se capaz de aumentar esta expressão quando comparado à Nx.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, H.; HENRICH, W. L. Stage IV Chronic Kidney Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.362, n.1, p.56-65, 2010.
- AIELLO, S.; NORIS, M.; TODESCHINI, M.; ZAPPELLA, S.; FOGLIENI, C.; BENIGNI, A.; CORNA, D.; ZOIA, C.; CAVALLOTTI, D.; REMUZZI, G. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. **Kidney International**, v.52, n.1, p.171-81, 1997
- ALPERS, C. E. O Rim. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 999-1065.
- ARAÚJO, C. S; ALBUQUERQUE JR, R. R.; RODRIGUES, M. M.; COELHO, T. H.; SANTOS, J. Q.; FARIA, B.; MAIA, B. S.; MOREIRA, A. F. L.; PESTANA, M. Local modulation of the natriuretic peptide system in the rat remnant kidney. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.24, n.6, p.1774-82, 2009.
- ATKINS; R. C.; The epidemiology of chronic kidney disease. **International Society of Nephrology**, v.67, sup.94, p.14-18, 2006.
- BADAL, S. S.; DANESH, F. R. New Insights Into Molecular Mechanisms of Diabetic Kidney Disease. **American Journal Kidney Disease**, v.62, n.2, supl.2, p.63-83, 2014.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v.86, n.6, p.615-21, 2008.
- BAGDASARIAN, N.; HEUNG, M.; MALANI, P. N. Infectious Complications of Dialysis Access Devices. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.26, n.1, p.127-41, 2012.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. S. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.6, p.940-50, 2008.
- BASTOS, M. G. Biomarcadores de função renal na DRC. In: ABENSUR, H. **Biomarcadores na nefrologia. Sociedade Brasileira de Nefrologia**. São Paulo: Roche 2011. cap.1, p.7-18.
- BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.33, n.1, p.74-87, 2011.

BASU, N.; ARSHAD, N.; VISWESWARIAH, S. S. Receptor guanylyl cyclase C (GC-C): regulation and signal transduction. **Molecular and cellular Biochemistry**, v.334, n.1-2, p.67-80, 2010.

BAYLIS, C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. **American Journal of Physiology**, v.294, n.1, p. 1-9, 2008.

BOLIGNANO, D.; ZOCCALI, C. Effects of weight loss on renal function in obese CKD patients: a systematic review. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.28, supl.4, p. iv82-98, 2013.

BRENNER, B. M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.12, n.6, p. 1315-25, 2001.

BROWN, S. A.; FINCO, D. R.; CROWELL, W. A.; CHOAT, D. C.; NAVAR, L. G.

BRUNINI, T.M.C., DEMÉZIO DA SILVA, C., SIQUEIRA, M.A.S., MOSS, M.B., SANTOS, S.F.F., MENDES-RIBEIRO, A.C. Uremia, atherothrombosis and malnutrition: the role of L-arginine-nitric oxide pathway. **Cardiovascular & Hematological Disorders**, v.6, n.2, p.133-140, 2006.

BRUNTON L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012. 2112p.

BUCHARLES, S. G. E.; PERCOITS-FILHO, R. Doença Renal Crônica: Mecanismos da Progressão e Abordagem Terapêutica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.31, supl.1, p.6-12, 2009.

CAREY, R. M.; SMITH, J. R.; ORTT, E. M. Gastrointestinal control of sodium excretion in sodium-depleted conscious rabbits. **American Journal of Physiology**, v.230, n.6, p.1504-8, 1976.

CARRITERS, S. L.; OTT, C. E.; HILL, M.J.; JOHNSON, B. R., CAI, W.; CHANG, J. J.; SHAH, R. G.; SUN, C.; MANN, E. A.; FONTELES, M. C.; FORTE, L. R.; JACKSON, B. A.; GIANNELLA, R. A.; GREENBERG, R. N. Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. **Kidney International**, v.65, n.1, p.40-53, 2004.

CARRITHERS, S. L.; TAYLOR, B.; CAI, W. Y.; JOHNSON, B. R.; OTT, C. E.; GEENBERG, R. N.; JACKSON, B. A. Guanylyl cyclase-C receptor RNAm distribution along the rat nephron. **Regulatory peptides**, v.95, n.1, p.65-74, 2000.

