

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Departamento de Fisiologia e Farmacologia**  
**Dissertação de Mestrado**  
**Curso de Mestrado**

**Estudo do Metabolismo Renal da Guanilina  
e das Interações entre Guanilina e Uroguanilina  
com os Peptídeos Natriuréticos ANP e  
Urodilatina**

**Messias Simões dos Santos Neto**

**Fortaleza-CE, junho de 1999**

## RESUMO

A enterotoxina, termo-estável da E.coli (STa), guanilina (Guan) e o uroguanilina (UROG) ligam-se e ativam a guanilil-ciclase C (GCC), expressada no rim e no intestino. O peptídeo natriurético atrial (ANP) e seu similar renal (urodilatina, UROD) têm efeitos natriuréticos bem conhecidos. Eles ativam a guanilil-ciclase A (GC-A). Guan e a UROG compartilham de atividades natriurética e caliurética. Enquanto Guan é inativada *in vitro* pela quimiotripsina, UROG resiste ao ataque da mesma enzima. Foram realizadas experiências no rim perfundido de rato com quimostatina (inibidor inespecífico de proteases - 600 µg/ml) e um inibidor selético de quimotripsina e tripsina (BTCI - dose quimostatina-equimolar), para tentar evidenciar possível metabolismo renal da Guan. É também nosso objetivo investigar possíveis sinergismos entre ANP, UROD, Guan e UROG. Na dose utilizada, quimostatina não interfere na reabsorção tubular fracionada renal de eletrólitos (sódio - %TNa<sup>+</sup>; potássio - %TK<sup>+</sup>; cloreto - %TCl). Quando introduzida após quimostatina, Guan reduziu o %TNa<sup>+</sup> (de 81,3±1,9% para 72,7±2,45%; p <0,05). Guan (0,3 µg/ml) *per si* não teve nenhum efeito sobre o %TNa<sup>+</sup>. Nós concluímos que Guan sofre metabolização renal, passível de prevenção somente pela quimostatina. O pré-tratamento com ANP (0,1 ng/ml) potencializou a atividade natriurética (redução na reabsorção tubular fracionada renal de sódio - %TNa<sup>+</sup>: 86,4±3,35% para 68,5±1,67%, p<0,05) da Guan (0,3 µg/ml) e sua atividade caliurética (redução do %TK<sup>+</sup>; de 76,0±6,26% para 50,4±3,13%; p<0,05), mas inibiu a redução induzida pela UROG (0,5 µg/ml) em %TNa<sup>+</sup> (de 64,1±2,37% para 85,2±1,93%; p<0,05), e em %TK<sup>+</sup> (de 49,0±4,43% para 61,2±3,61%). UROD (0,1ng/ml) potencializou também a natriurese (redução de %TNa<sup>+</sup> = 69,0±1,93%, p<0,05) e a caliurese (redução de %TK<sup>+</sup> = 45,8±3,61%, p<0,05) induzidas pela Guan. Por outro lado, inibiu (p<0,05) a redução de %TNa<sup>+</sup> da UROG a 82,1±1,67% assim como de %TK<sup>+</sup> (75,7±3,13%). O sinergismo entre ANP e UROD com Guan e o inesperado antagonismo entre ANP e UROD com UROG indicam possíveis interações entre os receptores natriuréticos dos peptídeos (NPR) e os receptores de acoplados ao GC-C. A existência de outros subtipos/isoformas dos receptores que medeiam as ações renal da Guan e

da UROG também devem ser consideradas plausíveis. Estes achados podem ter conseqüências fisiopatológicas importantes na insuficiência cardíaca na qual os níveis séricos e/ou a excreção urinária dos quatro peptídeos está marcadamente elevada.

## ABSTRACT

Guanylin and uroguanylin share natriuretic and kaliuretic activities. While guanylin is inactivated by chymotrypsin "in vitro", uroguanylin resists to chymotrypsin attack. Experiments were done in the perfused rat kidney with chymostatin (a protease inhibitor - 600  $\mu\text{g/ml}$ ) to search for a possible renal metabolism of guanylin. E.coli heat-stable enterotoxin (STa), guanylin and uroguanylin also bind to and activate membrane guanylate-cyclase C (GC-C) expressed in the kidney and intestine. Atrial natriuretic peptide (ANP) and its renal form (urodilatin, UROD) have well known natriuretic effects and activate guanylate-cyclase A (GC-A). It is also our purposal to search for possible synergisms between ANP, UROD, guanylin and uroguanylin. At the dose used, chymostatin lacks effect in electrolyte reabsorptions. When introduced after chymostatin, guanylin lowered  $\%T\text{Na}^+$  (from  $81.3\pm 1.9$  to  $72.7\pm 2.45$ ,  $p<0.05$ ). Guanylin ( $0.3 \mu\text{g/ml}$ ) itself had no effects in  $\%T\text{Na}^+$ . We concluded that guanylin undergoes renal metabolism. Pretreatment with ANP ( $0.1 \text{ ng/ml}$ ) enhanced guanylin ( $0.3\mu\text{g/ml}$ ) natriuretic activity (reduction in  $\%T\text{Na}^+$ ; from  $\%T\text{Na}^+$ :  $86.4\pm 3.35\%$  to  $68.5\pm 1.67\%$ ,  $p<0.05$ ) and its kaliuretic activity (reduction in  $\%T\text{K}^+$ ; from  $76.0\pm 6.26\%$  to  $50.4\pm 3.13\%$ ;  $p<0.05$ ), but clearly inhibited ( $p<0.05$ ) uroguanylin-induced ( $0.5\mu\text{g/ml}$ ) reduction in  $\%T\text{Na}^+$  (from  $64.1\pm 2.37\%$  to  $85.2\pm 1.93\%$ ;  $p<0.05$ ), and in  $\%T\text{K}^+$  (from  $49.0\pm 4.43\%$  to  $61.2\pm 3.61\%$ ). UROD ( $0.1\text{ng/ml}$ ) also enhanced the guanylin-induced natriuresis (reduction in  $\%T\text{Na}^+$  =  $69.0\pm 1.93\%$ ,  $p<0.05$ ) and kaliuresis ( $\%T\text{K}^+$  =  $45.8\pm 3.61\%$ ,  $p<0.05$ ), and inhibited ( $p<0.05$ ) the reduction in  $\%T\text{Na}^+$  of uroguanylin to  $17.9\pm 1.67$  as well as its reduction  $\%T\text{K}^+$  to  $75.7\pm 3.13\%$ . The synergism between ANP and UROD with guanylin and the unexpected antagonism between ANP and UROD with uroguanylin point out to possible interactions between natriuretic peptides receptors (NPR) and GC-C-coupled receptors. The existence of other subtypes/isoforms of receptors mediating the renal actions of guanylin and uroguanylin may also be considered. These findings can have important pathophysiological consequences in states such as heart failure in which the serum levels and/or the urinary excretion of the four peptides are markedly elevated.

## COLABORADORES

Prof Dr Manassés C. Fonteles, co-autor responsável pela idealização dos experimentos e orientação de todo este trabalho;

O Prof Dr Leonard R. Forte colaborou com provisão de peptídeos imprescindíveis aos experimentos;

Prof Dr Aldo A. M. Lima, Profa Dra Helena S. A. Monteiro e Profa Dra Gisela Camarão colaboraram voluntariamente na redação e revisão desta dissertação;

Sílvia Freire de França colaborou como assistente de laboratório nas fases de elaboração de soluções, confecção e dosagens bioquímicas dos experimentos;

Domingos Barreto de Oliveira colaborou como bioquímico responsável nas fases de elaboração de soluções e dosagens bioquímicas dos experimentos;

Bento F. de Oliveira e Juciê A. da Silva colaboraram como funcionários do biotério que forneceu a maioria dos animais de experimentação;

André F. Carvalho colaborou como bolsista de iniciação científica na confecção de quase todos experimentos;

Alessandra C. Silva colaborou voluntariamente na confecção de alguns experimentos;

O Depto de Fisiologia e Farmacologia e a Unidade de Pesquisas Clínicas/UFC - HUWC colaboraram com suporte docente, físico e administrativo;

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico colaborou parcialmente com o suporte financeiro

## **AGRADECIMENTO E DEDICATÓRIA**

*A Deus!...*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>COLABORADORES</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMENTO E DEDICATÓRIA</b>	<b>V</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>

<b>2.1.</b>	<b>CÉLULAS E MEMBRANAS – O FLUXO DA VIDA</b>	<b>3</b>
<b>2.2.</b>	<b>PRIMEIRO FATOR NATRIURÉTICO: ANP</b>	<b>5</b>
2.2.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	5
2.2.2.	DESCOBERTA E ESTRUTURA	6
<b>2.3.</b>	<b>PROTEÍNA G – DO GTP AO AMPC</b>	<b>7</b>
2.3.1.	OS PRIMEIROS INDÍCIOS FORAM ENTRELAÇADOS AO AMP	7
2.3.2.	DESCOBERTA DA PROTEÍNA G	8
2.3.3.	ESTRUTURA E MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA G	10
<b>2.4.</b>	<b>ALVOS DA PROTEÍNA G</b>	<b>11</b>
2.4.1.	SISTEMA ADENILIL CICLASE (AMPC)	11
2.4.2.	SISTEMA DA FOSFOLIPASE C / FOSFATO INOSITOL / $Ca^{++}$	12
<b>2.5.</b>	<b>RECEPTORES RELACIONADOS À GUANILIL CICLASE (GC) E AO GMPC</b>	<b>14</b>
<b>2.6.</b>	<b>ESTRUTURA DO GC-C</b>	<b>14</b>
2.6.1.	MODULAÇÃO DA ATIVIDADE PELO ATP	15
<b>2.7.</b>	<b>TOXINAS E TRANSPORTE EPITELIAL DE ÁGUA E ELETRÓLITOS</b>	<b>15</b>
2.7.1.	MONOFOSFATO CÍCLICO DE ADENOSINA (AMPC)	16
2.7.2.	ÍON CÁLCIO INTRACELULAR ( $Ca^{++}$ )	17
2.7.3.	REARRANJO DO CITOESQUELETO CELULAR	18
2.7.4.	MONOFOSFATO CÍCLICO DE GUANOSINA (GMPC)	18
<b>2.8.</b>	<b>INDAGAÇÃO DOS EFEITOS RENAIIS DA STA</b>	<b>21</b>
<b>2.9.</b>	<b>DESCOBERTA DO FNS</b>	<b>23</b>
2.9.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
2.9.2.	ISOLAMENTO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE	23
<b>2.10.</b>	<b>DESCOBERTA DA GUANILINA</b>	<b>24</b>
<b>2.11.</b>	<b>ESTRUTURA DA GUANILINA (E STA)</b>	<b>25</b>
2.11.1.	ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA GUANILINA (E STA)	26
<b>2.12.</b>	<b>PRESENÇA DA GUANILINA EM ÓRGÃOS E TECIDOS</b>	<b>29</b>
<b>2.13.</b>	<b>EXPRESSÃO DE RNAM DO GC-C E TECIDOS SENSÍVEIS À STA</b>	<b>30</b>
2.13.1.	FÍGADO E TRATO BILIAR	30
2.13.2.	SISTEMA REPRODUTOR	30
2.13.3.	TRATO RESPIRATÓRIO	31



2.13.4. PÂNCREAS	31
<b>2.14. EFEITOS BIOLÓGICOS DA GUANILINA (E STA)</b>	<b>31</b>
2.14.1. INVESTIGAÇÃO RENAL DA GUANILINA	32
<b>2.15. DESCOBERTA DA UROGUANILINA</b>	<b>32</b>
2.15.1. ESTRUTURA DA UROGUANILINA	33
2.15.2. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA UROGUANILINA	34
2.15.3. DISTRIBUIÇÃO EM ÓRGÃOS E TECIDOS	35
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>37</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>39</b>
<b>5.1. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA PARA SÍNTESE DA LISIL-GUANILINA</b>	<b>39</b>
<b>5.2. CEPA UTILIZADA E MEIO DE CULTURA</b>	<b>40</b>
<b>5.3. PURIFICAÇÃO DA GUANILINA RECOMBINANTE</b>	<b>40</b>
<b>5.4. SÍNTESE DE GUANILINA E UROGUANILINA</b>	<b>41</b>
<b>5.5. QUIMOSTATINA</b>	<b>41</b>
5.5.1. DESCRIÇÃO FÍSICA	41
5.5.2. ESTRUTURA	42
5.5.3. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO	42
5.5.4. SOLUBILIDADE E ESTOCAGEM	42
<b>5.6. BTCI</b>	<b>43</b>
5.6.1. CONCEITOS GERAIS	43
5.6.2. DESCRIÇÃO E CARACTERÍSTICAS	43
<b>5.7. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO</b>	<b>43</b>
<b>5.8. SISTEMA E SOLUÇÃO PARA PERFUSÃO</b>	<b>44</b>
5.8.1. APARELHOS PARA PERFUSÃO DE RIM ISOLADO	46

5.8.2.	ELABORAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PERFUSÃO	46
<b>5.9.</b>	<b>CALIBRAÇÃO DO SISTEMA</b>	<b>47</b>
<b>5.10.</b>	<b>TÉCNICA DE ABORDAGEM CIRÚRGICA</b>	<b>53</b>
<b>5.11.</b>	<b>ANÁLISE HISTOLÓGICA</b>	<b>53</b>
<b>5.12.</b>	<b>PROTOCOLO EXPERIMENTAL GERAL</b>	<b>54</b>
<b>5.13.</b>	<b>ANÁLISE BIOQUÍMICA</b>	<b>54</b>
<b>5.14.</b>	<b>FÓRMULAS DOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL</b>	<b>54</b>
<b>5.15.</b>	<b>ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANALÍTICA</b>	<b>58</b>
<b>5.16.</b>	<b>PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA COMBINAÇÃO DE PEPTÍDEOS</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>6.1.</b>	<b>VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL</b>	<b>60</b>
<b>6.2.</b>	<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS PROTOCOLADOS</b>	<b>61</b>
6.2.1.	PRESSÃO DE PERFUSÃO	62
6.2.2.	FLUXO URINÁRIO	65
6.2.3.	RITMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR	66
6.2.4.	REABSORÇÃO TUBULAR FRACIONADA DE SÓDIO	71
6.2.5.	REABSORÇÃO TUBULAR FRACIONADA DE POTÁSSIO	72
6.2.6.	REABSORÇÃO TUBULAR FRACIONADA DE CLORETO	75
6.2.7.	CLEARANCE OSMOLAR	76
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>80</b>
<b>7.1.</b>	<b>EXPERIMENTOS CONTROLE</b>	<b>80</b>
<b>7.2.</b>	<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS PROTOCOLADOS</b>	<b>80</b>
7.2.1.	METABOLISMO DA GUANILINA	80
7.2.2.	IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DA UROGUANILINA	82
7.2.3.	COMPARAÇÃO DO EFEITOS RENAIIS DE BAIXAS DOSES DE GUANILINA E UROGUANILINA - INFERÊNCIA DAS RELAÇÕES DE DOSE-EFEITO E TEMPO-EFEITO.	82

7.2.4.	EFEITOS NEFROTÓXICOS OU FISIO-FARMACOLÓGICOS DE QUIMOSTATINA E BTCI NA PERFUSÃO DE RIM ISOLADO DE RATO.	83
7.2.5.	INTERAÇÕES ENTRE QUIMOSTATINA/BTCI E O METABOLISMO RENAL DA GUANILINA	84
7.2.6.	COMPARAÇÃO DO EFEITOS RENAIIS DE BAIXAS DOSES DE ANP E URODILATINA - INFERÊNCIA DAS RELAÇÕES DE DOSE-EFEITO E TEMPO-EFEITO.	86
7.2.7.	INTERAÇÕES ENTRE ANP / URODILATINA & GUANILINA / UROGUANILINA DURANTE A PERFUSÃO DE RIM ISOLADO DE RATO.	87
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>92</b>
<b>10.</b>	<b>APÊNDICE I - ESTATÍSTICA ANALÍTICA DOS EXPERIMENTOS CONTROLES</b>	<b>108</b>
<b>11.</b>	<b>APENDICE II- GRÁFICOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PROTOCOLADOS</b>	<b>116</b>
<b>11.1.</b>	<b>QUIMOSTATINA</b>	<b>116</b>
<b>11.2.</b>	<b>BTCI</b>	<b>123</b>
<b>11.3.</b>	<b>ANP</b>	<b>130</b>
<b>11.4.</b>	<b>URODILATINA</b>	<b>146</b>
<b>11.4.</b>	<b>URODILATINA</b>	<b>146</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2-1 : STa estimula a guanilil ciclase e aumenta o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) produzindo secreção de cloreto em epitélios tubulares renais e intestinais (Fonte: Adaptado de Katzung, 1994-a).....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2-2: Seqüência linear dos 15 aminoácidos da região N-terminal da guanilina. * Arranjo gerado em 90 % das vezes quando sob oxidação atmosférica espontânea.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 2-3: Seqüência linear de aminoácidos da região N-terminal da guanilina humana, da guanilina de rato, da guanilina de gambá e a da STa.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 2-4 : Seqüência linear de aminoácidos da região N-terminal de uroguanilina e guanilina humanas e de gambá .....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 5-1: Ilustração do Sistema.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 5-2 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração da velocidade da bomba vs fluxo medido na cânula de perfusão renal.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 5-3 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração da velocidade da bomba vs pressão de perfusão medida na cânula de perfusão renal.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 5-4 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração da velocidade da bomba vs medidas do fluxômetro acoplado em série com o sistema de perfusão renal.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 5-5 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração das medidas do fluxômetro vs fluxo medido na cânula de perfusão renal.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 5-6 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração das medidas do fluxômetro vs pressão de perfusão medida na cânula de perfusão renal.....</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2-1: Descritiva de Efeitos Fisiológicos Mediados por ProteínasG.....</b>	<b>10</b>
<b>Tabela 5-1 : Parâmetros de Função Renal (símbolos, unidade de medidas, forma de cálculo empregando fórmulas, aparelhos ou método de dosagem ou inferência) ....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 6-1: Número (n) de animais em cada grupo experimental, número de amostras correspondente aos valores de média e erro padrão da média (e.p.m.) e número total de amostras por cada grupo experimental.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 10-1: Pressão de perfusão aferida da artéria renal (PP; mmHg).....</b>	<b>108</b>
<b>Tabela 10-2: Fluxo urinário (FU; ml/g/min).....</b>	<b>109</b>
<b>Tabela 10-3: Ritmo de filtração glomerular (RFG; ml/g/min) .....</b>	<b>110</b>
<b>Tabela 10-4: Reabsorção tubular fracionada de sódio (%TNa<sup>+</sup>; %) .....</b>	<b>111</b>
<b>Tabela 10-5: Reabsorção tubular fracionada de potássio (%TK<sup>+</sup>; %).....</b>	<b>112</b>
<b>Tabela 10-6: Reabsorção tubular fracionada de cloreto (%TCl<sup>-</sup>; %).....</b>	<b>113</b>
<b>Tabela 10-7: Clearance osmolar (Cosm; ml/g/min) .....</b>	<b>114</b>
<b>Tabela 10-8: Clearance de água livre (C água livre; ml/g/min).....</b>	<b>115</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviação	Termo
%ECI <sup>-</sup>	Excreção fracionada de cloreto
%EK <sup>+</sup>	Excreção fracionada de potássio
%ENa <sup>+</sup>	Excreção fracionada de sódio
%TCI <sup>-</sup>	Reabsorção tubular fracionada de cloreto
%TK <sup>+</sup>	Reabsorção tubular fracionada de potássio
%TNa <sup>+</sup>	Reabsorção tubular fracionada de sódio
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ATP	Trifosfato de adenosina
BTCI	black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor
C água livre	Clearance de água livre
Cosm	Clearance osmolar
FU	Fluxo urinário
GC-A	Guanilil-ciclase A
GC-B	Guanilil-ciclase B
GC-C	Guanilil-ciclase C
GDP	Difosfato de guanosina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
Guan	Guanilina
NPR	Receptores natriuréticos dos peptídes
PP	Pressão de perfusão
Quim	Quimostatina

RFG	Ritmo de filtração glomerular
STa	Enterotoxina termo-estável da E.coli
UROD	Urodilatina
UroD	Urodilatina
UroG	Uroguanilina

## 1. INTRODUÇÃO

A regulação dos processos de transporte epitelial de eletrólitos nos rins e intestinos interferem criticamente na manutenção da vida. Hormônios, neurotransmissores e fatores de controle local têm sido implicados na regulação da homeostase de sal e água. Mediadores implicados diretamente nesta regulação, o peptídeo natriurético atrial (ANP), a urodilatina, a guanilina e a uroguanilina não entram nas células alvo para exercerem seus efeitos. Eles apresentam afinidades específicas por seus receptores que traduzem suas mensagens em segundos mensageiros. Este processo, chamado de transdução de sinal, altera as concentrações intracelulares do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) uma das formas de linguagens de comunicação entre patógenos produtores da enterotoxina termo-estável (STa) e células do hospedeiro.

Desde a sua descoberta, guanilina está presente de forma marcante no trato gastrointestinal de mamíferos. Também é encontrado em uma forma circulante no sangue correspondente a pró-guanilina humana, em diversos tecidos e órgãos de mamíferos e no trato digestivo de aves. Existe a sugestão de que os rins regulem o metabolismo e/ou a filtração da guanilina. Assim como a STa, guanilina apresenta afinidade pela guanilato ciclase ligada a classe GC-A.

Uroguanilina é o segundo hormônio descoberto da classe das guanilina. É um peptídeo altamente ácido isolado na urina do gambá. O peptídeo contém 53% de identidade com os aminoácidos da guanilina. Uroguanilina apresenta afinidade pelo GC-A de forma diretamente proporcional à sua potência, sendo 10 vezes mais potente que guanilina e 10 vezes menos potente que STa. Uroguanilina, assim como STa, resiste a ação de proteases enquanto a guanilina não.

O átrio do coração é dominado por grandes concentrações de ANP, que, assim como seu análogo de origem renal – a urodilatina, tem afinidade pela guanilato ciclase ligada a classe GC-A e GC-B. O ANP aumenta o ritmo de filtração glomerular e inibe a reabsorção tubular de sódio e água nos rins. ANP produz natriurese dependente de pressão ou pressão



natriurética, daí porque infusões de ANP, mesmo em grandes quantidades, não aumentarem a natriurese ou a diurese quando há redução dos níveis da pressão arterial. Embora compartilhem a mesma família de receptores e o mesmo segundo mensageiro guanilinas e atriopeptinas não compartilham os mesmos receptores da guanilato-ciclase. A verificação de sinergismos entre ANP/urodilatina e guanilinas pode fornecer importantes informações acerca do mecanismo de ação renal das guanilinas.

Enquanto a maioria dos pesquisadores centraliza seus estudos no trato gastrointestinal, nosso interesse é a avaliação do efeito das guanilinas no rim e desta forma compreendermos melhor a homeostase do sódio e da água. O emprego de inibidores de proteases pode caracterizar e explicar melhor os efeitos renais da guanilina sob aspectos das interações com proteases renais. Neste sentido avaliaremos inibidores de proteases como ferramentas farmacológicas e como drogas com potencialidades tóxica e/ou terapêutica. Assim sendo, o rim isolado e perfundido do rato oferece excelentes condições como modelo experimental.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Células e membranas – o fluxo da vida*

A dinâmica da troca de fluidos entre os meios interno e externo é fundamental para a existência dos seres vivos. Em seres cujo nível de organização celular é complexo, as trocas de fluidos entre compartimentos do próprio corpo também são de fundamental importância para a manutenção da vida. Sendo as membranas celulares vivas extremamente permeáveis à água, bem como desprovidas de qualquer meio físico direto capaz de regular o fluxo de água (Powell et al, 1985; O'Grady et al, 1987; Guyton, 1996-a; Borke et al, 1996), como se explica o controle do fluxo de água através das membranas biológicas vivas? Como se explica a existência da própria vida?

A vida das células depende da homeostase do meio intracelular. No processo evolutivo, houve crescente especialização das membranas celulares vivas. São os canais protéicos, as proteínas carreadoras implantadas na bicamada lipídica que conferem seletividade às membranas celulares. Principalmente pela manutenção de gradientes de concentração de eletrólitos e/ou proteínas, as membranas celulares vivas e seletivas são responsáveis por fenômenos de osmose e conseqüentemente controle do fluxo de fluidos. Em seres pluricelulares, a seletividade da membrana plasmática das células que compõem os epitélios são de importância primordial. Através destes epitélios se faz a absorção de água, eletrólitos, aminoácidos e carboidratos, além da excreção e eliminação de subprodutos do metabolismo (epitélios intestinal e tubulares renal p.ex.). A natureza seletiva da membrana celular nos ajuda a compreender a vida (Powell et al, 1985; O'Grady et al, 1987; Guyton, 1996-b; Borke et al, 1996).

Mesmo em condições fisiológicas para seres humanos, a quantidade de água corporal varia de 45 a 75 % do peso corporal. Observa-se que a fração corpórea de água é menor nos idosos e obesos do sexo feminino. Na verdade, há uma grande variação individual deste percentual em função do sexo, da massa de tecido adiposo e nos extremos de idade. Entretanto, no dia-a-dia, ocorre uma marcante constância deste percentual que é preservado fisiologicamente, dentro de certos limites, nos indivíduos sadios (Murray, 1998; Borke et al, 1996; Way, 1994).

A fisiologia dos sistemas digestivo (intestinos) e urinário (rins) interage com a manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico. Nossa maior superfície de contato com o meio externo ( $\approx 200 \text{ m}^2$ ), representada pela mucosa intestinal, é responsável pela absorção de algo em torno de 9 litros de líquidos que contêm as necessidades diárias de carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais. Em condições normais, são secretados 6700 ml de fluidos diariamente pelo epitélio do trato digestivo e, como a capacidade absorptiva diária do intestino delgado é de 20 litros, são perdidos apenas 100 ml de fluidos nas fezes (Snipes, 1997; Borke et al, 1996; Guyton, 1996-b). Principais responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico do corpo, os rins recebem 12 a 30 % do débito cardíaco (1,2 litros/min para um indivíduo de 70 Kg) e filtram 20% do fluxo plasmático renal (125 ml/min). Ao fim do dia os rins filtraram 180 litros de plasma, quase quatro vezes toda a água corpórea. Reabsorvem ainda em seus túbulos 99 % da água filtrada e, de forma seletiva, quantidade variável dos solutos, produzindo não mais que 1400 ml de urina. Considerando-se o peso médio de 150 g para cada rim, os rins recebem  $4000 \times 10^{-3} \text{ ml/g/min}$  de sangue, filtram  $416,67 \times 10^{-3} \text{ ml/g/min}$  de plasma e produzem fluxo urinário que corresponde a  $3,24 \times 10^{-3} \text{ ml/g/min}$ . Em resposta a uma dieta 10 vezes mais rica em sal, rins sadios podem compensar totalmente esta diferença em três dias. Possuem grande capacidade de adaptação para concentração e eliminação de metabólitos (Borke et al, 1996; Guyton, 1990, 1996-c e 1996-d).

Somos água em 56% de nossa massa corporal na vida adulta. Seja dentro dos vasos ou no interstício, 30% deste valor encontram-se em constante fluxo no espaço extracelular (Borke et al, 1996; Way, 1994). As células são capazes de viver, crescer e desempenhar suas

funções na medida em que se mantenham suas concentrações de oxigênio, açúcar, diferentes íons, aminoácidos e outras substâncias do meio. É este fluxo de água, sais e nutrientes que mantém a vida.

Portanto, regulação renal e intestinal de sal e água é crítica para a manutenção da vida. Hormônios, neurotransmissores e fatores de controle local têm sido implicados na regulação da homeostase de sal e água. Direta ou indiretamente todos os mediadores implicados neste processo interferem no transporte epitelial de eletrólitos.

## ***2.2. Primeiro fator natriurético: ANP***

### **2.2.1. Considerações gerais**

Algumas células musculares específicas do átrio cardíaco secretam no sangue um peptídeo capaz de aumentar o ritmo de filtração glomerular e inibir a reabsorção tubular de sódio e água nos rins.(de Bold, 1992). Sendo constituído por uma seqüência de 28 aminoácidos, este peptídeo natriurético atrial (ANP, do inglês atrial natriuretic peptide) age especialmente nos túbulos distais e coletores do rim (Flynn et al, 1983). De modo geral, o ANP aumenta as perdas renais de sódio e água, reduzindo o volume sangüíneo e concorrendo para manutenção dos níveis normais da pressão arterial (Guyton, 1996-e).

A distensão das paredes atriais produz a liberação do ANP pelo átrio cardíaco. Em estados de insuficiência cardíaca, ocorre excessiva distensão das paredes de ambos os átrios, o que justifica, nestes casos, a elevação dos níveis de ANP circulante em até 10 vezes. Há ainda conseqüente aumento nas perdas renais de sal e água, o que previne sintomas extremos na insuficiência cardíaca congestiva pela redução do volume de fluidos circulante (Globits et al, 1998; Guyton, 1996-d).

As alterações dos níveis de ANP ajudam a minimizar alterações do volume de sangue circulante em estados de sobrecarga de sal e água. Por outro lado, alguns pesquisadores têm observado que estes efeitos renais do ANP são dependentes ou apresentam estreita correlação com valores de pressão arterial superior ou igual aos normais. Esta natriurese dependente de pressão ou pressão natriurética explica o fato de infusões de ANP, mesmo em grandes

quantidades, não aumentarem a natriurese ou a diurese quando há redução dos níveis da pressão arterial (Kida et al,1986; Guyton, 1996-e).

Mais adiante abordaremos aspectos relativos aos receptores e mecanismo de ação do ANP.

### **2.2.2. Descoberta e estrutura**

Algumas células da musculatura atrial de mamíferos apresentam grânulos que morfológicamente se assemelham àqueles encontrados em células produtoras de hormônios polipeptídeos. O número destes grânulos pode ser alterado em função de variações experimentais do balanço hidro-eletrolítico de animais. Através de um procedimento de fracionamento de tecidos, de Bold (de Bold, 1982) isolou e purificou grânulos presentes em átrio de ratos. Em subfrações destes grânulos, ele encontrou relativamente grande quantidade de ANP purificado. Estes grânulos seriam reservatórios para o ANP.

A estrutura primária H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-(Arg)-Tyr foi descoberta por de Bold e Flynn (Flynn et al, 1983). Esta seqüência de aminoácidos apresenta efeitos semelhantes àqueles descritos para o ANP (cardionatrin I) como aumento da diurese e natriurese. Em sua estrutura secundária, o ANP apresenta duas pontes dissulfídicas as quais conferem resistência ao método de extração ácida empregado para seu isolamento e descoberta.

Provavelmente derivado de um precursor comum (atriopetinogênio), outros peptídeos natriuréticos semelhantes foram também isolados no átrio cardíaco de mamíferos. As atriopetinas I, II e III são compostas por 21, 23 e 24 aminoácidos respectivamente. Johnson (Johnson, 1986) observou que, em doses variando de 0.33 a 3.0 microgramas, não havia qualquer diferença significativa entre as atividades natriuréticas e diuréticas destes peptídeos no tocante às curvas dose e tempo-efeitos. Desta forma, foi sugerido ainda que “in vivo” a carência dos três peptídeos C-terminais Phe-Arg-Tyr da atriopetina I (21 aminoácidos) não é prescindível para a completa expressão dos efeitos natriuréticos, embora outros autores estabelecessem-na com menor grau de potência.

### **2.3. Proteína G – do GTP ao AMPc**

A maioria dos mensageiros extracelulares não entra na célula alvo para exercer seus efeitos. Eles quase sempre apresentam afinidade por alguma região da membrana citoplasmática (o receptor) a qual traduz sua mensagem em segundos mensageiros e, em alguns casos, até terceiros mensageiros, sendo que aquele difunde-se em todo citoplasma e este está quase sempre confinado ao núcleo da célula. Este processo é chamado de transdução de sinal. Boa parte de mensageiros extracelulares se ligam a uma classe de receptores presentes na membrana celular chamados de proteínas G (Neer & Clapham, 1988; Kaziro et al, 1991; Taylor, 1990; Katzung, 1994; Hardman et al, 1996).

Seu nome advém da capacidade de se ligarem aos nucleotídeos de guanina. Como todos os nucleotídeos, consiste de uma base orgânica (guanina), um açúcar e um ou mais fosfatos. Gilman (1987 e 1989) identificou as proteínas G como um dos medidores cruciais na transdução de sinal (Gilman, 1995). Uma vez descoberta, a pesquisa sobre proteína G admitiu-lhe papel central no mecanismo de ação de diversas atividades celulares como visão, olfato, atividade hormonal e contração muscular entre outras. Linder e Gilman (Linder & Gilman, 1992; Gilman, 1995) realizaram recente revisão com abordagem histórico-científica destes fatos.

#### **2.3.1. Os primeiros indícios foram entrelaçados ao AMP**

Até a década de 50, as vias de sinalização intracelular eram praticamente desconhecidas. “Os efeitos dos hormônios somente seriam observados em células intactas” - era uma crença dogmática. Por outro lado, havia também quem acreditasse que: “À compreensão de todo o sistema era imprescindível a compreensão de suas partes” (Ross & Gilman, 1980; Ross et al, 1978; Linder & Gilman, 1992).

Quando aplicada em fragmentos celulares, epinefrina induzia alguma enzima a converter o trifosfato de adenosina (ATP) em uma substância até então desconhecida: o monofosfato de adenosina (AMP). Àquela nova enzima chamaram de adenil ciclase, hoje adenilil ciclase. Sutherland acreditava que o receptor para a epinefrina e a adenilil ciclase

fossem a mesma molécula. No início dos anos 70, ficou claro que ambos são entidades separadas (Linder & Gilman, 1992).

Lutz Birnbaumer e col, no National Institutes of Health Martin Rodbell, estudaram o efeito do glucagon no mesmo modelo experimental. Observaram que além do glucagon e seu receptor, o trifosfato de guanosina (GTP) era necessário para a ativação da adenilil ciclase. Danny Cassel e Zvi Selinger, na Universidade Hebraica, observaram que epinefrina estimulava a adenilil ciclase e, além disso, convertia o GTP em difosfato de guanosina (GDP) pela adição de uma molécula de água em reação catalizada pela GTPase (Sternweis et al, 1981-a e 1981-b; Ross, 1981; Northup et al, 1980; Ross & Gilman, 1980; Ross et al, 1978; Linder & Gilman, 1992).

Estes dois momentos são os primeiros indícios da participação de nucleotídeos de guanina na transdução do sinal da epinefrina.

### **2.3.2. Descoberta da proteína G**

E mais uma vez “à compreensão de todo o sistema era imprescindível o conhecimento de suas partes”. Em meados da década de 70, Gilman e Ross debruçavam-se sobre o quebra-cabeça que eram as relações entre GTP, receptores da epinefrina e adenilil ciclase. Acreditavam que, por combinação sistemática na adição de proteínas isoladas a uma membrana artificial, encontrariam as partes mínimas necessárias à ativação da adenilil ciclase e compreensão do papel do GTP (Ross & Gilman, 1980; Ross et al, 1978; Linder & Gilman, 1992).

Como não se dispunha de tecnologia suficiente para separação dos componentes da membrana sem danificá-los, seria necessário encontrar uma forma de analisar proteínas sem a purificação completa do material. Tomando conhecimento de uma linhagem de células mutantes, que conserva os receptores para epinefrina, de alguma forma se tornara incapaz de ativar a adenilil ciclase. As células mutantes apresentariam “uma adenilil ciclase deficiente”. Quando as células são expostas ao extrato celular contendo adenilil ciclase, epinefrina mais ATP e GMP produzem AMP. Nada surpreendente até então. No experimento controle, assumindo-se que a adenilil ciclase estivesse degradada por ação do calor ou agentes

químicos, o extrato celular inexplicavelmente sensibilizou as células à produção de AMP por ação de epinefrina mais ATP e GMP. O fator limitante da produção de AMP naquelas células não seria “uma adenilil ciclase deficiente”, mas algum outro fator que fortuitamente não seria degradado junto com a adenilil ciclase. Em adição, descobriu-se que nas células existe adenilil ciclase viável, porém não ativada (Gilman /1987 e 1989).

A seguir, Ross e Gilman demonstraram que a substância ativadora da adenilil ciclase era dependente de GMP e, portanto, foi denominada de proteína-ligante de nucleotídeo de guanina – proteína G. A proteína G seria ligada ao GTP por intermédio do receptor da epinefrina. Uma vez ligada ao GTP, a proteína G estimularia a adenilil ciclase a converter ATP em AMP (Sternweis et al, 1981-a e 1981-b; Ross, 1981; Northup et al, 1980; Ross & Gilman, 1980; Ross et al, 1978; Linder & Gilman, 1992).

Paul C. Sternweis e John K. Northup isolaram a proteína G, estimuladora (Gs) de adenilil ciclase. Ainda na década de 80, Ross e Gilman adicionaram a uma bicamada de fosfolipídios os elementos mínimos necessários para a via de transdução do sinal da epinefrina, na produção de AMPc (Northup et al, 1980; Sternweis et al, 1981; Linder & Gilman /1992).

Outros pesquisadores descobriram diversos efeitos fisiológicos mediados pelas proteínas G, como descrevemos a seguir.



**Tabela 2-1: Descritiva de Efeitos Fisiológicos Mediados por Proteínas G**

<b>Estímulo</b>	<b>Célula Efetora</b>	<b>Proteína G</b>	<b>Efector</b>	<b>Efeito</b>
Epinefrina Glucagon	Hepatócitos	Gs	adenilil ciclase	Glicogenólise
Epinefrina Glucagon	Adipócitos	Gs	adenilil ciclase	Lipólise
LH	No folículo ovariano	Gs	adenilil ciclase	↑ síntese de estrógeno e progesterona
ADH	No rim	Gs	adenilil ciclase	conservação de H <sub>2</sub> O
Ach	Miocárdio	Gi	canais de K <sup>+</sup>	↓ cronotropismo ↓ inotropismo
Encefalinas Endorfinas Opióides	Neurônios do cérebro	Gi / Go	canais de Ca <sup>++</sup> e K <sup>+</sup> , adenilil ciclase	muda a atividade elétrica neuronal
Angiotensina	Músculo liso do vaso	Gq	fosfolipase C	contração muscular
Odorantes	Neuroepitélio do nariz	Golf	adenilil ciclase	deteção de odores
Luz	Cones e bastonetes	Gt	GMPC fosfodiesterase	deteção da luz
Ferormônio	Fermento	GPA1	desconhecido	células de descanso

Fonte: Modificado de Linder & Gilman, 1992.

### 2.3.3. Estrutura e mecanismo de ativação da proteína G

As proteínas G que participam da sinalização transmembrana estão alocadas na superfície interna da membrana citoplasmática. De forma geral, compõem-se de três subunidades distintas em ordem decrescente denominadas  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) e  $\gamma$  (gama). A subunidade alfa quase sempre é diferente entre as diversas proteínas G. Beta e gama são bastante conservadas mesmo em diferentes proteínas G. Num arranjo combinatório de cinco diferentes subunidades beta, 10 diferentes subunidades gama e várias subunidades alfa é possível que existam mais de 1.000 proteínas G diferentes (Neer & Clapham, 1988; Kaziro et al, 1991; Taylor, 1990; Linder & Gilman, 1992).

Em repouso, o complexo de três subunidades está ligado ao GDP. Mediante alteração conformacional do receptor em resposta ao acoplamento de um mensageiro extracelular, alfa libera o GDP e aceita um GTP tornando-se ativada. A seguir, alfa ( $G\alpha$ ) se dissocia de beta e gama e, permanecendo na face interna da membrana citoplasmática, difunde-se através da mesma. Enquanto hidrolisa o GTP a GDP, tempo estimado em segundos, alfa permanece ativada, podendo ligar-se a efetores como a adenilil ciclase. Enquanto ligada a  $G\alpha$ , a adenilil ciclase pode formar muitos AMPc o que se traduz como efeito amplificador da resposta (Neer & Clapham, 1988; Kaziro et al, 1991; Taylor, 1990; Katzung, 1994; Hardman et al, 1996; Linder & Gilman, 1992).

#### **2.4. Alvos da proteína G**

O papel das proteínas G na transdução do sinal para um segundo mensageiro intracelular foi discutido nos itens anteriores. A sua capacidade de amplificação do sinal é característica bem peculiar. Após uma única interação de curta duração (ms) da droga com o receptor, a Gs permanece ativada alguns segundos. Enquanto ativada, uma Gs pode induzir à formação de grande número de segundos mensageiros. Os sistemas de interferência da proteína G estão descritos e ordenados a seguir (Neer & Clapham, 1988; Kaziro et al, 1991; Taylor, 1990; Katzung, 1994; Hardman et al, 1996).

##### **2.4.1. Sistema adenilil ciclase (AMPc)**

O AMPc é sintetizado dentro da célula pela ação da adenilil ciclase sobre o ATP com a liberação de dois fosfatos. Sua inativação dá-se pela ação das fosfodiesterases as quais convertem-no em 5'-AMP. Muitas drogas, hormônios e neurotransmissores diferentes produzem os seus efeitos através do aumento ou da diminuição da atividade catalítica da adenilato-ciclase e, conseqüentemente, aumentando ou reduzindo a concentração do AMPc dentro da célula.

Os efeitos regulatórios do AMPc na função celular são muitos e variados. Incluem, por exemplo, enzimas envolvidas no metabolismo energético, divisão e diferenciação celulares, transporte de íons e função do canal iônico. Levam a mudanças na excitabilidade neuronal e

interferem com proteínas contráteis no músculo liso. Esses efeitos variados são, entretanto, todos originados de um mecanismo comum: a ativação das várias proteínas-quinases pelo AMPc. Essas enzimas catalizam a fosforilação dos resíduos da serina e treonina em proteínas celulares diferentes, usando ATP como fonte de grupos fosfato, regulando as funções das proteínas fosforiladas. Sabe-se que a produção aumentada de AMPc, em resposta à ativação do  $\beta$ -adrenorreceptor, afeta as várias enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio e da gordura no fígado, na gordura dos adipócitos e nas enzimas envolvidas na atividade das células musculares. O resultado é uma resposta coordenada na qual a energia armazenada na forma de glicogênio e gordura torna-se disponível como glicose para abastecer a contração muscular (Northup et al, 1983-a e 1983-b; Tasken,1997, Katzung ,1994; Hardman et al, 1996).