CHÂTEL, R.; MAKÓ, J.; TÓTH, M.; BARNA, I.; LANG, R. E. Atrial natriuretic peptide (ANP) in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. **International Urology and Nephrology**, v.23, n.2, p.177-83, 1991.

CHEN, S. C.; HUNG, C. C.; KUO, M. C.; LEE, J. J.; CHIU, Y. W.; CHANG, J. M.; HWANG, S. J.; CHEN, H. C. Association of dyslipidemia with renal outcomes in chronic kidney disease. **Plos One**, v.8, n.2, p.1-6, 2013.

CHOW K.M.; LIU, Z.C.; CHANG, T.M.S.; Animal Remnant Kidney Model of Chronic Renal Failure Revisited. **Hong Kong Journal of Nephrology**, v.5, n.2, p.57-64, 2003.

collecting duct independent of guanylate cyclase C. **Kidney International**, v.68, n.3, p.1008-1017, 2005.

COMINI, L.; BACHETTI, T.; CARGNONI, A.; BASTIANON, D.; GITTI, G.L.; CECONI, C.; FERRARI, R. Therapeutic modulation of the nitric oxide: all ace inhibitors are not equivalent. **Pharmacology Research**, v.56, n.1, p.42-8, 2007

CORESH, J. ; SELVIN, E.; STEVENS, L.A.; MANZI, J.; KUSEK, J. W.; EGGERS, P.; VAN LENTE, F.LEYEY, A.S. Prevalence of Chronic Kidney Diseases in the United States. **The Journal of the America Medical Association**, v.298, n.17, p. 2038-2047, 2007.

COSTA, A. F. N.; PEREIRA, L. P. M.; FERREIRA, M. L.; SILVA, P. C.; CHAGAR, V. L. A.; SCHANAIDER A. Modelo cirúrgico de insuficiência renal crônica. Estudo em coelhos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.36, n.1, p.78-84, 2009.

CURRIE, M. G.; FOK, K. T.; KATO, J; MOORE, R. J.; HAMRA, F. K.; DUFFIN, K. L.; SMITH C. E. Guanylin, an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.3, p.947-951, 1992.

D'SOUZA, S. P.; DAVIS, M.; BAXTER, G. F. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. **Pharmacology & Therapeutics**, v.101, n.2, p.113-29, 2004.

DANDAN, R. H. Renina e angiotensina. In: As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12ª ed. Rio de Janeiro: Editora AMGH. 2012 p.721-744.

DE BOLD, A. J. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. **Science**, v.230, n.4727, p.767-770, 1985.

DESHMUKH, A. B.; PATEL, J. K. Aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) ameliorates renal failure induced by 5/6 nephrectomy in rat. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 43, n.6, p.718-721, 2011.

DOMINIC ROSSINI, SADIQ, S.; LANKIREDDY, S.; KANE, R. L.; WILT, T. J. Screening for, Monitoring, and Treatment of Chronic Kidney Disease Stages 1 to 3: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force and for an American College of Physicians Clinical. **Annals of Internal Medicine**, v. 156, n.8, p.570-81, 2012.

DUMMER, C. D.; THOMÉ, F. S.; VERONESE, F. V. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.53, n.5, p.446-50, 2007.

EDDY, A. A.; LOPEZ-GUISA, J. M.; OKAMURA, D. M.; YAMAGUCHI, I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. **Pediatric Nephrology**, v.27, n.8, p.1233-1247, 2012.