#### **2.4.2. Sistema da fosfolipase C / fosfato inositol / $Ca^{++}$**

O sistema do fosfoinositídeo, um importante sistema de mensageiro secundário intracelular, foi descoberto por Michell e Berridge, bioquímicos que trabalham independentemente no Reino Unido. Em 1975, Michell notou que muitos hormônios produzem aumento na concentração de cálcio intracelular livre, associado ao aumento na taxa de degradação de fosfolipídeos na membrana, o fosfatidil inositol (Busa, 1988; Lee, 1991; Laychock, 1989; Brown et al, 1985; Stevens, 1983; Katzung, 1994).

Descobriu-se que o fosfatidil inositol (Ptd Ins) pertencia a uma classe secundária de fosfolipídeos da membrana. Subseqüentemente foi verificado que Ptd Ins trata-se de uma família de fosfolipídeos cujo membro, o Ptd Ins (4,5)-P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>), tem grupos fosfatos ligados ao anel inositol. O PIP<sub>2</sub> é o substrato para uma enzima de membrana denominada fosfolipase C (PLC) a qual divide-o em diacilglicerol e inositol (1,4,5)-trifosfato (IP<sub>3</sub>). A PLC é ativada através de proteína C de modo similar ao que acontece para a adenilil-ciclase. A PLC também pode ser ativada diretamente por receptores do tipo tirosina-quinase cujo mecanismo dispensa qualquer envolvimento de proteína G (Busa, 1988; Lee, 1991; Laychock, 1989; Brown et al, 1985; Stevens, 1983; Katzung, 1994; Hardman at al, 1996).

O PIP<sub>2</sub>, sendo clivado em DAG e IP<sub>3</sub>, fornece dois importantes segundos mensageiros intracelulares. O IP<sub>3</sub> age eficazmente para liberar o cálcio de depósitos intracelulares. Depois da descoberta do IP<sub>3</sub> como principal mensageiro liberador de cálcio, vários outros fosfatos de inositol têm sido implicados neste papel fisiológico. Ao que parece, a membrana do retículo endoplasmático (responsável pelo seqüestro e armazenamento do cálcio citosólico) apresenta receptor para o IP<sub>3</sub>. Uma vez liberado dos reservatórios, o fluxo de cálcio para o interior da célula promove variação em sua concentração de 10 a 100 vezes (Busa, 1988; Lee, 1991; Laychock, 1989; Brown et al, 1985; Stevens, 1983; Guyton, 1996-f e 1996-g, Katzung, 1994; Hardman et al, 1996).

Um aumento na concentração de cálcio intracelular livre ocorre em muitos tipos de células em resposta a diversos agonistas. A amplitude de respostas celulares à concentração de cálcio intracelular é muito grande para ser discutida em detalhes. Cabe, no entanto, exemplificar alguns eventos tais como: contração do músculo liso, aumento na força de contração do músculo cardíaco; secreção glandular; liberação de neurotransmissores; liberação hormonal e até mesmo citotoxicidade (Busa, 1988; Lee, 1991; Laychock, 1989; Brown et al, 1985; Stevens, 1983).

A resposta ao PIP<sub>2</sub> envolve ainda outras vias afetadas diretamente pelo DAG (diacilglicerol). O DAG regula a atividade de uma proteína-quinase ligada à membrana, a proteína-quinase C (PKC). Desta forma, indiretamente, o PIP<sub>2</sub> controla a fosforilação de diversos resíduos de treonina e serina de proteínas intracelulares. O DAG, pela sua natureza lipofílica, permanece dissolvido na membrana plasmática. Desta forma, o DAG está mais susceptível a ligar-se ao seu sítio específico na molécula da PKC. Os ésteres de forbol, compostos altamente irritantes e indutores de tumor, são capazes de ativar as PKC. Problemas na modulação da atividade das PKCs se relacionam patologicamente com diversos tumores. Dentre os efeitos fisiológicos atribuídos às PKCs estão: liberação de hormônios de glândulas endócrinas; controle da liberação de neurotransmissores; controle da atividade de músculo liso; resposta inflamatória e “down-regulation” de receptores além de estimulação do transporte de íons em membranas e epitélios (Laychock, 1989; Brown et al, 1985; Stevens, 1983; Satoh et al, 1992; Ye et al, 1992).

## **2.5. *Receptores relacionados à guanilil ciclase (GC) e ao GMPc***

Apresentam-se como modelo de receptor de membrana diretamente ligado ao domínio catalítico intracelular. Devido ao conhecimento anterior de receptores com estrutura e mecanismo de funcionamento similares como aqueles com atividade tirosina-quinase, havia pouca descrição da estrutura e atividade destes receptores, até bem recentemente.

A guanilil ciclase, na forma particulada, é ligada à membrana citoplasmática com domínios intracelulares, domínio extracelular e região transmembranar. Existe ainda a guanilil ciclase solúvel no citoplasma que pode ser ativada pelo óxido nítrico. Cada uma das formas é codificada por genes diferentes. A guanilil ciclase particulada (na membrana plasmática) pode ser estimulada pela família dos peptídeos natriuréticos atriais, pela STa e, mais recentemente descoberto, pela família de peptídeos da guanilina. Os subtipos de receptores GC-A e GC-B são ativados pelo ANP, enquanto o GC-C é ativado pela STa e guanilinas (Drewett et al, 1994; Fasano, 1998).

## **2.6. *Estrutura do GC-C***

O receptor da STa caracteriza-se por ser uma proteína de 240 kDa (GC-C). Tendo sido identificado por clonagem molecular de cDNA's intestinais de ratos e humanos, o GC-C apresenta-se como o receptor de superfície celular para STa, guanilina e uroguanilina, nesta ordem de descoberta. Embora apresente semelhança estrutural com os receptores GC-A e GC-B já descritos e clonados para o ANP, nem STa apresenta afinidade pelos receptores do ANP, nem o ANP ativa os receptores para STa (Drewett et al, 1994; Currie et al, 1992; Forte & Currie, 1995).

GC-C intestinal de rato é composto por 1.053 aminoácidos mais 2 aminoácidos de sinalização. Seu maior domínio está localizado na região extracelular, sendo composto por 410 resíduos NH<sub>2</sub>-terminal. Uma única região do receptor imersa na membrana plasmática é composta de 21 aminoácidos hidrofóbicos. Existem dois domínios intracelulares. Na região COOH-terminal, está o domínio catalítico guanilil ciclase, trata-se de uma seqüência de aminoácidos muito bem conservada. Este domínio catalítico e a região hidrofóbica

transmembranar são similares aos GC-A e GC-B. A seqüência de aminoácidos, entre o domínio catalítico e a região transmembrana, apresenta homologia com proteínas kinases. Em adição, GC-C apresenta ~70 resíduos adicionais à região catalítica. Segundo Garbers (Garbers, 1990-a e 1990-b), esta seqüência é rica em glutamina e serina e parece estar envolvida com ancoragem de GC-C ao citoesqueleto (Schulz et al, 1990; Forte & Currie, 1995).

Dois receptores adicionais foram identificados através do cDNA de células eucarióticas, encontrados no intestino de porcos e homens. Pela identificação da seqüência, o GC-C de rato apresenta semelhança de 81 % com o humano, sendo que no domínio intracelular há 91 % de semelhança e o no domínio extracelular, região relacionada ao ligante, há semelhança de 71 %. O GC-C de porco apresenta semelhança de 87 % com o humano e 82 % de semelhança com o de rato (Wada, 1994; Singh et al, 1991; de Sauvage et al, 1991; Forte & Currie, 1995).

### **2.6.1. Modulação da atividade pelo ATP**

Enquanto GC-A e GC-B se ligam ao ATP na região kinase-símile, GC-C não depende de ATP e esta região tem sua função ainda por ser estabelecida. A deleção desta região nas GC-A e GC-B traduz-se em manutenção constitutivamente ativada das mesmas. ATP e nucleotídeos relacionados, embora prescindíveis, aumentam a atividade catalítica. Por outro lado, pelo menos o 2-cloroATP é capaz de inibir a atividade do GC-C (Hirayama et al, 1993; Vaandrager et al, 1993-a, 1993-b e 1994; Parkinson et al, 1994, Forte & Currie, 1995).

### **2.7. *Toxinas e transporte epitelial de água e eletrólitos***

Por alteração na concentração celular de segundos mensageiros, em processos fisiopatológicos intrigantes pela própria engenhosidade, algumas toxinas são capazes de induzir secreção de água e eletrólitos em epitélios intestinais e tubular renal independentemente do contato prévio do patógeno que

a produzira. Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o íon cálcio intracelular ( $\text{Ca}^{++}$ ) e o rearranjo do citoesqueleto celular são linguagens de comunicação entre patógenos e células do hospedeiro. Invariavelmente as toxinas interferem nas vias de metabolismo ou comunicação celulares do hospedeiro (Fasano, 1998).

### **2.7.1. Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc)**

A comunicação celular inicialmente descoberta foi a do AMPc, talvez por isso seja a melhor compreendida. Toxinas do cólera, da salmonela e termo-lábil da *E. coli* se valem do mesmo mecanismo de comunicação celular que o trifosfato de adenosina, secretina ou produtos da ciclooxigenase. Mais detalhadamente, podemos dizer que o melhor exemplo se verifica com a toxina do cólera (TC) que induz secreção de água e eletrólitos através do aumento na concentração celular de AMPc. A TC se fixa a resíduos terminais de galactose nos gangliosídeos  $\text{GM}_1$  de diversas células. A neuraminidase produzida pelo *Vibrio cholerae* é capaz de converter gangliosídeos de ordens superiores em  $\text{GM}_1$ , aumentando o número de receptores para a TC. Uma vez internalizada, a subunidade A1 promove a ribosilação por difosfato de adenosina da subunidade  $\alpha$  da proteína Gs (do inglês stimulatory) no resíduo de arginina. Este procedimento permite que a Gs se ligue à subunidade catalítica da adenilil ciclase, formando AMPc, ativando as proteínas quinases dependentes de AMPc às quais, por sua vez, fosforilam as proteínas de membranas responsáveis pelo transporte de íons transmembranar. O receptor transmembrana da fibrose cística (em inglês CFTR) é um canal de cloreto com potencial para fosforilação pela

proteína quinase A. O CFTR de pacientes com fibrose cística não responde a estímulos via AMPc ou  $Ca^{++}$ . Pacientes heterozigotos são potencialmente mais resistentes à diarreia induzida pela TC, sugerindo vantagem seletiva sobre indivíduos homozigotos normais (Watson & Sodeman, 1979; Riordan, 1993; Hope et al, 1994; Guyton, 1996-f e 1996-g; Fasano, 1998).

### **2.7.2. Íon cálcio intracelular ( $Ca^{++}$ )**

O cálcio intracelular é o mais importante íon na regulação de transporte de eletrólitos em epitélios. O cálcio intracelular livre no citosol varia na ordem de 100 nM. As variações transientes de cálcio não excedem de 5-10 vezes seu valor basal, sendo intimamente acompanhadas por mecanismos de controle, uma vez que valores elevados deste íon no meio intracelular pode ser letal para a célula. Os maiores depósitos de cálcio são o meio extracelular ou interstício, as mitocôndrias e o meio intracelular ou não mitocondrial. Algumas substâncias neurohumorais como acetilcolina, serotonina, substância P e bradicinina alteram a permeabilidade da membrana celular ao cálcio de um ou mais compartimentos reservatórios. (Guyton, 1996-f e 1996-g; Katzung, 1994; Hardman et al, 1996).

Alguns fármacos ligantes da proteína G ativam a fosfolipase C que libera o IP3 e o DAG. Estimulando a entrada de cálcio proveniente das mitocôndrias e do meio extracelular, o IP3 aumenta a concentração de cálcio intracelular, ao passo que o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) dependente de  $Ca^{++}$  (Laychock, 1989; Brown et al, 1985; Stevens, 1983; Satoh et al, 1992; Ye et al, 1992). O aumento do cálcio intracelular se correlaciona com inibição da absorção de sódio e cloreto, principalmente no epitélio intestinal. Embora, até o momento, não se tenha correlacionado a dependência de cálcio por alguma enterotoxina, a



hemolisina direta, termo estável do *Vibrio parahaemolyticus*, tem seu efeito mediado pelo cálcio (Katzung, 1994; Hardman et al, 1996; Fasano, 1998).

### **2.7.3. Rearranjo do citoesqueleto celular**

O citoesqueleto mantém a polaridade e a estrutura das células epiteliais. Do centro de cada microvilosidade, parte um feixe paralelo de microfilamentos projetados para o citoplasma e associados com um complexo de proteínas do citoesqueleto denominados teia/malha terminal que se atracam aos desmossomas. Invasão, colonização e modulação da permeabilidade intestinal são os principais impactos promovidos pelas bactérias. A *Yersinia* patogênica é um exemplo de bactéria que se adere à membrana através de integrinas do citoesqueleto celular (integrina  $\beta 1$  receptor), interferindo com sua função. O *Vibrio cholerae* produz uma toxina, denominada zot (zonula ocludens toxin), que interfere na polimerização de filamentos de actina, culminando seus efeitos em aumento da permeabilidade epitelial (Fasano, 1998).

### **2.7.4. Monofosfato cíclico de guanósina (GMPc)**

Há pelo menos duas décadas são conhecidos os efeitos da STa sobre o transporte epitelial de eletrólitos e água. Neste período, detalhou-se sua estrutura, interações com a atividade da guanilil ciclase e a concentração intracelular de GMPc (Knoop & Owens, 1992; Schulz et al, 1990). Seus efeitos estão bem documentados inclusive em tecidos (epitélios) cuja exposição à toxina ocorrera apenas de forma experimental - supra-renais, testículos, fígado e rim (Forte et al, 1988 e 1989; Lima et al, 1992).

*E. coli* enterotoxigênica produz uma família de toxinas termo-estáveis (ST; em inglês thermo-stable) que estimulam a guanilil ciclase e aumenta o monofosfato cíclico de guanósina, (GMPc) o que também produz secreção de

cloreto em epitélios tubulares renais e intestinais (Field et al, 1978; Lima et al, 1992; Forte et al, 1993; Carpick & Gariepy, 1993). A afinidade (100 vezes menor que a TC tem para seu próprio receptor) da STa da *E. coli* por uma determinada região da membrana celular permitiu identificação do seu receptor como sendo o GC-C, receptor da membrana plasmática celular acoplado ao sistema da guanilil ciclase que, embora alcance maior densidade de expressão no intestino, está presente em todos os tecidos nos quais outrora se comprovava a atividade da toxina (Field et al, 1978; Lima & Fonteles, 1993; Forte et al, 1993; Carpick & Gariepy, 1993). A baixa afinidade da STa explica a rápida reversibilidade dos efeitos dela em relação à longa duração dos efeitos da TC.

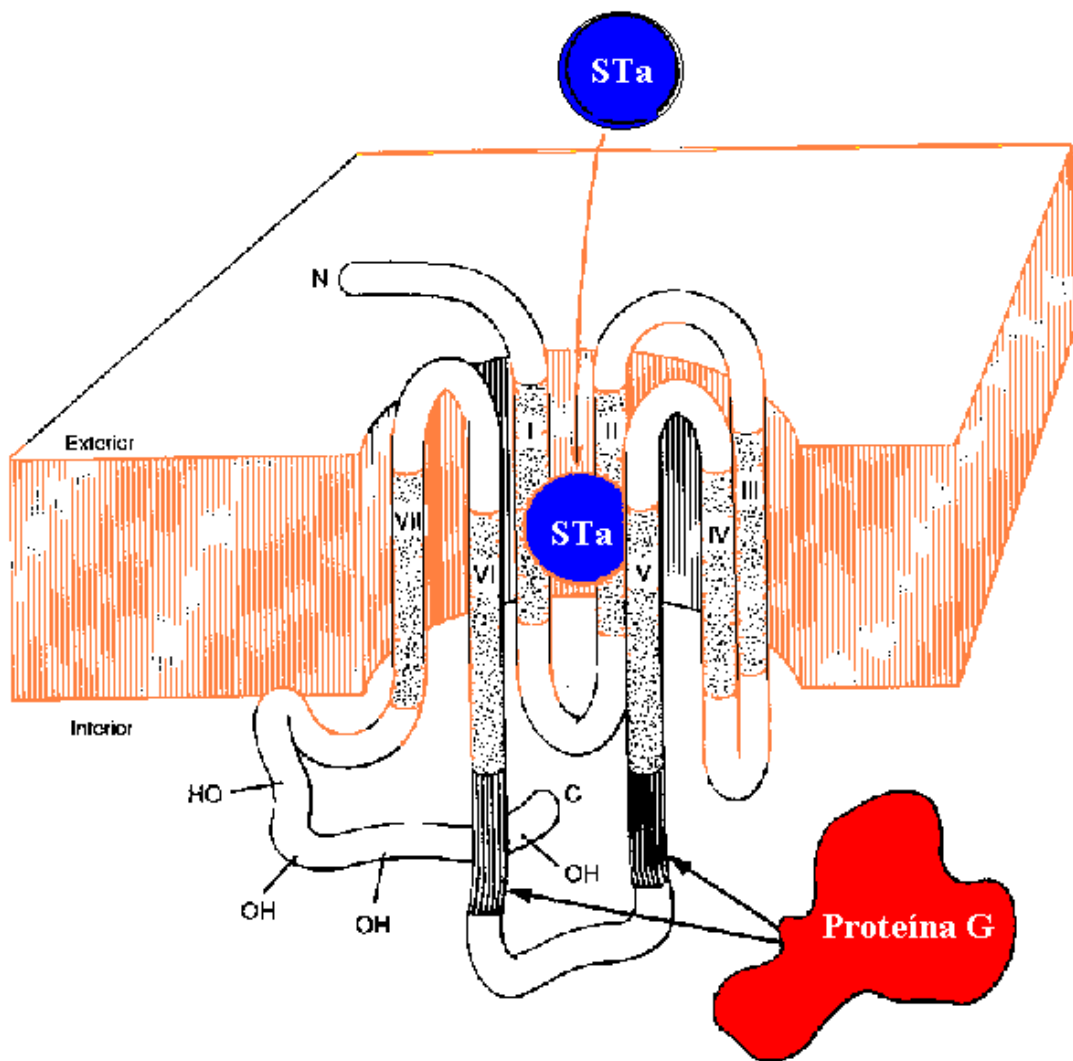


Figura 2-1 : STa estimula a guanilil ciclase e aumenta o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) produzindo secreção de cloreto em epitélios tubulares renais e intestinais (Fonte: Adaptado de Katzung, 1994-a).

STa apresenta seis resíduos de cisteína responsáveis pela formação de três pontes dissulfídicas imprescindíveis para seu papel biológico completo. Estas pontes de cisteína conferem extrema resistência da STa ao calor e à ação de peptidases (Carpick & Gariepy, 1993; Fasano, 1998).

Além da STa, foi também descoberta a EAST1, uma toxina produzida pela *E. coli* enteroagregativa, mais semelhante às guanilinas que a STa, capaz de se ligar ao GC-C, induzindo aumento do GMPc e de forma similar, apresentando apenas duas pontes dissulfídicas entre Cis-7, Cis-10, Cis-15 e Cis-18. A EAST1 existe codificada também em *E. coli* enteropatogênica e enterohemorrágica. EAST1 pode ser codificada por plasmídio, porém somente na *E. coli* enterohemorrágica ela está 100% codificada no cromossoma (Fasano, 1998).

## ***2.8. Indagação dos efeitos renais da STa***

Estudando o metabolismo renal, já em 1989, Fonteles realizou suas primeiras indagações sobre efeitos da toxina do cólera no rim perfundido. Mediante o fornecimento de 0,5 mg de toxina do cólera por Richard Guerrant, o Laboratório de Fisiologia Renal e Metabólica produziu seus primeiros resultados acerca dos novos efeitos do potente peptídeo no AMP cíclico renal. Nesta mesma linha de pesquisa, foram observadas importantes ações renais da toxina termoestável da *Escherichia coli*. Sugestivamente intrigantes, as primeiras observações valeram comunicação nacional no Congresso Brasileiro de Fisiologia (Fonteles & Lima, 1982). Os ensaios experimentais haviam sido realizados com toxinas oriundas de preparações quase artesanais, inviabilizando a publicação em revistas de circulação internacional, às quais exigiam material puro. Não obstante, estes dados, em adição aos obtidos com a toxina do cólera,

compuseram a tese de mestrado de Lima A.A.M. no modelo de perfusão de rins isolados.

Uma vez disponíveis as preparações comerciais puras da toxina termoestável da *Escherichia coli* (STa), os resultados experimentais de uma década atrás foram corroborados por novos experimentos. Em comunicação ao *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Fonteles e colaboradores publicaram os primeiros efeitos renais da STa no rim perfundido do rato (Lima et al, 1992). Em 1991, o mesmo grupo de pesquisadores sugeriu um mediador renal endógeno para os efeitos da STa (Congresso Mundial de Cólera e Doenças a ela relacionadas) (Fonteles, 1991). Esta observação tornou-se mais plausível ainda após a publicação por Lima na revista *Pharmacology and Toxicology*, os efeitos da perfusão renal isolada de STa e um análogo sintético de seu mediador o GMPc (Lima et al, 1992). Por outro lado, em 1989, face aos resultados experimentais obtidos, Forte e col, na Universidade de Missouri, constataram a presença de receptores para STa em rins de mamíferos (opossum, o cassaco norte americano *Didelphis virginiana*). Até então os únicos sítios conhecidos para ação dessa toxina encontravam-se localizados no intestino de diversos mamíferos (Forte et al, 1988 e 1989).

Não havia mais dúvida. Existia pelo menos um ligante endógeno para os receptores da STa. Deu-se início, em diversos laboratórios do mundo, a busca deste ligante. Uma substância endógena, relacionada à absorção intestinal e à conservação renal de água e eletrólitos, capaz de reconhecer receptores em ambos os órgãos e que seria dotada de imensa repercussão fisiológica.

## **2.9. Descoberta do FNS**

### **2.9.1. Considerações Gerais**

Os estudos com rim isolado têm tido papel importante no estudo da fisiologia e metabolismo renais. Permite-nos avaliar os parâmetros de função renal sem a interferência de hormônios, substratos metabólicos, drogas ou estímulos neurais extrínsecos ao órgão. Muitos pesquisadores têm desenvolvido e empregado técnicas de perfusão renal cada vez mais eficientes (Bowman, 1970; Bowman & Maack, 1974; Martinez-Maldonado & Opava-Stitzer, 1978, Fonteles & Lima, 1982; Fonteles et al, 1983) Desta forma, em 1989, Fonteles e col. Revelaram, pela primeira vez, que o rim hipóxico do coelho gerava um fator natriurético (Fonteles et al, 1989 e 1990). Até então somente o ANP era reconhecido como fator natriurético e tinha sua localização exclusiva para átrios de mamíferos. Como o fator natriurético descrito por Fonteles compartilhava efeitos semelhantes aos do ANP, foi sugerido que o novo material seria ANF ou ANP símile. Esta denominação foi questionada por vários pesquisadores deste campo de estudo, pelo fato da não detecção de RNA mensageiro em tecidos renais. Trabalhos posteriores de imuno-histoquímica vieram corroborar esta denominação, principalmente depois que Drummer (Drummer et al, 1991), Valentin e Humphreys (Valentin & Humphreys, 1993; Valentin et al, 1993) sugeriram que a urodilatina, uma forma molecular mais longa do ANP, deveria ser um fator parácrino renal, provavelmente responsável pelos efeitos natriuréticos potentes do ANP. McKenzie (McKenzie et al, 1985) detectou, por imunohistoquímica, sítios renais contendo ANP, presentes também na medula suprarrenal, pituitária e atrium do rato.

### **2.9.2. Isolamento Parcial e Caracterização de Atividade**

Em 1993, Fonteles conseguiu, através de radioimunoensaio, HPLC com coluna sep-pa e filtração em Cefadex gel G25, isolar parcialmente e caracterizar o FNS. O FNS bruto mostrou-se capaz de gerar GMP em células T84 de carcinoma de cólon humano, efeito não compartilhado pelo ANP. Enquanto ANP mostra-se resistente ao calor (100°C por 05

minutos) e ao baixo pH, FNS perde seus efeitos biológicos sob estas condições. Assim como o ANP, FNS é capaz de relaxar anéis de aorta com endotélio preservado e pré-contraídos com norepinefrina. Duas frações de pesos moleculares distintos apresentaram os mais importantes achados, os quais, foram publicadas em 1993 (Fonteles et al, 1993).

### ***2.10. Descoberta da guanilina***

Entre o entendimento do mecanismo de ação da STa (Field et al, 1978) e a descoberta da guanilina (Currie et al, 1992), consumiram-se mais de uma década de pesquisas. O receptor da STa estava presente em vários tecidos nunca antes exposto à toxina. Muito antes de esclarecer, esta descoberta suscitaria novas dúvidas. Como pode uma toxina bacteriana possuir receptores em tecidos de mamíferos? À qual ligante endógeno pertenceria este receptor?

A STa apresentava potente interferência no controle epitelial de água e eletrólitos. Descobriu-se que o receptor intestinal da STa seria uma isoforma da guanilil ciclase, presente na membrana plasmática, denominada GC-C (do inglês guanylyl ciclase C; Schultz, 1990). A expressão máxima deste receptor dava-se no intestino, seguindo-se pelos rins. Assim como o hormônio natriurético atrial interagiria com os receptores GC-A e GC-B, um ligante endógeno em questão deveria corresponder ao receptor GC-C. Existiria algum novo sistema endócrino, parácrino ou autócrino relacionado com o controle de água e eletrólitos?

Inicialmente propuseram-se células com cDNA de GC-C, transferido como modelo de investigação na busca deste ligante endógeno. Extratos de

tecidos eram adicionados às preparações para, em seguida, mensurar-se a produção de GMPc. Estas preparações mostraram-se pouco sensíveis à STa, bem como apresentavam resposta máxima modesta. O modelo ideal deveria apresentar alta sensibilidade, especificidade e amplitude de variação de resposta biológica. Currie observou que as células T84 de carcinoma de cólon humano prestavam-se bem a este propósito. O ensaio detectava 10 pM de STa, aumentava até 30 000 vezes a concentração de GMPc na presença de STa e era dotada de elevada especificidade para agonistas STa-símiles (Currie et al, 1992).

Foi realizada uma triagem em extrato de tecidos de ratos. Os rins e os intestinos mostraram-se os mais fortes candidatos. Ambos os tecidos apresentaram um material ácido-lábil que, após clivado, intensificava sua atividade geradora de GMPc. Nas células de jejuno do intestino delgado, Currie (Currie et al, 1992) descobriu um peptídeo endógeno ligante da GC-C, apresentando alto grau de semelhança estrutural com a STa. Tais características eram imprescindíveis ao ligante endógeno da STa. Em seguida, este peptídeo foi denominado guanilina. Após ser submetido à degradação sequencial de Edman e à espectrometria de massa, era conclusivo que a guanilina compunha-se de 15 aminoácidos, parte integrante da seqüência N-terminal de um pré-pró-peptídeo muito maior. Estas observações puderam ser confirmadas, após a clonagem, do cDNA responsável pelo peptídeo precursor da guanilina (Wiegand et al, 1992-a e 1992-b).

Em árdua, engenhosa e intensa pesquisa científica, Currie identificou a guanilina como único peptídeo capaz de preencher os requisitos supracitados. Ficou evidente que as ST's mimetizavam os efeitos de um peptídeo endógeno para causar diarreia.

### ***2.11. Estrutura da guanilina (e STa)***

O peptídeo é composto de 15 aminoácidos e tem a seguinte seqüência: PNTCEICAYAACTGC. A análise de sua composição demonstra alto grau de homologia com a STa (Currie et al, 1992). Dentre os 15 aminoácidos da guanilina, existem quatro resíduos de



cisteína componentes de duas pontes de dissulfetos, resultados da clivagem ácido-mediada de 115 aminoácidos do peptídeo precursor (Schulz et al, 1992; Wiegand et al, 1992-a e 1992-b; de Sauvage et al, 1992). Por sua vez, a natureza peptídica da STa traduz-se na seqüência de 19 aminoácidos com seis resíduos de cisteína, responsáveis por três pontes de dissulfetos. As pontes dissulfídicas da guanilina encontram-se em posição homóloga às presentes na STa. Ambos os peptídeos devem ser totalmente oxidados para implementarem completa ação biológica. A formação das pontes dissulfídicas é outro fator imprescindível para suas características biológicas, principalmente no tocante à resistência ao calor e à ação de proteases. Uma vez submetida à oxidação aérea, a estrutura quaternária da guanilina pode apresentar-se conformacionalmente de três formas. Estas formas são conseqüentes aos possíveis arranjos das pontes dissulfídicas. A estrutura de formação mais freqüente (90%) apresenta pontes dissulfídicas entre as cisteínas presentes nas posições 4 e 15 e 7 e 12. O arranjo de pontes dissulfídicas entre as posições 4 e 7 e 12 e 15 é o de menor freqüência (Schulz et al, 1992; Wiegand et al, 1992-a e 1992-b; de Sauvage et al, 1992; Garcia et al, 1993).

### **2.11.1. Ilustração esquemática da estrutura da guanilina (e STa)**

O esquema de cores da figura 2-2 corresponde aos possíveis arranjos de combinação para formações de pontes dissulfídicas entre as posições 04-07-12 e 15.

01-02-03-04-05-06-07-08-09-10-11-12-13-14-15

Pro-Asn-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys\*

Pro-Asn-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

Pro-Asn-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

**Figura 2-2: Seqüência linear dos 15 aminoácidos da região N-terminal da guanilina. \* Arranjo gerado em 90 % das vezes quando sob oxidação atmosférica espontânea.**

A seguir, na figura 2-3 está a ilustração comparativa entre a seqüência linear de aminoácidos da região N-terminal da guanilina humana, da guanilina de rato, da guanilina de gambá e a da STa. O esquema de cores corresponde aos arranjos de combinação para formações de pontes dissulfídicas (duas para guanilinas e três para STa). Os aminoácidos que ocupam posições semelhantes nos peptídeos estão sublinhados.

*Guanilina de rato (101-115 de 115)*

Pro-Asn-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

*E coli STa (57-72 de 72)*

Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr

*Gambá*

Ser-His-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Phe-Ala-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys

*Humano*

Pro-Gly-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

**Figura 2-3: Sequência linear de aminoácidos da região N-terminal da guanilina humana, da guanilina de rato, da guanilina de gambá e a da STa**

### ***2.12. Presença da guanilina em órgãos e tecidos***

Inicialmente isolado no jejuno do rato em 1992, na Companhia Monsanto, nos Estados Unidos, pelo grupo de Mark Currie, o peptídeo guanilina também foi encontrado em outros tecidos de mamíferos. Krause e colaboradores. (Krause et al, 1995) avaliaram a distribuição de receptores para a toxina termoestável da *E. coli* (STa) e guanilina em patos e perus. Sinais da presença destes receptores foram observados ao longo de todo intestino dessas aves, porém as maiores densidades de receptores para 125I de STa e guanilina foram detectadas no intestino delgado, seguidas de partes distais como o cólon. Guanilina humana foi detectada por Wiegand, em 1992, no íleo e no cólon, a partir da expressão de RNA mensageiro nestes segmentos intestinais. Estudos posteriores demonstraram grande expressão de RNA mensageiro da guanilina no cólon de rato (Wiegand et al, 1992-a e 1992-b), enquanto que, no esôfago e estômago, os sinais da presença de guanilina eram praticamente indetectáveis. Curiosamente, guanilina pode apresentar respostas em estruturas onde não é fabricada, embora no rato Schultz (Schultz et al, 1992) tenha detectado sua presença na glândula suprarrenal, rins, útero e trompas da rata.

No sangue, foi descrita a guanilina em uma forma circulante de 10.3KDa de peso molecular correspondente a pró-guanilina humana (Kuhn et al, 1993). Kuhn e colaboradores (Kuhn et al, 1994) propuseram um método de radioimunoensaio para essa forma circulante sanguínea de guanilina. Mediante este ensaio observou-se que pacientes sadios apresentavam as concentrações desta forma imunoreativa em  $42 \pm 3$  fmol/ml. No outro grupo de pacientes, com insuficiência renal crônica, as concentrações aumentaram para  $1074 \pm 24$  fmol/ml. Em pacientes portadores de diarreia secretória, produzidas por doença de Crohn e colite ulcerativa, os níveis do peptídeo apresentaram-se em  $44 \pm 3$  fmol/ml, semelhantes portanto aos indivíduos normais. A partir desta primeira demonstração de alterações patológicas dos níveis de guanilina, sugeriu-se que os rins regulassem o metabolismo e/ou a filtração da guanilina.

Guanilina é de presença marcante no trato gastrointestinal de mamíferos. Sua expressão sugeria efeito parácrino e/ou autócrino (Guba et al, 1996). Qual o papel de sua forma circulante? Como explicar a flutuação de seus níveis plasmáticos em indivíduos com metabolismo renal diminuído? Não existiria algum eixo endócrino entero-renal?

### **2.13. Expressão de RNAm do GC-C e tecidos sensíveis à STa**

#### **2.13.1. Fígado e trato biliar**

Receptores marcados por ST-I<sup>125</sup> foram encontrados em hepatócitos e células do revestimento do trato biliar de gambá. STa é capaz de estimular a guanilil ciclase hepática a produzir GMPC. Recentemente, foi demonstrando que o RNAm do GC-C está expresso no fígado desde o período fetal do desenvolvimento, bem como está no período neonatal de ratos. Estes mesmos tecidos foram marcados por ST-I<sup>125</sup>. Após o nascimento, os níveis de RNAm do GC-C e os sítios marcados por ST-I<sup>125</sup> decaem para níveis quase indetectáveis em 4 semanas de vida do rato. Entretanto, hepatectomia parcial, tratamento com tetracloreto de carbono ou administração de turpentina induzem ao aumento na expressão de RNAm e sítios de ligação do GC-C pelos hepatócitos (Krause et al, 1990; Laney-Jr et al, 1994).

#### **2.13.2. Sistema reprodutor**

Receptores marcados por ST-I<sup>125</sup> foram observados em células de revestimento de túbulos seminíferos dos testículos de gambá. Em experimentos *in vitro*, estes órgãos incrementam níveis de GMPC quando expostos à STa. Como já mencionamos, o RNAm da guanilina foi encontrado no trato genital feminino, sugerindo potencial importância em fertilidade (Forte et al, 1989; Laney-Jr et al, 1994; Schultz et al, 1992).

### **2.13.3. Trato respiratório**

Sítios marcados por ST-I<sup>125</sup> foram autoradiografados nas células do revestimento epitelial e da submucosa de glândulas da traquéia. O RNAm do GC-C foi detectado em células do epitélio de revestimento do trato respiratório humano e bovino. Nesta última espécie, os níveis de detecção foram relativamente altos (Schultz et al, 1992; Krause et al, 1990).

### **2.13.4. Pâncreas**

Tanto o RNAm do GC-C quanto o aumento na produção de GMPc sensível a STa foram observados em ácidos isolados do pâncreas exócrino. O insulinoma de ratos é capaz de acumular elevados níveis de GMPc em resposta à exposição a STa, sugerindo que o pâncreas endócrino também apresenta GC-C. Há GC-C's relacionados com as funções endócrina e exócrina do pâncreas (Forte & Currie, 1995).

## ***2.14. Efeitos biológicos da guanilina (e STa)***

A Guanilina e a STa guardam íntimas similaridades estrutural e funcional. Na verdade, em culturas de células T84, comprovou-se que guanilina e STa competem pelo mesmo sítio de ligação e são agonistas totais, sendo que a guanilina mostrou-se 10 vezes menos potente. Em 1993, Forte (Forte et al 1993) demonstrou que guanilina era um potente estimulante da secreção de cloreto em culturas de células T84, uma forma de câncer do cólon humano. Este modelo, altamente sensível à estimulação de secreção de GMP cíclico pela enterotoxina Sta, tornou-se rotina para bioensaio de substâncias da guanilina símile.

Guanilina estimula fortemente a secreção duodenal de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de ratos (Guba et al, 1996) Observou-se que a guanilina induzia secreção de cloreto em mucosas histológicas de coelhos, montadas em câmaras de Üssing quando adicionadas ao lado mucoso ou seroso, porém com maior sensibilidade para o primeiro (Soares et al, 1994; Fonteles et al, 1996). O anticorpo de Forssmann (Cetin et al, 1994; Hess et al, 1995), para detecção de guanilina circulante, pôde ser utilizado também para estudo imunocitoquímico. Desta forma, o

mapeamento do intestino do cobaio associado às microscopias ótica e eletrônica revelou que a guanilina era encontrada exclusivamente em células enterocromafins. Isso permitiria que, uma vez liberado, o peptídeo exercesse efeitos nas bordas de escova dos enterócitos adjacentes e, desta forma, regulasse a secreção intestinal de fluidos pelas membranas mucosas.

Quanto à bioatividade da guanilina no intestino humano e nas células renais do opossum (cassaco) norte-americano, Forte observou, que em células T84, cultivadas em filtros cobertos com colágeno e montados em câmara de Ussing havia variação da secreção transepitelial de  $\text{Cl}^-$ . Demonstrou-se ainda a dependência para o transporte de  $\text{Cl}^-$  do transportador  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ , inibível pela bumetanida (Forte et al, 1993).

#### **2.14.1. Investigação renal da guanilina**

Trabalhando no grupo de Forte, Richard Greenberg clonou previamente um análogo lisil da guanilina. A Fonteles foi confiada a missão de investigar os efeitos renais deste análogo. Dado o elevado custo na produção do peptídeo, a quantidade de material, inicialmente disponível, foi insuficiente para a completa elucidação dos efeitos da lisil-guanilina no rim isolado e perfundido de rato. Fonteles observou que, sem repercussão vascular renal importante, lisil-guanilina apresentava efeito diurético e natriurético de modo compatível com as observações no epitélio intestinal e coerentes com os efeitos descritos para STa e análogos do GMPc pelo Dr. Lima, em preparações renais similares. Em adição, numa observação sem precedente, lisil-guanilina apresentava também efeito caliurético (Fonteles et al, 1996; Santos-Neto et al, 1994-a, 1994-b).

#### **2.15. Descoberta da uroguanilina**

Recentemente descobriu-se um nova seqüência de 16 aminoácidos com dois resíduos ácidos adicionais não encontrados na guanilina (Hamra et al, 1993). Este novo membro da família da guanilina, a uroguanilina, é um peptídeo endógeno, ácido estável com evidências na regulação parácrina de fluidos e eletrólitos em mamíferos semelhante à guanilina (Hess et al, 1995; Hill et al, 1995; Forte & Hamra, 1996). Fora originalmente isolada na urina de gambá e posteriormente na urina de humanos (Miyazato et al, 1996-a e 1996-b; Kita et al,

1994). Em ratos, também foi encontrado seu RNA mensageiro em tecidos extra-intestinais tais como rim, ureter e supra-renal (Fan et al, 1995). Considerando o papel fundamental desempenhado pelo rim, na conservação da homeostase hidroeletrolítica dos seres vivos, a uroguanilina teve seus efeitos renais investigados por Fonteles (Fonteles et al, 1998). No Laboratório de Farmacologia clínica e Metabolismo, caracterizou-se a atividade biológica da uroguanilina no rim isolado e perfundido de rato.

Este foi o segundo hormônio da classe das guanilinas a ser descoberto e capaz de estimular o receptor intestinal chamado GC-C, cujo principal agonista, inicialmente descrito, foi a toxina STa, já mencionada anteriormente. Baseado no fato de que extratos renais de rins de ratos aumentaram a produção de GMPc em células T84, Hamra (Hamra et al, 1993) iniciou a procura de outros mediadores guanilina-símile na urina e na mucosa intestinal do opossum (gambá) americano *Didelphis virginiana*. Os autores isolaram um peptídeo altamente ácido e que foi denominado uroguanilina, devido ao fato de ter sido encontrado inicialmente na urina. O peptídeo descoberto foi também sintetizado pelos autores. Sua potência sugerida é 10 vezes superior à guanilina, situando-se entretanto abaixo da STa. Desta forma, a uroguanilina teria potência intermediária entre guanilina e STa (Hamra et al, 1993).

Uma comparação da afinidade relativa por receptores intestinais no intestino de perus, utilizando imunohistoquímica, para STa, guanilina e uroguanilina, demonstrou claramente que STa tem a maior afinidade e que uroguanilina tem afinidade intermediária, enquanto guanilina tem a menor de todas (Krause et al, 1995).

### **2.15.1. Estrutura da uroguanilina**

O peptídeo contém 53% de identidade com os aminoácidos da guanilina. Neste mesmo trabalho os autores isolaram um segundo peptídeo da mucosa intestinal que tem 47% de identidade com a uroguanilina, é rico em alanina e tem 73% de homologia com a guanilina humana. A seqüência da uroguanilina é QEDCELCINVACTGC (Hamra et al, 1993).

Quase que de imediato, Kita (Kita et al, 1994) isolou da urina humana uma nova uroguanilina de composição aminoácida semelhante à primeira e à guanilina, diferindo em apenas poucas unidades; sua estrutura é NDDCELCUNVACTGCL.



Similarmente à guanilina, quando de seu isolamento por técnica de clonagem molecular do cDNA, a preprouroguanilina apresentou-se com 109 aminoácidos no precursor hormonal (Fan et al, 1996).