- ELITSUR, N.; LORENZ, J. N.; HAWKINS, J. A.; RUDOLPH, J. A.; WITTE, D.; YANG, L. EL.; MCDONOUGH, A. A.; COHEN, M. B. The proximal convoluted tubule is a target for the uroguanylin-regulated natriuretic response. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.43, supl.1, p.74-81, 2006.
- FIELD, M. GRAF, L. H.LAIRD, W. J.; SMITH, P. L. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.75, n.6, p.2800-4, 1978.
- FINK, H. A.; ISHARI, A.; TAYLOR, B. C.; GREER, N. L.; DONALD, R. D.; ROSSINI, D.; SADIG, S.; LANKIREDDY, S.; KANE, R. L. WILT, T. J. Screening for, Monitoring, and Treatment of Chronic Kidney Disease Stages 1 to 3: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force and for an American College of Physicians Clinical Practice Guideline. **Annals of Internal Medicine**, v.156, n. 8, p. 570-581, 2012.
- FLECK, C.; APPENROTH, D.; JONAS, P.; KOCH, M.; KUNDT, G.; NIZZE, H., STEIN, G. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats--influence of sex, strain, and surgical procedure. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.57, n.3, p.195-205, 2006.
- FOGO, A. B. Animal Models of FSGS: Lessons for Pathogenesis and Treatment. **Seminars in Nephrology**, v.29, n.2, p.161-71, 2003.
- FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **American Journal of Physiology**, v.275, n.2, p.191-7, 1998
- FORTE, L.R. Guanylin regulatory peptides: structures, biological activities mediated by cyclic GMP and pathobiology. **Regulatory peptides**, v.81, n.1, p.29-39, 1999.
- FRANCH, H. A.; MCCLELLAN, W. C.; MITCH, W. E. Chronic Kidney Disease: Pathophysiology and Influence of Dietary Protein. In: ALPERN, R. J.; HEBERT, S. C. (Ed.). Seldin and Giebisch's **The Kidney**. 4th ed. Burlington, MA: Elsevier, 2007. p. 2615-2669.
- FRANCO, R. J. S. F. Proteção renal durante o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina. **HiperAtivo**, v.5, n.2, p.110-19, 1998.
- FUJIHARA, C. K.; SENA, C. R.; MALHEIROS, D. M.; MATTAR, A. L.; ZATZ, R Short-term nitric oxide inhibition induces progressive nephropathy after regression of initial renal injury. **American Journal of Renal Physiology**, v.290, n.3, p.632-40, 2005.
- FUJIHARA, C. K.; VELHO, M.; MALHEIROS, D. M. A. C.; ZATZ, R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. **Kidney International**, v.67, n.5, p.1913-24, 2005.

FUKAE, H.; KINOSHITA, H.; FUJIMOTO, S.; NAKAZATO, M.; ETO, T. Plasma concentration of uroguanylin in patients on maintenance dialysis therapy. **Nephron**, v.84, n.3, p.206-10, 2000.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p. 373-6, 1980.

GEHR, T. W. B. Curcumin and enalapril ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5% nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. **American Journal of Physiology**, v.302, n.4, p.39-45, 2012.

GHOSH, S. S.; KRIEG, R.; MASSEY, H. D.; SICA, D. A.; FAKHRY, I.; GHOSH, S.;

GHOSH, S. S.; MASSEY, H. D.; KRIEG, R.; FAZELBHOY, Z. A.; GHOSH, S.; SICA, D. A.; FAKHRY, I.; GEHR, T. W. Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: role of inflammation. **American Journal of Physiology**, v.296, n.5, p.1146-57, 2009.

GORRIZ, J. L.; MARTINEZ-CASTELAO, A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. **Transplantation Reviews**, v.26, n.1, p.3-13, 2012.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

GRIFFIN, K. A.; PICKEN, M.; BIDANI, A. K. Method of Mass Reduction is a critical modulator of subsequent Hypertension and Glomerular Injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.4, n.12, p. 2023-2031, 1994.

GUEBRE-EGZIABHER, F.; JUILLARD, L.; KALBACHER, E.; BACHETTA, J.; FOUQUE, D. Inflammation and insulin-resistance: chronic renal disease features. **Néphrologie & Thérapeutique**, v.6, s.1, p.s7-s12, 2010.

HAMRA, F.K.; FORTE, L. R., EBER, S. L. PIDHORODECKYJ, N. V.; KRAUSE, W. J.; FREEMAN, R. H.; CHIN, D. T.; TOMPKINS, J. A.; FOK, K. F.; SMITH, C. E.; DUFFIN, K. L.; SIEGEL, N. L.; CURRIE, M. G. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.90, n.22, p.10464-10468, 1993.

HASEGAWA, K.; MATSUSHITA, Y.; INOUE, T.; MORII, H.; ISHIBASHI, M.; YAMAJI, T. Plasma levels of atrial natriuretic peptide in patients with chronic renal failure. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.63, n.4, p.819-22, 1986.

HASHIM, S.; YUAM, L.; SRIVASTAVA, A.; MADHU, B.; SRIVASTAVA, A.; MADHU, B. Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G α protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways. **American Journal of Physiology**, v.291, n.6, p.3144-53, 2006.