### **2.15.2. Ilustração esquemática da estrutura da uroguanilina**

Na figura 2-4 está ilustrado de forma comparativa a seqüência linear de aminoácidos da região N-terminal de uroguanilina e guanilina humanas e de gambá. O esquema de cores correspondem aos aminoácidos diferentes que ocupam posições semelhantes nos peptídeos. Os aminoácidos semelhantes e correspondentes estão sublinhados.

<i>Uroguanilina Opossum</i>
Gln-Glu-Asp- <u>Cys-Glu-Ile-Cys</u> -Ile-Asn-Val- <u>Ala-Cys</u> -Thr- <u>Gly-Cys</u>
Ser-His-Thr- <u>Cys-Glu-Ile-Cys</u> -Ala-Phe-Ala- <u>Ala-Cys</u> -Ala- <u>Gly-Cys</u>
<i>Guanilina de Opossum</i>
<i>Uroguanilina Humana</i>
Asn-Asp-Asp- <u>Cys-Glu-Ile-Cys</u> -Val-Asn-Val- <u>Ala-Cys-Thr-Gly-Cys</u> -Leu
Pro-Gly-Thr- <u>Cys-Glu-Ile-Cys</u> -Ala-Tyr-Ala- <u>Ala-Cys-Thr-Gly-Cys</u>
<i>Guanilina Humana</i>

**Figura 2-4 : Sequência linear de aminoácidos da região N-terminal de uroguanilina e guanilina humanas e de gambá**

### **2.15.3. Distribuição em órgãos e tecidos**

A detecção de mRNA foi verificada nos intestinos delgado e grosso (Hamra et al, 1996-a e 1996-b), bem como no átrio e ventrículo do gambá (Fan et al, 1996). Cabe salientar que o coração é geralmente dominado por grandes concentrações de ANP. Curiosamente o ANP tem afinidade pelas guanilato ciclase A e B (classes GC-A e GC-B respectivamente) da mesma família da GC-C. Tanto uroguanilina quanto prouroguanilina foram isolados do plasma do gambá (opossum).

Miyazato (Miyazato et al, 1996-a e 1996-b) verificou a expressão gênica de uroguanilina no trato alimentar (estômago, intestino delgado e cólon) e outros tecidos extra-intestinais como pulmões, pâncreas e rins. Esses dados apontam para a possível existência de um novo sistema para homeostase de água e eletrólitos e, por conseguinte, para um efeito mais universal para uroguanilina. Recentemente Whitaker (Whitaker et al, 1997-a e 1997-b) descreveu a clonagem do gen da uroguanilina do camundongo, sendo denominado pelos

autores de Cuca Ib. Esses pesquisadores demonstraram também que o gen está ligado ao da guanilina no cromossomo 4. Esses gens são estruturalmente semelhantes e são compostos de 2 exons.

Técnicas de hibridização *in situ* no camundongo demonstram também que o RNA mensageiro está localizado predominantemente nas vilosidades intestinais e na junção córtico-medular renal. Já o mRNA para guanilina está localizado nas criptas, enquanto localiza-se nas vilosidades intestinais do intestino delgado e no colón deste animal. Nenhum sinal foi detectado no rim desta espécie por esses autores (Whitaker et al, 1997-a e 1997-b), não querendo isso dizer que receptores funcionais não estejam presentes neste órgão.

### 3. JUSTIFICATIVA

Enquanto a maioria dos pesquisadores centraliza seus estudos no trato gastrointestinal, nosso interesse é a avaliação do efeito das guanilinas no rim. Acreditamos que a compreensão desses efeitos contribuirá de forma imprescindível para o bom entendimento da homeostase do sódio e da água e, provavelmente, da hipertensão. A caracterização da diurese, da caliurese e da natriurese, induzida pela família de peptídeos da guanilina, deve ser investigada sob aspectos das interações com proteases renais. Neste sentido avaliaremos inibidores de proteases como ferramentas farmacológicas e como drogas com potencialidades tóxica e/ou terapêutica. Assim sendo, o rim isolado e perfundido do rato oferece excelentes condições como modelo experimental.

A quimostatina é um potente inibidor de diversas proteases, incluindo quimotripsina, proteases de serina com ação quimotripsina-like, enzimas lisosômicas como as catepsinas B, H e L. Quimostatina ainda inibe fracamente a elastase de leucócitos humanos. Sabe-se que quimostatina é farmacologicamente eficiente em concentrações finais de 100-200 µg/mL (10-100 µM). Uma vez solubilizada, é bastante instável, pois o aldeído terminal é passível de oxidação. Está usualmente presente nos "cocktails" de inibidores de proteases para extratos de plantas (Feinstein et al, 1976). Em protocolos experimentais "in vitro", quimostatina, mostrou-se bastante eficaz em proteger a guanilina ao ataque de quimotripsina e tripsina (Greenberg et al, 1997; Hamra et al, 1996-a e 1996-b). Em comparação aos efeitos inibitórios inespecíficos da quimostatina utilizaremos o BTCl, um inibidor de protease da família de Bowman e Birk.

Por outro lado, o ANP, assim como seu análogo de origem renal – a urodilatina, é um peptídeo que ativa a guanilato-ciclase A (mesmas famílias de receptor e de segundo mensageiro intracelular das guanilinas). ANP e urodilatina provocam aumento da natriurese e diurese (Hirayama et al, 1993; Vaandrager et al, 1993-a, 1993-b e 1994; Parkinson et al, 1994, Forte & Currie, 1995). Logo, a verificação de sinergismos entre ANP/urodilata e guanilinas pode fornecer importantes informações acerca do mecanismo de ação renal das guanilinas.

#### **4. OBJETIVOS**

Verificar e comparar, com os dados disponíveis na literatura atual, os efeitos de baixas doses de guanilina e uroguanilina no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato;

Avaliar efeitos farmacológicos e o potencial nefrotóxico da quimostatina, na dose experimental ideal preconizada como inibidor de protease, no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato;

Verificar efeitos farmacológicos e o potencial nefrotóxico do BTCI (black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor), na dose equimolar à de quimostatina, no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato;

Verificar e comparar, com os dados disponíveis na literatura atual, efeitos de baixas doses do ANP e da urodilatina, no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato;

Verificar interferência da quimostatina, do BTCI, do ANP e da urodilatina no metabolismo e efeitos renais da guanilina, no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato.

## 5. MATERIAL E MÉTODO

Nossos primeiros trabalhos foram desenvolvidos com guanilina recombinante, fornecida pelo Laboratório de Análise e Estrutura Macromolecular da Universidade de Kentucky, representado por Leonard Forte. Foi importante a mediação do pesquisador John Crane (New York University, Buffalo) para concessão da lisil-guanilina clonada por Richard Greenberg.

### 5.1. *Descrição da técnica para síntese da lisil-guanilina*

Parte do que se segue já é passível de realização no Laboratório de Farmacologia Clínica e Metabolismo. Pela técnica de síntese dos peptídeos, um plasmídeo DNA foi isolado usando-se um procedimento de lise alcalina seguida de centrifugação em gradientes de CsCl, contendo brometo de etídium. Fragmentos de DNA foram isolados em gel de agarose, utilizando-se Gene Clean II (Bio 101, La Jolla, CA).

Os oligonucleotídeos utilizados nesta construção foram 5'AAA CCA AAC ACC TGC GAA ATC TGT GCC TAC GCT GCA TGT ACT GCA TGT TAG TA-3' E 5'GAT CTA CTA ACA TCC AGT ACA TGC AGC GTA GGC ACA GAT ITC GCA GGT GTT TGG TTT TGC A3'. Esses oligonucleotídeos foram sintetizados num aparelho da Applied Biosystems (Foster City, CA), do Laboratório de Análise e Estrutura Macromolecular da Universidade de Kentucky. As transformações foram operadas num aparelho do tipo Bio-Rad Pulser Electroporation, fabricado pelos Laboratórios Bio-Rad (Richmond, CA), de acordo com instruções do fabricante.

O sequenciamento do plasmídeo foi realizado através do método didesoxido de terminação da cadeia usando [35S]dATP (1200 Ci mMol; New England Nuclear, Boston, MA), com um Sequenase (2.0) na forma de Kit de sequenciamento (United States Biochemical, Cleveland OH). O primer usado para sequenciamento do plasmídeo/pJAL foi o 5' AGT ACG CAA GTT CAC GTA-3'; o terminal 3' estava localizado em 99 bases 5' no locus de clonagem Nsil no pJAL 36 de comunicação pessoal de D. Henner, a seguir identificado.

O plasmídio codificando a guanilina do rato foi construído usando o vetor de secreção pJAL 36, gentilmente cedido por D. Henner, Genetech, South San Francisco, CA), no qual um promotor do tipo da fosfatase alcalina dirige a fusão da expressão de fusão gênica à seqüência do sinal STII. O plasmídio pJAL 36 (5.3 Kb) é um derivado do pBR 322, contendo a mesma fosfatase alcalina STII e sequenciador do sinal, como previamente descrito para o plasmídio pKSTa-1. Entre o locus Nsil e o Bam HI, presente no gene tet A, foram inseridos os oligonucleotídios complementares, codificando a guanilina de rato com a adição de lisina no terminal 5'. Isso resultou na produção do plasmídio, pKG. A forma secretada do peptídeo, como esperado, apresentou a seguinte estrutura: P-N-T-C-E-I-C-A-Y-A-A-C-T-G-C. A análise por restrição de endonuclease e sequenciamento de DNA confirmou a estrutura esperada (Currie et al, 1992).

### ***5.2. Cepa Utilizada e Meio de Cultura***

*Escherichia coli* K-12 DPB 372 foi usada para as transformações e produção da lisil-guanilina (Biek & Cohen, 1986). As células cresceram em meio rico em Lurrie-Broth (LB), suplementado com ampicilina (50 mg/ml). O meio contendo baixo fosfato era composto de 120 mM de trietanolamina na forma de hidrocloreto a pH 7.4, 1.6 mM de Mg SO<sub>4</sub>, 20mM de NH<sub>4</sub>.Cl, 20mM NaCl, 0.15% de glicose, 0,22 de hidrolisato de caseína, 0.03% de extrato de levedura e 50 µg/ml de ampicilina (Currie et al, 1992).

### ***5.3. Purificação da Guanilina Recombinante***

*Escherichia coli* da cepa K12 contendo pKG foi primeiramente crescida em 5ml de meio LB, enriquecido e suplementado com ampicilina, a 37°C, por 18 horas, numa mesma plataforma misturadora (250 rotações por minuto). A seguir, as células foram inoculadas em 1 litro do meio contendo baixa concentração de fosfato e incubados em banho-maria em agitação contínua por 18 horas. Cada litro foi centrifugado a 10000g por 20 minutos e o sobrenadante aplicado em colunas C18 SEP-PAK (Waters, Milford MA). As colunas foram lavadas previamente com 0.05 de ácido trifluoracético (TFA). A fração contendo guanilina foi

eluída com 60% de acetonitrilo e 0.025 TFA e aplicada em coluna de fase reversa do tipo C18 de HPLC, resultando num único pico bioativo (Currie et al, 1992).

As frações com atividade foram ensaiadas em camundongos recém-nascidos, para testar sua capacidade de provocarem diarreia nestes animais quando aplicadas por via intragástrica. A fração mais ativa era recromatografada em HPLC, usando-se a mesma coluna, as estruturas e a pureza do peptídeo foram então determinadas por análise de aminoácidos e espectrometria de massa. Este material purificado foi então usado nas perfusões renais.

#### **5.4. Síntese de Guanilina e Uroguanilina**

A síntese de guanilina do rato (101-115) e uroguanilina do opossum (cassaco) foi realizada pelo método de fase sólida e purificada de acordo com Currie (Currie et al, 1992) e Hamra (Hamra et al, 1993). Utilizou-se um sintetizador peptídico fabricado pela Applied Biosystems 431A. A purificação dos peptídeos foi realizada por HPLC em colunas de fase reversa e as estruturas confirmadas por espectroscopia e análise de seqüência. Para teste de atividade biológica usou-se a capacidade destes peptídeos para estimular a produção de GMPc em células T84 em cultura, conforme descrito por Fonteles em 1993 (Fonteles et al, 1993).

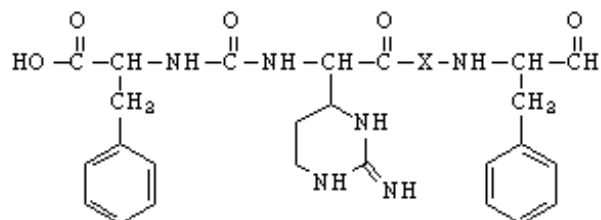
#### **5.5. Quimostatina**

##### **5.5.1. Descrição física**

A fórmula molecular (C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>O<sub>6</sub>N<sub>7</sub>) da quimostatina apresenta mistura de três formas distintas: quimostatina A (PM = 607,7; 79-89 %), quimostatina B (PM = 593,7; 12-17 %) e quimostatina C (PM = 607,7; 5-15 %) (Elliott, 1987; Tatsuta et al, 1973) e fora adquirida da Sigma Chemical Co. (S. Loius- Missouri).



### 5.5.2. Estrutura



**quimostatina**      A: X=L-Leu  
                                  B: X=L-Val  
                                  C: X=L-Ile

(Elliott, 1987; Tatsuta et al, 1973).

### 5.5.3. Estabilidade e armazenamento

Sua meia-vida não é determinada com precisão. Como para a maioria dos peptídeos, aconselha-se a conservação congelada em ambiente seco. Nestas condições permanece estável por um ano, após o qual deve ter sua eficiência, como inibidor de protease, reavaliada anualmente. (Sigma, 1998).

### 5.5.4. Solubilidade e estocagem

Solubilizada em ácido acético glacial, quimostatina (10 mg/mL) adquire coloração clara incolor de aparência amarela. É também solúvel em DMSO, e pouco solúvel em água e álcool de cadeia curta. Quimostatina é insolúvel em etil-acetato, butil-acetato, éter, hexano, éter e hexano de petróleo. Soluções de estoque podem ser preparadas em 0,1 M HCl. Soluções de estoque de 10 mM podem ser preparadas em DMSO permanecendo estáveis durante meses (-20°C). Soluções de diluição (10-100 µM) são estáveis por algumas horas apenas (Umezawa et al, 1970; Sigma, 1998).

## 5.6. *BTCI*

### 5.6.1. Conceitos gerais

Os inibidores de proteases da família de Bowman e Birk apresentam baixo peso molecular (7-10 Kd). São proteínas globulares isoladas de sementes de plantas leguminosas e solúveis em água. Estes inibidores de proteases apresentam dois sítios reativos e independentes para ligação de proteases; apresentam ainda grande homologia em suas seqüências de aminoácidos (Laskowisky & Kato, 1980).

### 5.6.2. Descrição e características

O BTCI (do inglês black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor - inibidor de tripsina e quimiotripsina da ervilha de olhos-pretos) é um membro da família do inibidor do protease de Bowman-Birk (BBI). Apresenta dois sítios de ligação para as proteases (double-headed) - característica comum aos BBI's. Trata-se se de um pó branco extremamente leve; Morhy e Ventura (Morhy & Ventura, 1987) isolaram o BTCI da ervilha *Vigna unguiculata* (L.) Walp. var *Serid'o*. A seqüência de aminoácidos do BTCI foi também determinada por Ventura: Ser-Gli-His-His-Glx-Asx-Ser-Tre-Asx-Glx-Ala-Ser-Glx-Ser-Ser-Lis-Pro-Cis-Cis-Arg-Glx-Cis-Ala-Cis-Tre-Lis-Ser-Ile-Pro-Pro-Glx-Cis-Arg-Cis-Ser-Asx-Val-Arg-Leu-Asn-Ser-Cis-His-Ser-Ala-Cis-Lis-Ser-Cis-Ala-Cys-Ter-Phe-Ser-Ile-Pro-Ala-Glx-Cis-Phe-Cis-Gli-Asx-Ile-Asx-Asx-Phe-Cis-Tir-Lis-Pro-Cis-Lis-Ser-Ser-His-Ser-Asx-Asx-Asx-Asx-Trp-Asn. BTCI apresenta um grau elevado de homologia com a família dos inibidores de proteinase de Bowman-Birk. e é considerado inibidor específico e de alta afinidade por tripsina e quimiotripsinas (de Freitas et al, 1997). Embora os inibidores de proteases tipo BBI's sejam estudados de longa data, o BTCI carece de estudo biológico quanto à sua interferência no metabolismo de células, tecidos e órgãos.

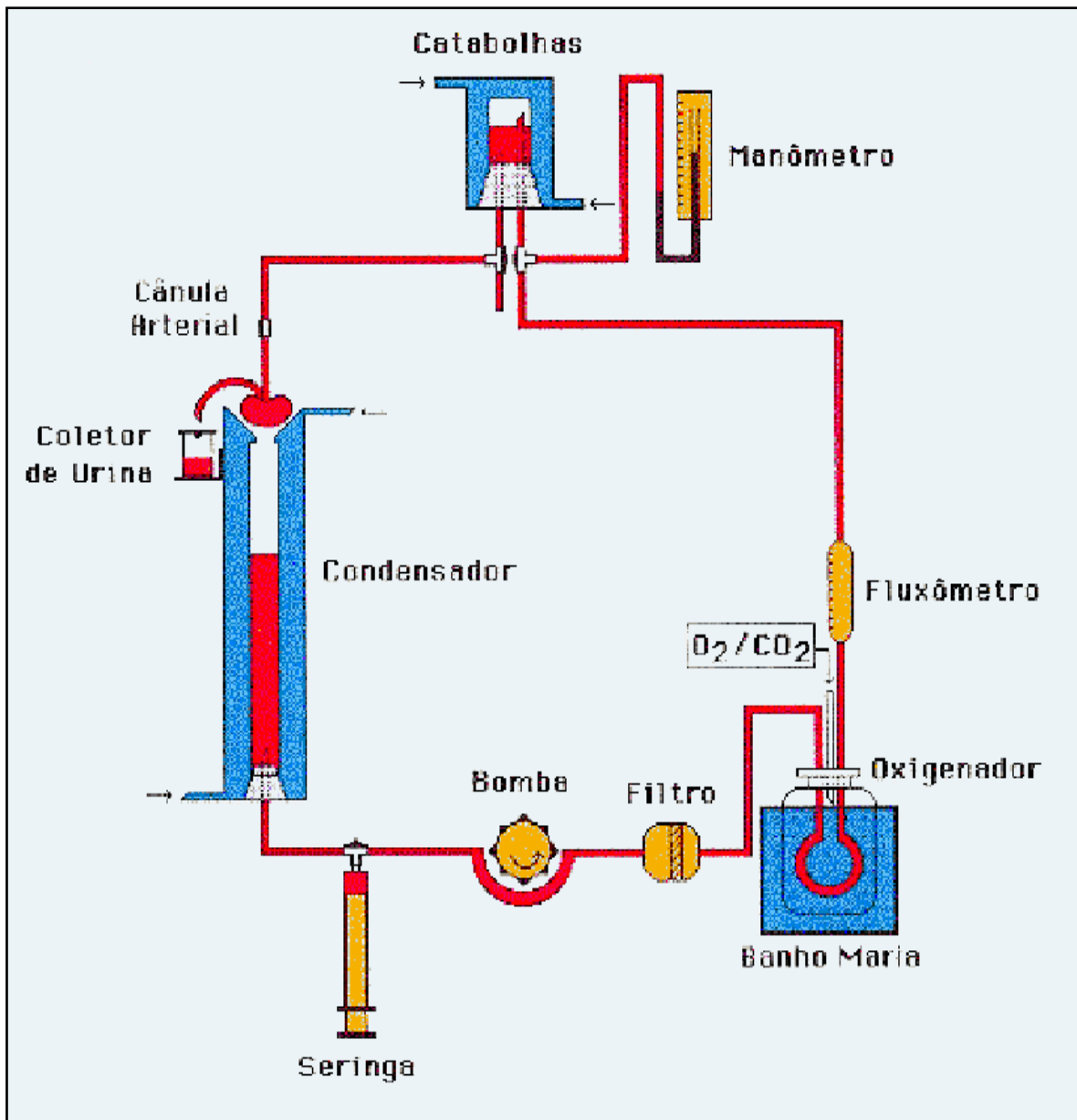
## 5.7. *Animais de experimentação*

Utilizamos animais fornecidos pelo biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Faculdade de

Medicina. Ratos Wistar adultos de ambos os sexos, pesando entre 200 e 280 g, foram mantidos em jejum com água *ad libitum* por 24 horas antes de serem utilizados nos experimentos.

### **5.8. Sistema e solução para perfusão**

O sistema utilizado foi o de perfusão de rim isolado com recirculação, desenvolvido por Bowman e Maack (Bowman & Maack, 1974) com modificações por Fonteles (Fonteles & Lima, 1982). Constitui-se de dois subsistemas: um de perfusão "in situ" e outro com circuito fechado para perfusão "in vitro", ambos mantidos à temperatura de 38 °C.



**Figura 5-1: Ilustração do Sistema**

### 5.8.1. Aparelhos para perfusão de rim isolado

Figuram-se sequencialmente os seguintes elementos em série ou paralelo:

- a. Condensador- serve de reservatório de aquecimento da solução perfusora;
- b. Seringa graduada- para retirada de amostra de perfusato (paralelo);
- c. Bomba de perfusão (Watson-Malow);
- d. Filtro (USA-Millipore-5 $\mu$ m)- promove uma melhor perfusão através da filtração constante da solução perfusora;
- e. Oxigenador (pulmão artificial)- onde acontece as trocas gasosas (95% de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>)- constituído de tubos silásticos;
- f. Banho maria (Fanem- modelo 100)- aquece e mantém o pulmão a 37°C;
- g. Fluxômetro- permite a leitura do fluxo de perfusão durante o experimento;
- h. Catabolhas- câmara que retém bolhas, evitando o embolismo gasoso do órgão;
- i. Manômetro de mercúrio- permite fazer a leitura direta da pressão de perfusão (paralelo);
- j. Bomba aquecedora com termostato- para manutenção de todo sistema de perfusão a 37°C.

### 5.8.2. Elaboração da solução de perfusão

Foi adicionada inulina à solução de Krebs-Henseleit, modificada com a seguinte composição em mM: Na<sup>+</sup> 147; K<sup>+</sup> 5; Ca<sup>++</sup> 2.5; Mg<sup>++</sup> 2.0; Cl<sup>-</sup> 110; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25; SO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1 e PO<sub>4</sub><sup>---</sup> 1. Seis gramas de albumina bovina sérica, fração V, foram adicionadas a esta solução previamente dializada por 48 horas a 4 °C.

A diálise da solução perfusora, contendo albumina, era feita para eliminar várias substâncias contaminantes (citrato, piruvato e lactato) (Fonteles & Lima, 1982; Fonteles et al, 1983).

O total de perfusato usado em cada experimento era de 100ml. Imediatamente antes do início da perfusão 100mg de glucose, 50mg de uréia e 50mg de inulina eram adicionados ao perfusato. O pH era então ajustado para 7.4 e a solução era colocada no sistema de perfusão. A solução foi oxigenada em um pulmão artificial com carbogênio (mistura gasosa de oxigênio 95% e gás carbônico 5%) através de uma membrana silástica permeável ao gás. Acoplados em série ao sistema, existe um catabolhas com o propósito de evitar a embolização por ar do órgão, um filtro de impurezas e um fluxômetro (Fonteles & Lima, 1982; Fonteles et al, 1983).

### **5.9. *Calibração do sistema***

Antes da experiência, o sistema foi lavado com detergente e água bidestilada aquecida, logo após foi montado e calibrado. Na calibração foram usadas duas curvas tendo pressão (mmHg) e fluxo ( $\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) como variáveis. A bomba que compõe o sistema de perfusão possui cinco velocidades. Em cada velocidade foi medido o fluxo na ponta da cânula e a pressão foi registrada em manômetro de mercúrio. Sempre antes dos experimentos, curvas de calibração foram elaboradas e graficadas a seguir.

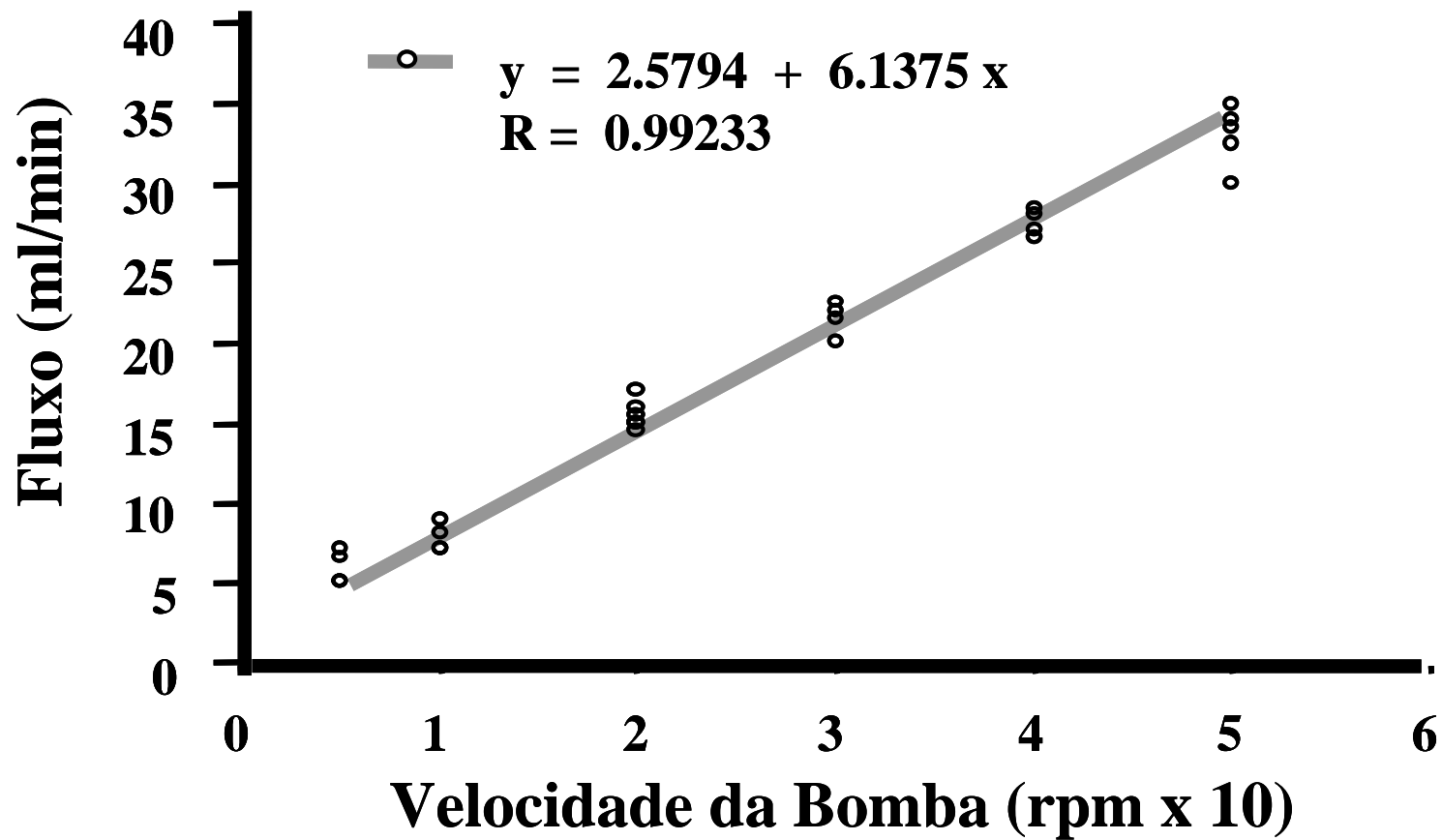


Figura 5-2 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração da velocidade da bomba vs fluxo medido na cânula de perfusão renal.

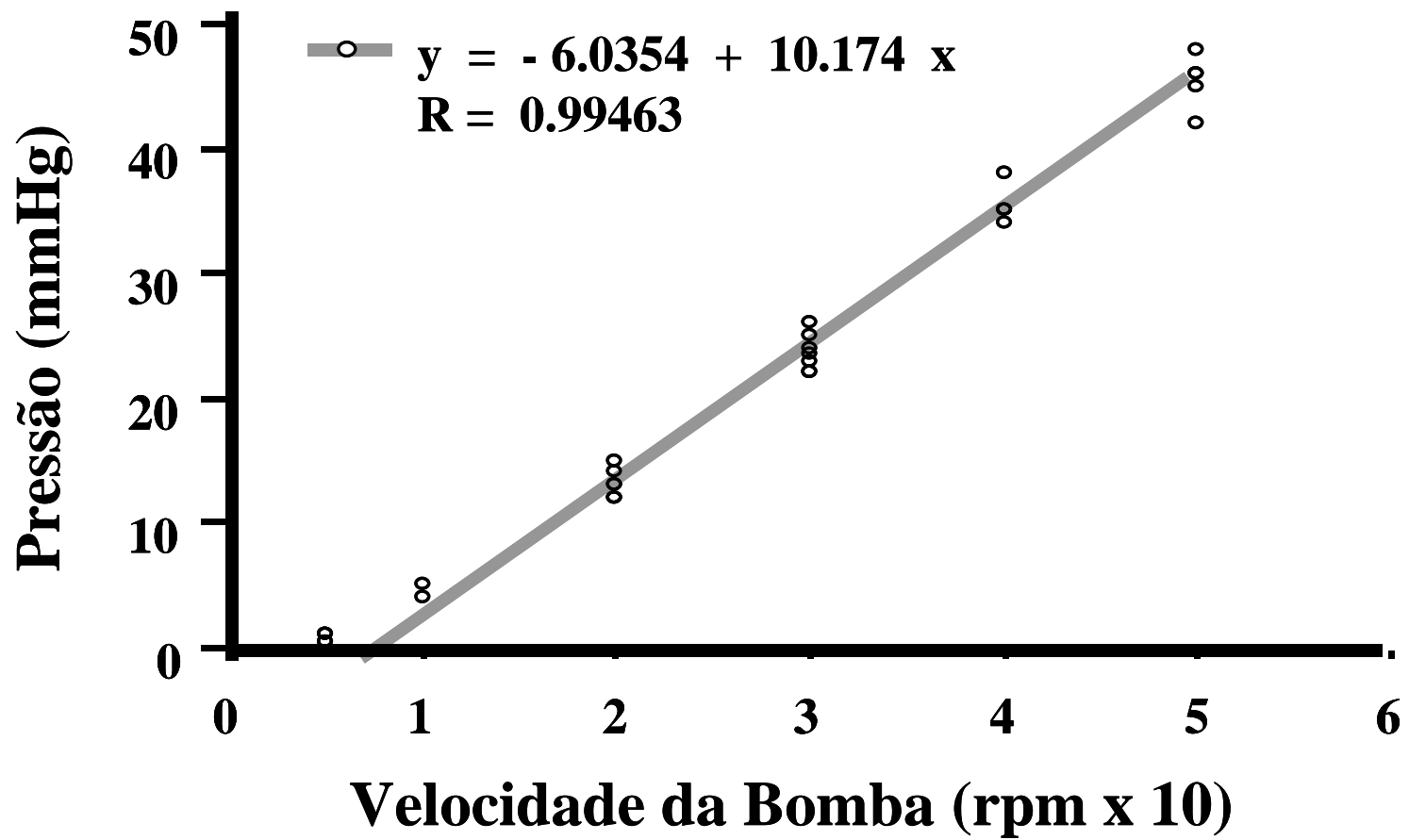


Figura 5-3 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração da velocidade da bomba vs pressão de perfusão medida na cânula de perfusão renal.



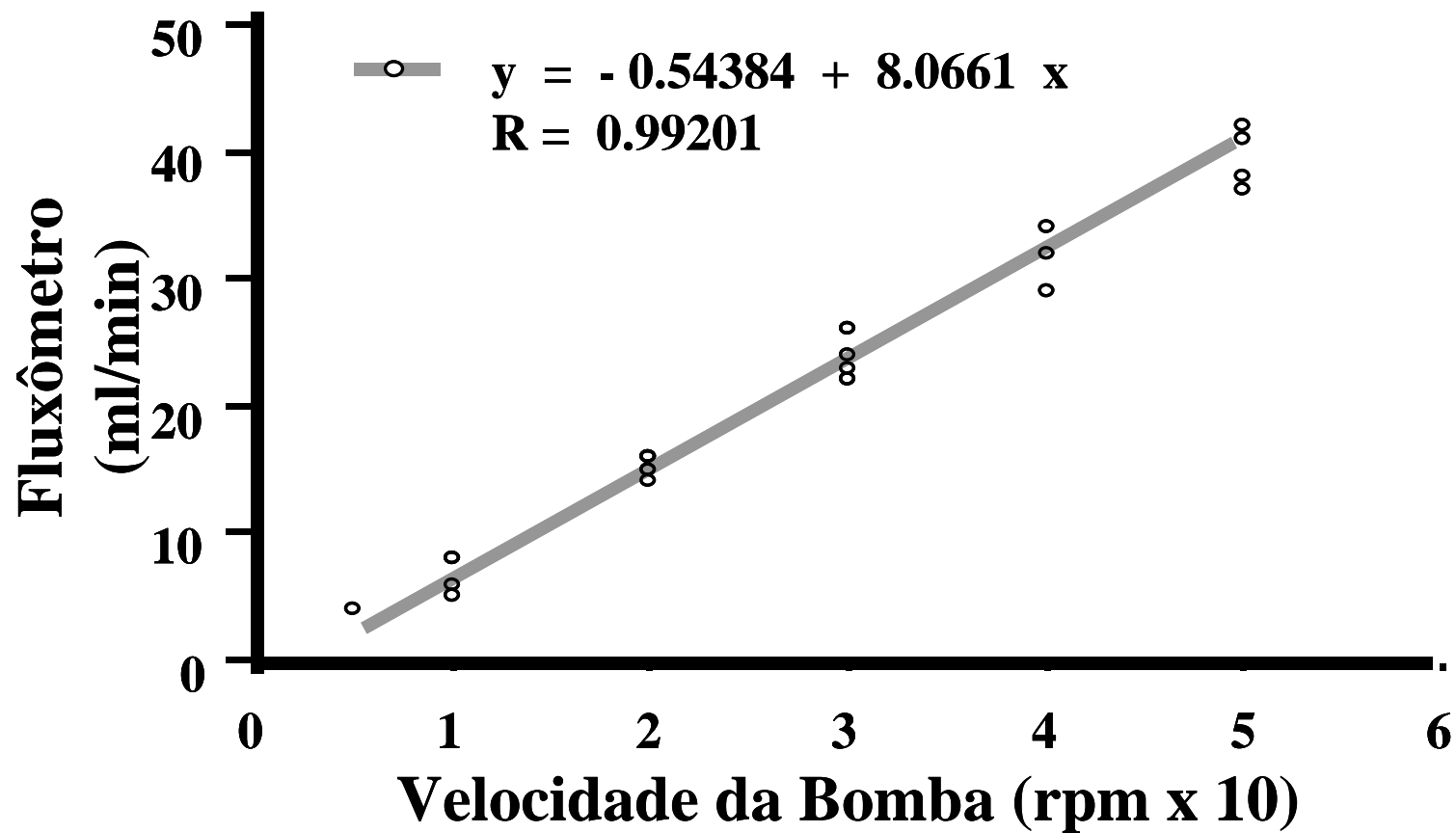


Figura 5-4 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração da velocidade da bomba vs medidas do fluxômetro acoplado em série com o sistema de perfusão renal.

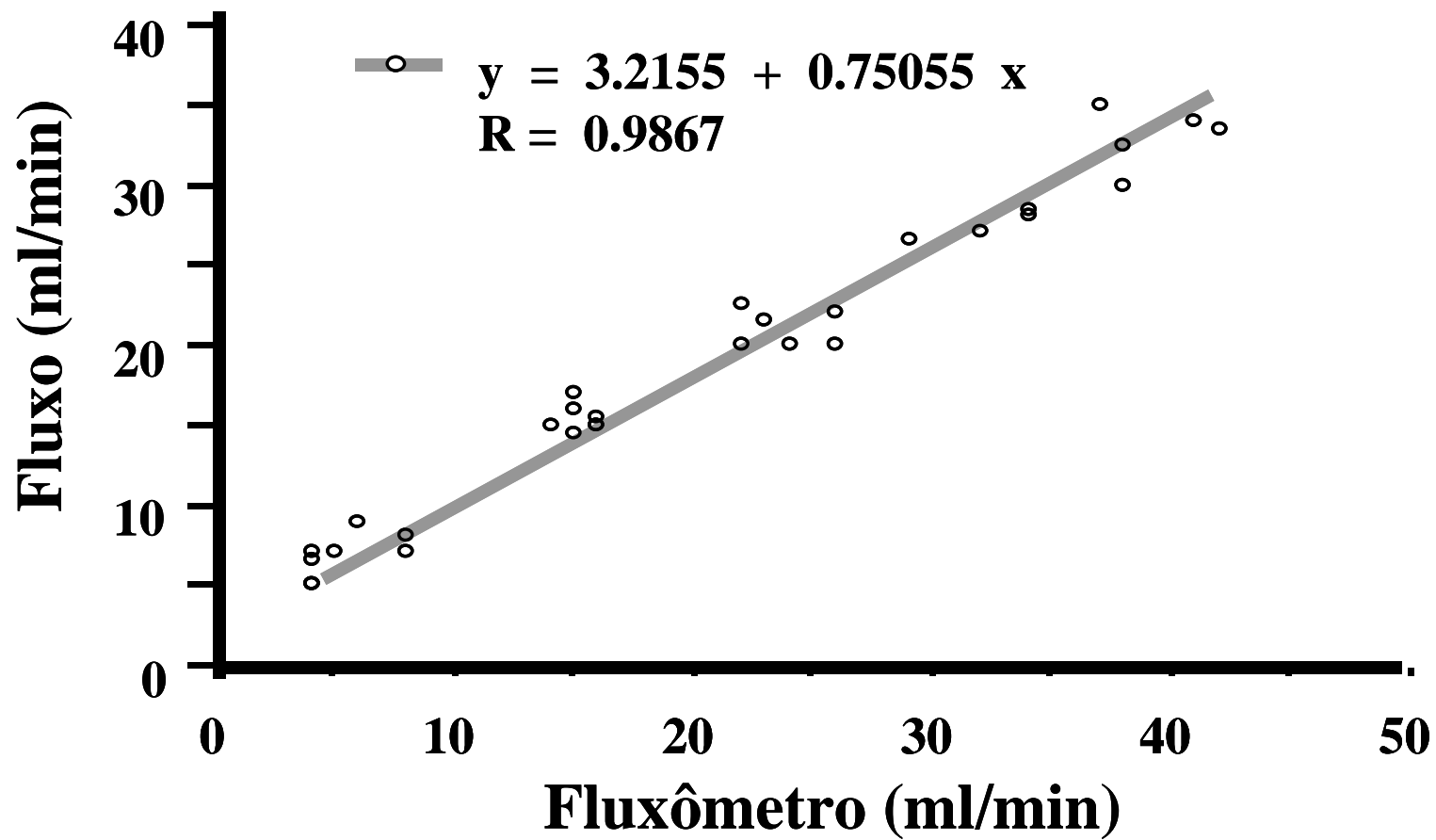


Figura 5-5 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração das medidas do fluxômetro vs fluxo medido na cânula de perfusão renal.

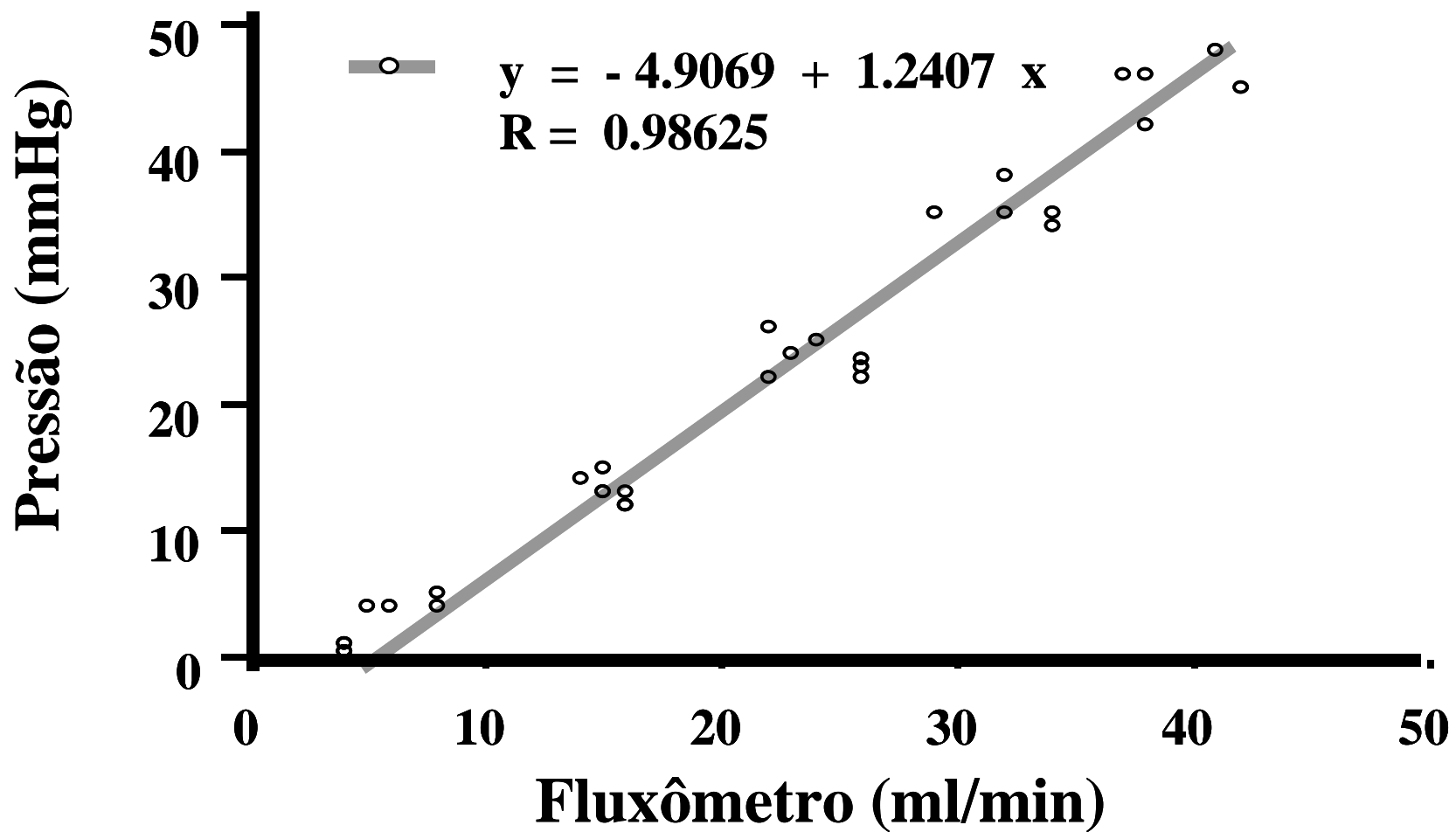


Figura 5-6 : Regressão linear dos pontos das curvas de calibração das medidas do fluxômetro vs pressão deperusão medida na cânula de perfusão renal

O sistema era calibrado para fluxo e resistência antes de cada experimento. A pressão de perfusão era medida no terminal da cânula de aço inoxidável. A pressão de perfusão era ajustada próxima aos 120 mmHg para o início do período denominado controle interno de 30 minutos, podendo flutuar durante a perfusão e de acordo com as condições experimentais.