HIROSE, T.; MORI, N. TOTSUNE, K.; MORIMOTO, R.; MAEJIMA, T.; KAWAMURA, T.; METOKI, H.; ASAYAMA, K.; KIKUYA, M. OHKUBO, T.; KOHZUKI, M.; TAKAHASHI, M.; IMAJ, Y. Increased expression of (pro)renin receptor in the remnant kidneys of 5/6 nephrectomized rats. **Regulatory Peptides**, v.15, n.1-3, p.93-9, 2010.

HODGKINS, K. S.; SCHNAPER, H. W. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v.27, n.6, p.901-9, 2012.

HOSTETTER, T. H.; OLSON, J. L.; RENNKE, H. G.; VENKATACHALAM, M. A.;

IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; BUGA, G.M; WOOD, K. S. Endothelium- dependent relaxing factor from pulmonary artery and veins possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, v. 61, n.6, p. 866-79, 1987.

INAGAMI, T. The Centennial of Renin Discovery. **Hypertension**, v.32, n.6, p.953-57, 1998.

IYODA, M.; SHIBATA, T.; HIRAI, Y.; KUNO, Y.; AKIZAWA, T. Nilotinib. Attenuates Renal Injury and Prolongs Survival in Chronic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.22, n.8, p.1486-1496, 2011.

JHA, V.; GARCIA-GARCIA, G., ISEKI, K.; LI, Z.; NAICKER, S.; PLATTNER, B.; SARAN, R.; WANG, A. Y. Chronic Kidney disease; global dimension and perspectives. **The Lancet**, v. 382, n.9888, p.260-72, 2013.

JIA, T.; CARRERO, J. J.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P. The complex role of adiponectin in chronic kidney disease. **Biochimie**, v.94, n.10, p.2150-6, 2012.

JIN, H.; YUAN, Z. Y.; DU, X. H.; SU, G.; ZHANG, L.; WANG, M. X.; DONG, Y.; LIU, D. X.; ZOU, W. Z.; WANG, S. L. Relation between plasma atrial natriuretic peptide (ANP) and glomerular ANP receptors in 5/6 nephrectomized rats. **Chinese Medical Journal**, v.103, n.10, p.794-9, 1990.

JONES-BURTON, C.; MISHRA, S. I.; FINK, J. C.; BROWN, J.; GOSSA, W.; BAKRIS, G. L.; WEIR, M. R. Na in-depth review of the evidence linking dietary salt intake and progression of chronic kidney disease. **American Journal of Nephrology**, v.26, n.3, p.268-75, 2006.

KANG, D. G.; KIM, J. L.; LEE, J. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the Na,K-ATPase activity in the kidney. **Pharmacology Research**, v.41, n.1, p.123-7, 2000.

KASISKE, B. L.; O'DONNELL, M. P.; GARVIS, W. J.; KEANE, W. F. Pharmacologic treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in rat 5/6 nephrectomy model of chronic renal failure. **Circulation Research**, v.62, n.2, p.367-74, 1988.

KEMP, B. A.; HOWELL, N. L.; GILDEA, J. J.; KELLER, S. R.; PADIA, S. H.; CAREY, R. M. AT₂ receptor activation induces natriuresis and lowers blood pressure. **Circulation Research**, v.115, n.3, p.288-99, 2014.