### ***5.10. Técnica de abordagem cirúrgica***

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, na dose de 40 mg/Kg de peso corporal por via intraperitoneal. Na seqüência foi administrado manitol (20 %; 03 ml) pela veia femoral esquerda. Após abertura da cavidade abdominal, visualizou-se o rim direito após deslocamento das alças intestinais, mantidas sempre umedecidas em solução salina aquecida. O ureter direito foi clampeado e dissecado para posteriormente ser canulado. O rim direito foi descapsulado após ser realizada adrenalectomia à direita com ligadura da respectiva artéria. Canulou-se o ureter direito. Em seguida, após cuidadosa dissecação, a artéria renal direita foi canulada através da artéria mesentérica superior sem interrupção do fluxo vascular renal. Finalmente o rim foi transportado para o sistema de perfusão "in vitro". O rim contra-lateral foi retirado e pesado para correção do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular por grama de massa tecidual. Uma fatia de cada rim é retirada para histologia. O peso úmido de cada fatia é medido na proporção percentual do peso úmido total do rim para inferência do peso seco total (Fonteles et al, 1990 e 1983).

### ***5.11. Análise histológica***

Ao final de cada experimento, foi retirado um fragmento longitudinal do rim perfundido (direito) e o não perfundido (esquerdo) e colocados em formol a 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação e diafanização, para confecção dos cortes histológicos, os quais mediram 5µm de espessura. Foi realizadas coloração de hematoxilina-eosina para o estudo das lâminas, através de um microscópio óptico. Não se evidenciaram alterações histológicas inerentes a qualquer dos grupos experimentais protocolados.

### ***5.12. Protocolo experimental geral***

Após a colocação do rim no sistema "in vitro", aguardou-se um período de 15 a 20 minutos para que o mesmo se adaptasse às condições experimentais. A pressão e o fluxo de perfusão foram registrados a cada 5 minutos, por um período total de 120 minutos. As amostras de urina e perfusato foram colhidas a cada 10 minutos durante todo o experimento. O ritmo de filtração glomerular foi calculado a partir do clearance de inulina. Os experimentos tiveram duração de 120 min. Perfundiram-se rins controles e rins tratados pela adição de fármacos à solução perfusora.

Todos os experimentos foram divididos em quatro períodos de 30 minutos. Cada um desses períodos foram subseqüentemente subdivididos em intervalos iguais de 10 minutos. A cada intervalo de 10 minutos, amostras de perfusato e urina eram coletadas para medidas das funções renais.

### ***5.13. Análise Bioquímica***

Os testes bioquímicos foram realizados na Unidade de Pesquisas Clínicas. Empregou-se o método de fotometria de chama (Flame photometer- modelo 443 IL) para dosagens de sódio e potássio. A inulina do perfusato e da urina foram determinadas por hidrólise direta, conforme Fonteles (Fonteles et al, 1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados.

A osmolalidade das amostras foi medida em osmômetro de pressão de vapor da Advanced Instruments (Needham Heights, MA - Vapor pressure osmometer - modelo 5100c ESCOR). Todos os produtos químicos eram de grau analítico e foram adquiridos da Sigma (S. Louis, MO) ou da Companhia Merck (West Point, PA).

### ***5.14. Fórmulas dos parâmetros de função renal***

As fórmulas para cálculo dos diversos parâmetros fisiológicos renais estão tabeladas abaixo. Todas as fórmulas estão de acordo com Fonteles (Fonteles & Lima, 1982; Fonteles et

al, 1983) e como proposto por Martinez-Maldonado e Opava-Stitzer (Martinez-Maldonado & Opava-Stitzer, 1978).

**Tabela 5-1 : Parâmetros de Função Renal (símbolos, unidade de medidas, forma de cálculo empregando fórmulas, aparelhos ou método de dosagem ou inferência)**

<b>Símbolo</b>	<b>Unidade</b>	<b>Função Renal</b>	<b>Forma de Cálculo / Medida</b>
FU	(ml/g/min)	Fluxo Urinário	Volume Urinário / Peso Seco do Rim (g) / 10 min
RFG	(ml/g/min)	Ritmo de Filtração Glomerular	FU*(Densidade Ótica da Inulina na Urina / Densidade Ótica da Inulina no Perfusato)
PP	(mmHg)	Pressão de Perfusão	Medida em Coluna de Mercúrio
FPR	(ml/g/min)	Fluxo Plasmático Renal	Medida do Fluxômetro / Peso Seco do Rim (g) / 10 min
PNa <sup>+</sup>	(μEq)	Na <sup>+</sup> do Perfusato	Medida do Espectrofotômetro de Chama
UNa <sup>+</sup>	(μEq)	Na <sup>+</sup> Urinário	Medida do Espectrofotômetro de Chama
FNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Na <sup>+</sup> Filtrado	RFG * PNa <sup>+</sup>
ENa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Na <sup>+</sup> Excretado	FU * UNa <sup>+</sup>
TNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Na <sup>+</sup> Transportado	FNa <sup>+</sup> - ENa <sup>+</sup>
%TNa <sup>+</sup>	%	% TNa <sup>+</sup> Transportado	TNa <sup>+</sup> * 100 % / FNa <sup>+</sup>
%ENa <sup>+</sup>	%	% ENa <sup>+</sup> Excretado	ENa <sup>+</sup> * 100 % / FNa <sup>+</sup>
PK <sup>+</sup>	(μEq)	K <sup>+</sup> do Perfusato	Medida do Espectrofotômetro de Chama
UK <sup>+</sup>	(μEq)	K <sup>+</sup> Urinário	Medida do Espectrofotômetro de Chama
FK <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	K <sup>+</sup> Filtrado	RFG * PK <sup>+</sup>
EK <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	K <sup>+</sup> Excretado	FU * UK <sup>+</sup>
TK <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	K <sup>+</sup> Transportado	FK <sup>+</sup> - EK <sup>+</sup>
%TK <sup>+</sup>	%	% TK <sup>+</sup> Transportado	TK <sup>+</sup> * 100 % / FK <sup>+</sup>
%EK <sup>+</sup>	%	% EK <sup>+</sup> Excretado	EK <sup>+</sup> * 100 % / FNa <sup>+</sup>
PCI <sup>-</sup>	(μEq)	Cl <sup>-</sup> do Perfusato	Método Colorimétrico
UCI <sup>-</sup>	(μEq)	Cl <sup>-</sup> Urinário	Método Colorimétrico
FCI <sup>-</sup>	(μEq/g/min)	Cl <sup>-</sup> Filtrado	RFG * PCI <sup>-</sup>
ECl <sup>-</sup>	(μEq/g/min)	Cl <sup>-</sup> Excretado	FU * UCI <sup>-</sup>
TCl <sup>-</sup>	(μEq/g/min)	Cl <sup>-</sup> Transportado	FCI <sup>-</sup> - ECl <sup>-</sup>
%TCl <sup>-</sup>	%	% TCl <sup>-</sup> Transportado	TCl <sup>-</sup> * 100 % / FCI <sup>-</sup>
%ECl <sup>-</sup>	%	% ECl <sup>-</sup> Excretado	ECl <sup>-</sup> * 100 % / FNa <sup>+</sup>
Uosm	(ml/g/min)	Concentração de Osmóis da Urina	Medida em Osmômetro de Pressão à Vapor

<b>Símbolo</b>	<b>Unidade</b>	<b>Função Renal</b>	<b>Forma de Cálculo / Medida</b>
Posm	(ml/g/min)	Concentração de Osmóis do Perfusato	Medida em Osmômetro de Pressão à Vapor
Cosm	(ml/g/min)	Clearance Osmolar	$(U_{osm} / Posm) * FU$
CH <sub>2</sub> O	(ml/g/min)	Clearance de Água Livre	$FU - Cosm$
DTNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Distal de Na <sup>+</sup>	$CH_2O * PNa^+$
AdNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Aporte Distal de Na <sup>+</sup>	$dTNa^+ + ENa^+$
%dTNa <sup>+</sup> da AdNa <sup>+</sup>	%	Transporte % Distal de Na <sup>+</sup>	$dTNa^+ * 100 \% / AdNa^+$
PTNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Proximal de Na <sup>+</sup>	$FNa^+ - AdNa^+$
%pTNa <sup>+</sup>	%	Transporte % Proximal de Na <sup>+</sup>	$pTNa^+ * 100 / FNa^+$
DTNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Distal de Na <sup>+</sup>	$CH_2O * PNa^+$
AdNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Aporte Distal de Na <sup>+</sup>	$dTNa^+ + ENa^+$
%dTNa <sup>+</sup> do AdNa <sup>+</sup>	%	Transporte % Distal de Na <sup>+</sup>	$dTNa^+ * 100 \% / AdNa^+$
PTNa <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Proximal de Na <sup>+</sup>	$FNa^+ - AdNa^+$
%pTNa <sup>+</sup>	%	Transporte % Proximal de Na <sup>+</sup>	$pTNa^+ * 100 / FNa^+$
DTK <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Distal de K <sup>+</sup>	$CH_2O * PK^+$
AdK <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Aporte Distal de K <sup>+</sup>	$dTK^+ + EK^+$
%dTK <sup>+</sup> do AdK <sup>+</sup>	%	Transporte % Distal de K <sup>+</sup>	$dTK^+ * 100 \% / AdK^+$
PTK <sup>+</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Proximal de K <sup>+</sup>	$FK^+ - AdK^+$
%pTK <sup>+</sup>	%	Transporte % Proximal de K <sup>+</sup>	$pTK^+.100 / FK^+$
DTCl <sup>-</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Distal de Cl <sup>-</sup>	$CH_2O * PCl^-$
AdCl <sup>-</sup>	(μEq/g/min)	Aporte Distal de Cl <sup>-</sup>	$dTCl^- * ECl^-$
%dTCl <sup>-</sup> do AdCl <sup>-</sup>	%	Transporte % Distal de Cl <sup>-</sup>	$dTCl^- * 100 \% / AdCl^-$



<b>Símbolo</b>	<b>Unidade</b>	<b>Função Renal</b>	<b>Forma de Cálculo / Medida</b>
PTCl <sup>-</sup>	(μEq/g/min)	Transporte Proximal de Cl <sup>-</sup>	FCI <sup>-</sup> - AdCl <sup>-</sup>
%pTCl <sup>-</sup>	%	Transporte % Proximal de Cl <sup>-</sup>	pTCl <sup>-</sup> * 100/ FCI <sup>-</sup>

Alguns dos parâmetros de função renal podem ter sido exibidos e calculados como pré-requisitos para outros parâmetros. Isto não implica que todos os parâmetros apresentados sejam necessariamente interpretados ou graficados neste trabalho.

Nos cálculos do funcionamento dos processos distais, usou-se não a carga filtrada (FK<sup>+</sup>), mas o aporte distal (Ad). Desta forma, há melhor dinâmica de avaliação desses parâmetros.

O cálculo propriamente dito dos parâmetros de função renal foi realizado em planilha eletrônica Excel versão 7.0 (Microsoft Corporation, USA, 1997) para sistema operacional Macintosh 7.1.2 (Apple Computer Inc.; Cupertino, CA, USA, 1994), bem como para sistema operacional Microsoft Windows 95 (Microsoft Corporation, USA, 1995) para computadores PC compatíveis.

### **5.15. Estatística descritiva e analítica**

Outros software como Kaleidagraph, Statview ou Power Point também foram empregados para elaboração de gráficos e cálculos de estatística descritiva e analítica. Os dados foram apresentados em média e erro padrão da média. Pelo menos 4 animais diferentes foram necessários para determinação de cada ponto. Os dados foram submetidos à anova (análise de variância). Quando indicado, foi aplicado o teste de *Fischer* para comparação entre os períodos de tempos de 30 min de um mesmo tratamento ou entre os diferentes grupos experimentais analisados. Nível de significância com  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente diferente.

### **5.16. Protocolo experimental para combinação de peptídeos**

Somente após 30 min de perfusão, período estabelecido como controle interno, a guanilina (0,3 μg/ml), quimostatina (6,0 μg/ml - 1,0 μM), BTCI (1,0 μM), ANP (0,1 ng/ml -

0,03  $\mu\text{M}$ ) ou urodilatina (0,1 ng/ml- 0,03  $\mu\text{M}$ ) foram adicionadas à solução de perfusão separadamente para cada grupo de animais. Em outros três grupos experimentais, guanilina (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ) foi adicionada à solução no mesmo tempo que anteriormente houvera sido adicionada, porém quimostatina (6,0  $\mu\text{g/ml}$ - 1,0 $\mu\text{M}$ ), ANP (0,1 ng/ml- 0,03  $\mu\text{M}$ ) ou urodilatina (0,1 ng/ml- 0,03  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados à solução de perfusão separadamente para cada grupo de animais no início do experimento (tempo zero de perfusão).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. *Validação do modelo experimental*

Tabelamos os resultados da estatística descritiva e analítica dos principais parâmetros de função renal em experimentos controles do modelo experimental aqui utilizado. Todos os valores estão expressos na íntegra no apêndice I, no final da dissertação.

As diferenças entre os valores de mediana para cada tempo de perfusão não foram grandes suficientes para excluir a possibilidade de que as mesmas (diferenças) tenham ocorrido como consequência de uma variação randomizada das amostras. Assim, não há qualquer variação estatisticamente significativa.

Para as seguintes funções renais foi aplicado o seguinte teste: One Way Kruskal-Wallis (Análise da Variância) quando indicado pelo teste de normalidade das amostras ( $P < 0.01$ ): pressão de perfusão aferida da artéria renal (PP; mmHg;  $P = 0.9983$ ;  $H = 2.05$  com 11 graus de liberdade; Tabela 13-1), ritmo de filtração glomerular (RFG; ml/g/min;  $P = 0.9416$ ;  $H = 4.77$  com 11 graus de liberdade; Tabela 13-3) clearance de água livre (C água livre; ml/g/min;  $P = 0.382$ ;  $H = 11.8$  com 11 graus de liberdade; Tabela 13-8)

Para as seguintes funções renais, foi aplicado o seguinte teste: análise da variância one way: fluxo urinário (FU; ml/g/min;  $P = 0.831$ ; tabela 13-2) para teste de normalidade ( $P = 0.2890$ ) e da variância ( $P = 0.9652$ ); reabsorção tubular fracionada de sódio (%TNa<sup>+</sup>; %;  $P = 0.996$ ; tabela 13-4) para teste de normalidade ( $P = 0.2025$ ) e da variância ( $P = 0.8859$ ); Reabsorção tubular fracionada de potássio (%TK<sup>+</sup>; %;  $P = 1.000$ ; tabela 13-5) para teste de normalidade ( $P = 0.1573$ ) e da variância ( $P = 0.9766$ ); reabsorção tubular fracionada de cloreto (%TCl<sup>-</sup>; %;  $P = 0.890$ ; tabela 13-6) para teste de normalidade ( $P = 0.6320$ ) e da variância ( $P = 0.7482$ ); clearance osmolar (Cosm; ml/g/min;  $P = 0.917$ ; tabela 13-7) para teste de normalidade ( $P = 0.7072$ ) e da variância ( $P = 0.6510$ ).

## 6.2. Grupos experimentais protocolados

A seguir, encontram-se tabulados os resultados dos grupos experimentais protocolados anteriormente nos objetivos.

**Tabela 6-1: Número (n) de animais em cada grupo experimental, número de amostras correspondente aos valores de média e erro padrão da média (e.p.m.) e número total de amostras por cada grupo experimental.**

<b>Grupo</b>	<b>n de animais</b>	<b>n / média e e.p.m.</b>	<b>n de amostras/grupo</b>
Controle	6	18	72
Guanilina (Guan)	6	18	72
Uroguanilina (UroG)	4	12	48
Quimostatina (Quim)	5	15	60
Quim + Guan	5	15	60
BTCI	4	12	48
BTCI + Guan	4	12	48
ANP	6	18	72
ANP + Guan	6	18	72
ANP + UroG	5	15	60
Urodilatina (UroD)	4	12	48
UroD + Guan	4	12	48
UroD + UroG	4	12	48

Na verificação da interferência da quimostatina, do BTCI, do ANP e da urodilatina no metabolismo e efeitos renais da guanilina e/ou uroguanilina, no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato, seguimos as mesmas doses anteriormente descritas. Aqui o primeiro fármaco foi administrado no tempo zero, ou seja, desde o início do experimento (tempo de perfusão de 120 min); o segundo fármaco foi administrado sempre após 30 min de

perfusão do primeiro - tempo de perfusão do segundo fármaco 90 min. Abordaremos todos os grupos a partir dos parâmetros de função renal.

### **6.2.1. Pressão de perfusão**

Conforme observado na tabela 10-2, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa quando avaliado em intervalos de 30, 60, 90 e 120 min, demonstrando pouca interferência do tempo neste grupo. Guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) não produziu alterações na pressão de perfusão quando comparado ao controle interno (30 min) ou quando comparado ao grupo controle. Uroguanilina (0,5 µg/ml; 60, 90, 120 min) produziu aumento da pressão de perfusão desde 90 min, atingindo valores significativos aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $154,4 \pm 5,98$  mmHg) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. O grupo de rins tratados com quimostatina (1,0 µM; 60, 90, 120 min) apresentou tendência ao incremento da pressão de perfusão porém, não atingira valores significantes em relação ao seu controle interno ou ao grupo controle. A associação de quimostatina (600 µg/ml; 30 min) ao tratamento com guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) não alterou significativamente os valores de pressão de perfusão. BTCI (1,0 µM; 60, 90, 120 min) aumentou a pressão de perfusão aos 60 min ( $p < 0,05$ ;  $139,0 \pm 4,98$  mmHg) para em seguida (90 e 120 min) retornar a valores não significativamente diferentes do controle interno ou do grupo controle. Quando associada ao BTCI (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) aumentou significativamente a pressão de perfusão aos 120 min ( $167,7 \pm 3,44$  mmHg) em relação ao controle interno ( $134,8 \pm 2,23$  mmHg) e ao grupo controle. ANP (0,03 nM; 60, 90, 120 min) ou Urodilatina (0,03 nM; 60, 90, 120 min) não produziram alterações na pressão de perfusão. Quando associada ao tratamento com ANP (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) não interferira na pressão de perfusão, ao passo que uroguanilina (60, 90, 120 min) perdera sua capacidade de incrementar a pressão de perfusão (120 min;  $96,4 \pm 4,88$  mmHg). Quando associada ao tratamento com urodilatina (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) aumentara ( $p < 0,05$ ) a pressão de perfusão aos 90 ( $150,8 \pm 4,88$  mmHg) e 120 min ( $164,9 \pm 4,88$  mmHg). A associação com urodilatina (30 min) não interferira no efeito da uroguanilina (60, 90, 120 min), embora estivesse

aumentando desde os 90 min, a pressão de perfusão atingira valores significantes somente aos 120 min ( $158,8 \pm 4,88$  mmHg). Uroguanilina sozinha induziu aumento da PP no intervalo de 120 min. Variação semelhante foi encontrada na associação de urodilatina mais uroguanilina.