- KIKUCHI, M.; FUJIMOTO, S.; FUKAE, H.; KINOSHITA, H.; KITA, T.; NAKASATO, M. ETO, T. Role of uroguanylin, a Peptide with natriuretic activity, in rats with experimental nephrotic syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.16, n.2, p.392-7, 2005.
- KIM, S. W.; LEE, J.; PAEK, Y. W.; KANG, D. G. CHOI, K. C. Decreased nitric oxid synthesis in rats with kidney renal failure. **Journal of Korean Medical Science**, v.15, p.425-30, 2000.
- KOBORI, H.; NANGAKU, M.; NAVAR, L. G.; NISHIYAMA, A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacological Reviews**, v.59, n.3, p.251-87, 2007.
- KRAMER, A. B.; LAVERMAN, G. D.; VAN GOOR, H.; NAVIS, G. Inter-individual differences in anti-proteinuric response to ACEi in established adriamycin nephrotic rats are predicted by pretreatment renal damage. **The Journal of Pathology**, v.201, n.1, p.160-7, 2003.
- KRIKKEN, J. A.; LAVERMAN, G. D.; NAVIS, G. Benefits of dietary sodium restriction in the management of chronic kidney disease. **Currenty Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.18, n.6, p. 531-8, 2009.
- KUNCOVÁ, J.; SVÍGLEROVÁ, J.; KUMMER, W.; RAJDL, D.; CHOTTOVÁ-DVORÁKOVÁ, M.; TONAR, Z.; NALOS, L. STENGL, M. Parasympathetic regulation of heart rate in rats after 5/6 nephrectomy is impaired despite functionally intact cardiac vagal innervation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.24, n.8, p.2362-70, 2009.
- LAI, E. Y.; LUO, Z.; ONOZATO, M. L.; RUDOLPH, E. H.; SOLIS, G.; JOSE, P. A.; WELLSTEIN, A.; ASLAM, S.; QUINN, M. T.; GRIENGLING, K.; LE, T.; LI, P; PALM, F.; WELCH, W. J.; WILCOX, C. S. Effects of the antioxidant drug tempol on renal oxygenation in mice with reduced renal mass. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v.303, n.1, p. 64-74, 2012.
- LAUTRETTE, A.; LI, S.; ALILI, R. SUNNARBORG, S. W.; BURTIN, M. LEE, D. C.; FRIEDLANDER, G.; TERZI, F. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. **Nature Medicine**, v.11, n.8, p.867-74, 2005.
- LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.6, n.1, p.1-10, 2009.
- LEITMAN, D. C.; AMDRESEN, J. W.; KUNO, T.; KAMISAKI, Y.; CHANG, J. K.; MURAD, F. Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic fator by affinity cross-linking in cultured endotelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.25, p.11650-5, 1986.

LESSA, L. M.; CARRARO-LACROIX, L. R.; CRAJOINAS, R. O.; BEZERRA, C. N.; DARIOLLI, R.; GIRARDI, A. C.; FONTELES, M. C.; MALNIC, G. Mechanisms underlying the inhibitory effects of uroguanylin on NHE3 transport activity in renal proximal tubule. **American Journal of Physiology**, v.303, n.10, p.1399-408, 2012.

LEVEY, A. S.; CORESH, J. Chronic Kidney Disease. **The Lancet**, v.379, p.165-180, 2012.

LEVEY, A. S.; ECKARDT, K.; TSUKAMOTO, Y.; LEVIN, A.; CORESH, J.; ROSSERT, J.; ZEEUW, D.; HOSTETTER, T. H.; LAMEIRE, N.; EKNOYAN, G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney International**, v.67, n.6, p.2089-100, 2005.

LEWIS, E.J.; HUNSICKER, L.G.; BAIN, R.P.; ROHDE, R.D. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v.329, n.20, p.1456-62, 1993.

LI, P.; MA, L. L.; XIE, R. J.; XIE, Y. E.; WEI, R. B.; YIN, M.; WANG, J. Z.; CHEN, X. M. Treatment of 5/6 nephrectomy rats with sulodexide: a novel therapy for chronic renal failure. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.33, n.5, p.644-51, 2012.

LI, X. C.; ZHUO, J. L. Intracellular ANG II directly induces in vitro transcription of TGF- β 1, MCP-1, and NHE-3RNAs in isolated rat renal cortical nuclei via activation of nuclear AT1a receptors. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v.294, n.4, p.1034-45, 2008.

LI, Z.; TALOR-BLAKE, B.; LIGHT, A. R.; GOY, M. F. Guanylin, an endogenous ligand for C-type guanylate cyclase, is produced by goblet cells in the rat intestine. **Gastroenterology**, v.109, n.6, p.1863-75, 1995.

LIU, Y.Z.; ZHANG, Y. M.; KANG, L.; CHEN, P. Z.; WANG, Z. F.; FENG, Y., ZHENG, J. H. Protective effects of rosuvastatin in experimental renal failure rats via improved endothelial function. **Biological Research for Nursing**, v.15, n.3, p.356-64, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8, 2001.

LOPEZ-NOVOA, J. M.; MARTINEZ-SALGADO, C.; RODRIGUEZ-PEÑA, A. B.; HERNANDEZ, F. J. L. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: Therapeutic perspectives. **Pharmacology and Therapeutics**, v.128, n.1, p.61-81, 2010.

LOPEZ-NOVOA, J. M.; RODRIGUEZ-PEÑA, A. B.; ORTIZ, A.; MARTINEZ-SALGADO, C.; MARTINEZ-SALGADO, C.; Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: Clinical implications. **Journal of Translational Medicine**, v.9, n.13, p.1-26, 2011.

LORENZ, J. N.; NIEMAN, M.; SABO, J.; SANFORD, L. P.; HAWKINS, J. A.; ELITSUR, N.; GAWENIS, L. R.; CLARKE, L. L.; COHEN, M. B. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112, n.8, p.1244-54, 2003.

MA, L.; FOGO, A. B. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: Importance of genetic background. **Kidney International**, v.64, n.1, p.350-355, 2003.

MACICA, C. M.; YANG, Y.; HEBERT, S. C.; WANG, W. H. Arachidonic acid inhibits activity of cloned renal K⁺ channel, ROMK1. **American Journal of Physiology**, v.271, n.3, p.588-94, 1996.

MANFRO, R. C.; CARVALHAL, G. F. Transplante Renal. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v.47, n.1, p.14-19, 2003.

MANLEY, H. J. Role of angiotensin-converting-enzyme inhibition in patients with renal disease. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.57, supl.1, p.12-8, 2000.

MATSUKAWA, N. GRZESIK, W. J.; TAKAHASHI, N.; PANDEY, K. N.; PANG, S.; YAMAUCHI, M. SMITHIES, O. The natriuretic peptide receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A**, v. 96, n.13, p.7403-8, 1999.

MIKUSIC, N. L. R.; KRAVETZ, M. C.; KOUYOMDZIAN, N. M.; DELLA PENNA, S. L.; ROSÓN, M. I.; FERNÁNDEZ, B. E.; CHOI, M. R. Signaling pathways involved in renal oxidative injury: role of the vasoactive peptides and the renal dopaminergic system. **Journal of Signal Transduction**, Id. 731350, 2014.

MOLLNAU, H.; WENDT, M. SZÖCS, K.; LASSÈGUE, B. SCHULZ, E.; OELZE, M.; LI, H.; BODENSCHATZ, M. AUGUST, M. KLESCHYOV, A. L.; TSILIMINGAS, N.; WALTER, U.; FÖRSTERMANN, U.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; MÜNDEL, T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circulation Research**, v.90, n.8, p.58-65, 2002.

NAHAS, A. M.; BELLO, A. K. Chronic kidney disease: the global challenge. **The Lancet**, v.385, p.331-40, 2005.

NOVOA, J. M. L.; PEÑA, A. B. R.; ORTIZ, A.; SALGADO, C. M.; HERNÁNDEZ, F.J.L. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: Clinical implication. **Journal of Translational Medicine**, v.9, n.1, p.1-12, 2011.

OBERG, B. P.; MCMENAMIN, F. L.; LUCAS, F. L.; MCMONAGLE, E.; MORROW, J.; IKIZLER, T. A.; HUMMERLFBARB, J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney International**, v.65, n.3, p.1009-16, 2004.

OTS, M ; MACKENZIE, H. S.; TROY, J. L.; RENNKE, H. G.; BRENNER, B. M. Effects of combination therapy with enalapril and losartan on the rate of progression of renal injury in rats with 5/6 renal mass ablation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.9, n.2, p.224-30, 1998.

PASSOS-SILVA; D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. **Clinical Science**, v.124, n.7, p.443-56, 2013.

PERCOITS-FILHO, R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.26, n.3, supl.1 p.4-5, 2004.

PERKINS, A.; GOY, M. F.; LI, Z. Uroguanylin is expressed by enterochromaffin cells in the rat gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v.113, n.3, p.1007-14, 1997.

POTTHAST, R.; EHLER, E.; SCHEVING, L. A.; SINDIC, A.; SCHLATTER, E.; KUHN, M. High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. **Endocrinology**, v.142, n.7, p. 3087-97, 2001.

QIAN, X.; MOSS, N. G.; FELLNER, R. C.; GOY, M. F. Circulating prouroguanylin is processed to its active natriuretic form exclusively within the renal tubules. **Endocrinology**, v.149, n.9, p.4499-4509, 2008.

QIAN, X.; MOSS, N. G.; FELLNER, R. C.; TAYLOR-BLAKE, B.; GOY, M. F. The rat kidney contains high levels of prouroguanylin (the uroguanylin precursor) but does not express GC-C (the enteric uroguanylin receptor). **American Journal of Physiology**, v.300, n.2, p.561-73, 2011.

QUIROZ, Y.; FERREBUZ, A.; VAZIRI, N. D.; RODRIGUEZ-ITURBE. Effect of chronic antioxidant therapy with superoxide dismutase-mimetic drug, tempol, on progression of renal disease in rats with renal mass reduction. **Nephron Experimental Nephrology**, v.112, n.1, p.31-42, 2009.

REGGENENTI, P.; SCHIEPPATI, A.; REMUZZI, G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. **The Lancet**, v.357, n.9268, p.1601, 2001.

REMUZZI, G.; BERTANI, T. Pathophysiology of progressive nephropathies. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n.20, p.1448-56, 1998.

REMUZZI, G.; PERICO, N.; MACIA, M.; RUGGENENTI, P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. **Kidney International**, v.98, supl.99, p.57-65, 2005.

RIELLA, M. C.; PECOITS-FILHO, R. Insuficiência Renal Crônica Toxinas Urêmicas. In: RIELLA, M.C. **Princípios de nefrologia e equilíbrio hidroeletrólítico** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.827-844.

RIGATTO, K. V.; BÖHLKE, M. IRIGOUYEN, M. C. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: da Fisiologia ao Tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n.3, p.1-5, 2004.

- RODRIGUEZ-ITURBE, B.; FERREBUZ, A.; VANEGAS, V.; QUIROZ, Y.; ESPINOZA, F.; PONS, H.; VARIZI, N. D. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. **Kidney International**, v.68, p. 2131-2142, 2005.
- ROSARIO, R. F.; WESSON, D. E. Primary hypertension and nephropathy. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.15, n.2, p.130-4, 2006.
- ROSENBERG, M. E.; SMITH, L. J.; CORREA-ROTTER, R.; HOSTETTER, T.H. The paradox of the renin-angiotensin system in chronic renal disease. **Kidney International**, v.45, n.2, p.403-10, 1994.
- ROY, N.; GURUPRASAD, M. R.; KONDAIAH, P.; MANN, E. A.; GIANNELLA, R. A.; VISWESWARIAH, S. S. Protein kinase C regulates transcription of the human guanylate cyclase C gene. **European Journal of Biochemistry**, v.268, n.7, p.2160-71, 2001.
- RUIZ-ORTEGA, M.; GONZÁLEZ, S.; SERÓN, D.; CONDOM, E.; BUSTOS, C.; LARGO, R. GONZÁLEZ, E.; ORTIZ, A.; EGIDO, J. ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis. **Kidney International**, v.48, n.6, p.1778-91, 1995.
- RUIZ-ORTEGA, M.; RUPÉREZ, M.; ESTEBAN, V.; RODRÍGUEZ-VITA, J.; SÁNCHEZ-LOPEZ, E.; CARVAJAL, G.; EGIDO, J. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, n.1, p.16-20, 2006.
- RÜSTER, C.; WOLF, G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, p.2985-2991, 2006.
- SCHLUETER, N.; STERKE, A.; WILLMES, D. M.; SPRANGER, J.; JORDAH, J.; BIRKENFELD, A. L. Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. **Pharmacology & Therapeutics**, v.144, n.1, p.12-27, 2014.
- SCHULZ, S.; GREEN, C. K.; YUEN, P. S. T.; GABERS, D. L. Guanylate cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. **Cell Press**, v.63, n.5, p.941-948, 1990.
- SESSO, R. C. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. M.; BURDMANN, E. A. Censo Brasileiro de Diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.32, n.4, p.380-84, 2009.
- SESSO, R.; GORDAN, P.; Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil, 2007. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.29, n.1, p.9-12, 2007.
- SILVA, A. C. S.; PINHEIRO, S. V. B.; SANTOS, R. A. S. Peptídeos e interação coração-rim. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.15, n.3, p.134-143, 2008.
- SINDIC, A. Current Understanding of Guanylin Peptides Actions. **International Scholarly Research Notices Nephrology**, Id. 813648, 2013.

SINDIC, A.; BAŞOĞLU, C.; CERÇİ, A.; HIRSCH JR; POTTHAST, R.; KUHN, M.; GHANEKAR, Y.; VISWESWARIAH, S. S.; SCHLATTER E. Guanylin, uroguanylin, and heat-stable euterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells. **The Journal of biological chemistry**, v.277, n.20, p.17758-64, 2002.

SINDIC, A.; SCHLATTER, E. Cellular Effects of Guanylin and Uroguanylin. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, n.3, p.607-16, 2006.

SINDIC, A.; VELIC, A.; BASOĞLU, C.; HIRSCH, J. R.; EDEMIR, B.; KUHN, M.; SCHLATTER, E. Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. **Kidney International**, v.68, n.3, p.1008-17, 2005.

Single-nephron adaptations to partial renal ablation in the dog. **American Journal of Physiology**, v.258, n.3, p.495-503, 1990.

SLATOPOLSKY, E.; ELKAN, I.O.; WEERTS, C.; BRICKER, N. S.; Studies on the characteristics of the control system governing sodium excretion in uremic man. **The Journal of Clinical Investigation**, v.47, n.3, p.521-530, 1968.

SLEE, A. D. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. **Nutrition & Metabolism**, v.9, n. 36, 2012.

SMITH, S.; ANDERSON, S.; BALLERMANN, B. J.; BRENNER, B. M. Role of atrial peptide in adaptation of sodium excretion with reduced renal mass. **The Journal of Clinical Investigation**, v.77, n.4, p.1395-8, 1986.

SNIVELY, C. S.; GUTIERREZ, C. Chronic Kidney Disease: Prevention and Treatment of Common Complications. **American Family Physician**, v.70, n.10, p.1921-8, 2004.

SOLDATOS, G.; COOPER, M. E. Diabetic nephropathy: Important pathophysiologic mechanisms. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.82, suppl.1, p.75-79, 2008.

SOUZA, L. L.; COSTA-NETO, C. N. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. **Journal of Cellular Physiology**, v.227, n.5, p.2117-22, 2012.

STRIPPOLI, G. F.; NAVANEETHAN, S. D.; JOHNSON, D. W.; PERKOVIC, V.; PELLEFRINI, F.; NICOLUCCI, A.; CRAIG, J. C. Effects of statins in patients with chronic kidney disease: meta-analysis and meta-regression of randomised controlled trials. **British Medical Journal**, v.336, n.7645, p.645-51, 2008.

SUNG, C. C.; HSU, Y. C.; CHEN, C. C.; LIN, Y. F.; WU, C. C. Oxidative estresse and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Id. 301982, 2013.

SUZUKI, Y., RUIZ-ORTEGA, M. GOMEZ-GUERRERO, C.; TOMINO, Y.; EGITO, J. Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, n.8, p.1423-6, 2003.

TAAL, M. W.; BRENNER, B. M. Adaptation to Nephron Loss and Mechanisms of Progression in Chronic Kidney Disease. In: **Brenner & Rector's The Kidney**. 9ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p1918-1971.

TERRA, F. S.; COSTA, A. M. D. D.; FIGUEIREDO, E. T.; MORAIS; COSTA, R. D. As principais complicações apresentadas pelos pacientes renais crônicos durante as sessões de hemodiálise. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.8, n.3, p.187-92, 2010.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. **Pharmacological Review**, v.59, n.1, p.54-87, 2007.

VOLPE, M. Natriuretic peptides and cardio-renal disease. **International Journal of Cardiology**, v.176, n.3, p.630-9, 2014.

YASHIRO, M.; KAMATA, T.; SEGAWA, H.; KADOYA, Y.; MURAKAMI, T.; MUSO, E. Comparisons of cystatin C with creatinine for evaluation of renal function in chronic kidney disease, **Clinical and Experimental Nephrology**, v.13, n.6, p.598-604, 2009.

YOSHIDA, Y.; FOGO, A.; SHIRAGA, H.; GLICK, A. D.; ICHIKAWA, I. Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation. **Kidney International**, v.33, n.4, p.855-67, 1988.

ZATZ, R. Insuficiência renal crônica (DRC) In: RIELLA, M.C. **Princípios de nefrologia e equilíbrio hidroeletrólítico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 804-814.

ZATZ, R.; AC SEGURO, A. C.; MALNIC, G. Insuficiência (Injúria) Renal Aguda. In: **Bases fisiológicas da nefrologia**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012. p.291-313.

ZHANG, B.; CHEN, N.; SHI, W.; WANG, W., SHI, H.; YU, H. Peritubular capillary loss is ameliorated by ramipril or valsartan treatment. **Microcirculation**, v.15, n.4, p.337-48, 2008.