Os grupos de urodilatina (60, 90, 120 min), ANP (30 min) mais uroguanilina (60, 90, 120 min), BTCI (30 min) mais guanilina (60, 90, 120 min) e ANP (30 min) mais guanilina (60, 90, 120 min) apresentaram grandes variações no intervalo de 30 min em relação ao grupo controle, porém sem significância estatística ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6-2: Pressão de perfusão aferida da artéria renal (PP; mmHg)**

<b>Grupo</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>90 min</b>	<b>120 min</b>
Controle	122,1 ± 3,17	122,3 ± 3,40	120,3 ± 2,27	121,8 ± 3,62
Guanilina (Guan)	123,3 ± 1,88	125,3 ± 2,35	119,9 ± 3,96	125,3 ± 4,01
Uroguanilina (UroG)	117,9 ± 5,98	120,5 ± 5,98	135,9 ± 5,98	<u>154,4 ± 5,98***</u>
Quimostatina (Quim)	124,8 ± 1,78	127,8 ± 2,02	127,0 ± 5,46	133,1 ± 4,13
Quim + Guan	122,8 ± 3,74	124,2 ± 5,88	132,3 ± 7,94	129,9 ± 7,02
BTCI	110,0 ± 2,28	<u>139,0 ± 4,98***</u>	129,0 ± 6,36	122,0 ± 6,31
BTCI + Guan	134,8 ± 2,23	148,0 ± 6,30**	169,8 ± 5,09**	<u>167,7 ± 3,44***</u>
ANP	120,0 ± 4,80	121,2 ± 5,48	119,5 ± 5,65	124,1 ± 4,12
ANP + Guan	128,2 ± 6,31	120,1 ± 5,43	129,1 ± 4,90	127,4 ± 4,11
ANP + UroG	105,6 ± 4,88	97,2 ± 4,88	96,9 ± 4,88**	96,4 ± 4,88**
Urodilatina (UroD)	107,7 ± 4,88	92,2 ± 4,88**	106,7 ± 4,88	111,9 ± 4,88
UroD + Guan	116,7 ± 4,88	127,9 ± 4,88	<u>150,8 ± 4,88***</u>	<u>164,9 ± 4,88***</u>
UroD + UroG	116,9 ± 4,23	131,2 ± 4,23	<u>146,7 ± 4,23***</u>	<u>158,8 ± 4,23***</u>

Os resultados representam média ± erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para  $n \geq 4$  em cada grupo; \*  $p < 0,05$  para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; \*\*  $p < 0,05$  para comparação em relação ao grupo controle.

### 6.2.2. Fluxo urinário

Conforme observado na tabela 10-3, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa quando avaliado em intervalos de 30, 60, 90 e 120 min, demonstrando pouca interferência do tempo neste grupo. Guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) não produziu alterações no fluxo urinário quando comparado ao controle interno (30 min) ou quando comparado ao grupo controle. Uroguanilina (0,5 µg/ml; 60, 90, 120 min) produziu aumento do fluxo urinário, atingindo valores significativos aos 90 ( $p < 0,05$ ;  $0,24 \pm 0,04$  ml/g/min) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $0,26 \pm 0,04$  ml/g/min) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. O grupo de rins tratados com quimostatina (1,0 µM; 60, 90, 120 min) apresentou transiente e significativo incremento do fluxo urinário aos 90 min ( $p < 0,05$ ;  $0,25 \pm 0,03$  ml/g/min) em relação ao seu controle interno ou ao grupo controle. A associação de quimostatina (30 min) ao tratamento com guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) alterou significativamente os valores de fluxo urinário aos 90 ( $p < 0,05$ ;  $0,25 \pm 0,06$  ml/g/min) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $0,28 \pm 0,07$  ml/g/min). BTCI (1,0 µM; 60, 90, 120 min) aumentou o fluxo urinário aos 60 min ( $p < 0,05$ ;  $0,26 \pm 0,02$  ml/g/min) para em seguida (90 e 120 min) retornar a valores não significativamente diferentes do controle interno ou do grupo controle. Quando associada ao BTCI (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o fluxo urinário aos 90 ( $0,25 \pm 0,01$  ml/g/min) e 120 min ( $0,39 \pm 0,09$  ml/g/min) em relação ao controle interno ( $0,13 \pm 0,02$  ml/g/min) e ao grupo controle. ANP (0,03 nM; 60, 90, 120 min) aumentou o fluxo urinário com valores significativos aos 120 min ( $0,39 \pm 0,03$  ml/g/min) em relação ao controle interno (30 min;  $0,26 \pm 0,03$  ml/g/min) e grupo controle. Urodilatina (0,03 nM; 60, 90, 120 min) não produziu alterações no fluxo urinário. Quando associada ao tratamento com ANP (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) aumentara ( $p < 0,05$ ) o fluxo urinário aos 60 ( $0,31 \pm 0,03$  ml/g/min) e 120 min ( $0,43 \pm 0,03$  ml/g/min) em relação ao controle interno ( $0,17 \pm 0,03$  ml/g/min) e grupo controle, ao passo que uroguanilina (60, 90, 120 min) perdera sua capacidade de incrementar o fluxo urinário (controle interno =  $0,12 \pm 0,03$  ml/g/min; 90 min =  $0,11 \pm 0,03$  ml/g/min; 120 min =  $0,10 \pm 0,03$  ml/g/min). Quando associada ao tratamento com urodilatina (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) não alterou



( $p > 0,05$ ) o fluxo urinário. A associação com urodilatina (30 min) bloqueara ( $p < 0,05$ ) o efeito da uroguanilina (60, 90, 120 min) sobre o fluxo urinário aos 90 ( $0,19 \pm 0,03$  ml/g/min) e 120 min ( $0,15 \pm 0,03$  ml/g/min).

O grupo urodilatina (30 min) mais guanilina (60, 90, 120 min) apresentou variações com significância estatística ( $p < 0,05$ ) no intervalo de 30 min em relação ao grupo controle, impedindo ou mesmo prejudicando avaliação e comparações entre mesmo intervalo de tempo de grupos diferentes.

### **6.2.3. Ritmo de filtração glomerular**

Conforme observado na tabela 10-4, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa quando avaliado em intervalos de 30, 60, 90 e 120 min, demonstrando pouca interferência do tempo neste grupo. Guanilina ( $0,3 \mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) não produziu alterações no ritmo de filtração glomerular quando comparado ao controle interno (30 min); os valores correspondentes a este grupo se encontram acima daqueles encontrados para o grupo controle, entretanto sem significância estatística ( $p > 0,05$ ). Uroguanilina ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) não produziu alterações no ritmo de filtração glomerular quando comparado ao controle interno (30 min) ou quando comparado ao grupo controle. O grupo de rins tratados com quimostatina ( $1,0 \mu\text{M}$ ; 60, 90, 120 min) apresentou transiente e significativo incremento do ritmo de filtração glomerular aos 90 min ( $p < 0,05$ ;  $1,15 \pm 0,07$  ml/g/min) em relação ao seu controle interno ou ao grupo controle. A associação de quimostatina (30 min) ao tratamento com guanilina ( $0,3 \mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) não alterou os valores de ritmo de filtração glomerular em qualquer dos intervalos de tempo. BTCI ( $1,0 \mu\text{M}$ ; 60, 90, 120 min) aumentou o ritmo de filtração glomerular aos 60 min ( $p < 0,05$ ;  $0,75 \pm 0,07$  ml/g/min) para em seguida (90 e 120 min) retornar a valores não significativamente diferentes do controle interno; esta alteração não tem significância ( $p > 0,05$ ) se comparada ao grupo controle. Quando associada ao BTCI (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) aumentou o ritmo de filtração glomerular de forma não significativa ( $p > 0,05$ ). ANP ( $0,03$  nM; 60, 90, 120 min), bem como urodilatina ( $0,03$  nM; 60, 90, 120 min) também aumentaram o ritmo de filtração glomerular de forma não significativa ( $p > 0,05$ ). Quando associada ao tratamento com ANP (30 min), nem guanilina

(60, 90, 120 min) nem uroguanilina (60, 90, 120 min) alterou ( $p>0,05$ ) o ritmo de filtração glomerular em relação ao controle interno ou grupo controle. Quando associada ao tratamento com urodilatina (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) ou uroguanilina (60, 90, 120 min) não alteraram ( $p>0,05$ ) o ritmo de filtração glomerular.

Os grupos de guanilina (60, 90, 120 min), urodilatina (60, 90, 120 min) e urodilatina (30 min) mais uroguanilina (60, 90, 120 min) apresentaram grandes variações da filtração em relação ao grupo controle, entretanto seus valores permaneceram sem significância estatística ( $p>0,05$ ).

**Tabela 6-3: Fluxo urinário (FU; ml/g/min)**

<b>Grupo</b>	<b>30min</b>	<b>60min</b>	<b>90min</b>	<b>120min</b>
Controle	0,15±0,02	0,17±0,02	0,17±0,02	0,17±0,02
Guanilina (Guan)	0,18±0,05	0,20±0,05	0,21±0,05	0,19±0,04
Uroguanilina (UroG)	0,14±0,04	0,20±0,04	<u>0,24±0,04***</u>	<u>0,26±0,04***</u>
Quimostatina (Quim)	0,15±0,01	0,20±0,02	<u>0,25±0,03***</u>	0,21±0,02
Quim + Guan	0,13±0,02	0,18±0,03	<u>0,25±0,06***</u>	<u>0,28±0,07***</u>
BTCI	0,13±0,01	<u>0,26±0,02***</u>	0,20±0,01	0,17±0,01
BTCI + Guan	0,13±0,02	0,19±0,03	<u>0,25±0,01***</u>	<u>0,39±0,09***</u>
ANP	0,18±0,04	0,19±0,04	0,25±0,04	<u>0,32±0,04***</u>
ANP + Guan	0,18±0,03	0,21±0,03	<u>0,30±0,02***</u>	<u>0,40±0,03***</u>
ANP + UroG	0,12±0,03	0,12±0,03	0,11±0,03	0,10±0,03
Urodilatina (UroD)	0,15±0,03	0,16±0,03	0,19±0,03	0,19±0,03
UroD + Guan	0,27±0,03**	0,31±0,03**	0,27±0,03**	0,28±0,03**
UroD + UroG	0,13±0,03	0,20±0,03	0,19±0,03	0,15±0,03

Os resultados representam média ± erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para  $n \geq 4$  em cada grupo; \*  $p < 0,05$  para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; \*\*  $p < 0,05$  para comparação em relação ao grupo controle.

**Figura 6-4: Ritmo de filtração glomerular (RFG; ml/g/min)**

<b>Grupo</b>	<b>30min</b>	<b>60min</b>	<b>90min</b>	<b>120min</b>
Controle	0,69±0,09	0,66±0,09	0,65±0,09	0,65±0,09
Guanilina (Guan)	0,89±0,13	0,81±0,15	0,85±0,12	0,79±0,12
Uroguanilina (UroG)	0,64±0,15	0,76±0,15	0,70±0,15	0,64±0,15
Quimostatina (Quim)	0,72±0,07	0,94±0,06	<u>1,15±0,07***</u>	0,99±0,07
Quim + Guan	0,72±0,09	0,79±0,08	0,80±0,10	0,79±0,13
BTCI	0,59±0,06	0,75±0,07*	0,51±0,07	0,47±0,05
BTCI + Guan	0,71±0,07	0,62±0,12	0,73±0,06	0,96±0,12
ANP	0,67±0,10	0,68±0,09	0,86±0,08	0,83±0,09
ANP + Guan	0,79±0,11	0,72±0,11	0,78±0,10	0,95±0,15
ANP + UroG	0,66±0,12	0,65±0,12	0,64±0,12	0,63±0,12
Urodilatina (UroD)	0,72±0,12	0,78±0,12	1,00±0,12	1,03±0,12
UroD + Guan	1,06±0,12	0,99±0,12	0,84±0,12	0,81±0,12
UroD + UroG	0,71±0,10	0,92±0,10	1,10±0,10	0,81±0,10

Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para  $n \geq 4$  em cada grupo; \*  $p < 0,05$  para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; \*\*  $p < 0,05$  para comparação em relação ao grupo controle.

**Figura 6-5: Reabsorção tubular fracionada de sódio (%TNa<sup>+</sup>; %)**

<b>Grupo</b>	<b>30min</b>	<b>60min</b>	<b>90min</b>	<b>120min</b>
Controle	79,4 ± 1,37	80,2 ± 1,37	79,8 ± 1,37	80,3 ± 1,37
Guanilina (Guan)	80,4 ± 2,99	81,2 ± 3,11	84,5 ± 3,43	81,5 ± 4,25
Uroguanilina (UroG)	82,4 ± 2,37	79,4 ± 2,37	<u>72,2 ± 2,37***</u>	<u>64,1 ± 2,37***</u>
Quimostatina (Quim)	79,1 ± 0,77	79,2 ± 2,19	79,3 ± 2,36	78,9 ± 2,27
Quim + Guan	81,2 ± 1,86	78,8 ± 2,50	76,1 ± 2,73	<u>72,6 ± 2,45***</u>
BTCI	77,2 ± 1,30	67,9 ± 1,99	<u>65,6 ± 2,80***</u>	68,2 ± 4,28**
BTCI + Guan	82,2 ± 2,06	71,9 ± 3,19	<u>69,9 ± 1,31***</u>	<u>65,6 ± 3,48***</u>
ANP	78,1 ± 1,85	77,3 ± 1,89	78,0 ± 1,75	79,9 ± 2,03
ANP + Guan	81,2 ± 1,56	77,1 ± 1,78	<u>70,4 ± 1,70***</u>	<u>68,5 ± 1,69***</u>
ANP + UroG	81,2 ± 1,93	82,7 ± 1,93	84,0 ± 1,93	85,2 ± 1,93
Urodilatina (UroD)	83,4 ± 1,93	86,4 ± 1,93	86,1 ± 1,93	84,6 ± 1,93
UroD + Guan	77,3 ± 1,93	73,3 ± 1,93	<u>70,2 ± 1,93***</u>	<u>69,0 ± 1,93***</u>
UroD + UroG	81,3 ± 1,67	79,4 ± 1,67	82,7 ± 1,67	82,1 ± 1,67

Os resultados representam média ± erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para  $n \geq 4$  em cada grupo; \*  $p < 0,05$  para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; \*\*  $p < 0,05$  para comparação em relação ao grupo controle.

#### 6.2.4. Reabsorção tubular fracionada de sódio

Conforme observado na tabela 10-5, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa quando avaliado em intervalos de 30, 60, 90 e 120 min, demonstrando pouca interferência do tempo neste grupo. Guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) não produziu alterações na reabsorção tubular de sódio quando comparado ao controle interno (30 min) ou quando comparado ao grupo controle. Uroguanilina (0,5 µg/ml; 60, 90, 120 min) produziu redução da reabsorção tubular de sódio desde 90 min ( $p < 0,05$ ;  $72,2 \pm 2,37$  %) tingindo maior redução aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $64,1 \pm 2,37$  %) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. O grupo de rins tratados com quimostatina (1,0 µM; 60, 90, 120 min) apresentaram estabilidade da reabsorção tubular de sódio em relação ao seu controle interno e semelhante ao grupo controle. A associação de quimostatina (600 µg/ml; 30 min) ao tratamento com guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) potencializou significativamente a redução da reabsorção tubular de sódio aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $72,6 \pm 2,45$  %) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. BTCI (1,0 µM; 60, 90, 120 min) reduziu a reabsorção tubular de sódio aos 90 min ( $p < 0,05$ ;  $65,6 \pm 2,80$  %) para, em seguida (120 min), apresentar valores não significativamente diferentes do controle interno ( $p > 0,05$ ), mas diferentes ( $p < 0,05$ ) do grupo controle. Quando associada ao BTCI (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduziu significativamente a reabsorção tubular de sódio aos 90 ( $p < 0,05$ ;  $69,9 \pm 1,31$  %) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $65,6 \pm 3,48$  %) em relação ao controle interno e ao grupo controle. ANP (0,03 nM; 60, 90, 120 min) ou Urodilatina (0,03 nM; 60, 90, 120 min) não produziram alterações na reabsorção tubular de sódio. Quando associada ao tratamento com ANP (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduziu significativamente a reabsorção tubular de sódio aos 90 ( $p < 0,05$ ;  $70,4 \pm 1,70$  %) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $68,5 \pm 1,69$  %) em relação ao controle interno e ao grupo controle, ao passo que uroguanilina (60, 90, 120 min) perdera sua capacidade de incrementar a reabsorção tubular de sódio (120 min;  $84,0 \pm 1,93$  %). Quando associada ao tratamento com urodilatina (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduzira ( $p < 0,05$ ) a reabsorção tubular de sódio aos 90 ( $70,2 \pm 1,93$  %) e 120 min ( $69,0 \pm 1,93$  %). Por

outro lado, a associação com urodilatina (30 min) bloqueara o efeito da uroguanilina (60, 90, 120 min) sobre a reabsorção tubular de sódio.

Nenhum dos grupos experimentais apresentou grandes variações no intervalo de 30 min em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ).

### **6.2.5. Reabsorção tubular fracionada de potássio**

Conforme observado na tabela 10-6, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa quando avaliado em intervalos de 30, 60, 90 e 120 min, demonstrando pouca interferência do tempo neste grupo. Guanilina (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) não produziu alterações na reabsorção tubular de potássio quando comparado ao controle interno (30 min) ou quando comparado ao grupo controle. Uroguanilina (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) produziu redução da reabsorção tubular de potássio aos 90 min ( $p < 0,05$ ;  $48,3 \pm 4,43$  %) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $49,0 \pm 4,43$  %) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. O grupo de rins tratados com quimostatina (1,0  $\mu\text{M}$ ; 60, 90, 120 min) apresentaram estabilidade da reabsorção tubular de potássio em relação ao seu controle interno com valores semelhantes ao grupo controle. A associação de quimostatina (1,0  $\mu\text{M}$ ; 30 min) ao tratamento com guanilina (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) potencializou significativamente a redução da reabsorção tubular de potássio aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $65,8 \pm 2,81$  %) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle (120 min). BTCI (1,0  $\mu\text{M}$ ; 60, 90, 120 min) reduziu a reabsorção tubular de potássio aos 90 min ( $p < 0,05$ ;  $34,3 \pm 9,67$  %) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $41,5 \pm 8,94$  %) significativamente diferentes do controle interno e do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Quando associada ao BTCI (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduziu significativamente a reabsorção tubular de potássio aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $47,6 \pm 2,84$ %) em relação ao controle interno e ao grupo controle. ANP (0,03 nM; 60, 90, 120 min) ou Urodilatina (0,03 nM; 60, 90, 120 min) não produziram alterações na reabsorção tubular de potássio. Quando associada ao tratamento com ANP (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduziu significativamente a reabsorção tubular de potássio aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $49,4 \pm 3,84$  %) em relação ao controle interno e ao grupo controle, ao passo que uroguanilina (60, 90, 120 min) perdera sua

capacidade de incrementar a reabsorção tubular de potássio ( $p>0,05$ ; 90 min=  $41,9 \pm 3,61\%$ ; 120 min=  $73,5 \pm 3,61\%$ ). Quando associada ao tratamento com urodilatina (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduzira ( $p<0,05$ ) a reabsorção tubular de potássio aos 120 min ( $45,8 \pm 3,61\%$ ). Por outro lado, a associação com urodilatina (30 min) bloqueara o efeito da uroguanilina (60, 90, 120 min) sobre a reabsorção tubular de potássio ( $p>0,05$ ; 90min=  $75,1 \pm 3,13\%$ ; 120 min=  $75,7 \pm 3,13\%$ ).

Os grupos experimentais contendo BTCI apresentaram as maiores variações no intervalo de 30 min em relação ao grupo controle, porém seus valores não apresentaram significância estatística mensurável ( $p>0,05$ ).



**Tabela 6-6: Reabsorção tubular fracionada de potássio (%TK<sup>+</sup>; %)**

<b>Grupo</b>	<b>30min</b>	<b>60min</b>	<b>90min</b>	<b>120min</b>
Controle	70,0 ± 2,56	74,6 ± 2,56	75,4 ± 2,56	75,3 ± 2,56
Guanilina (Guan)	69,8 ± 4,54	74,1 ± 5,12	70,9 ± 3,85	75,5 ± 5,69
Uroguanilina (UroG)	72,8 ± 4,43	71,4 ± 4,43	<u>48,3 ± 4,43***</u>	<u>49,0 ± 4,43***</u>
Quimostatina (Quim)	68,3 ± 2,79	70,6 ± 4,78	72,9 ± 3,96	74,8 ± 3,09
Quim + Guan	69,4 ± 4,12	64,4 ± 5,96	68,4 ± 3,37	<u>65,8 ± 2,81***</u>
BTCI	56,8 ± 3,19	44,8 ± 5,70	<u>34,3 ± 9,67***</u>	<u>41,5 ± 8,94***</u>
BTCI + Guan	58,9 ± 4,21	40,7 ± 5,94	51,8 ± 2,74	<u>47,6 ± 2,84***</u>
ANP	68,1 ± 3,98	65,8 ± 3,89	69,9 ± 4,01	73,3 ± 4,56
ANP + Guan	63,5 ± 4,11	62,5 ± 4,30	55,1 ± 4,12	<u>49,4 ± 3,84***</u>
ANP + UroG	60,9 ± 3,61	55,7 ± 3,61	54,8 ± 3,61	61,2 ± 3,61
Urodilatina (UroD)	67,5 ± 3,61	69,1 ± 3,61	71,9 ± 3,61	73,5 ± 3,61
UroD + Guan	59,8 ± 3,61	54,1 ± 3,61	47,9 ± 3,61	<u>45,8 ± 3,61***</u>
UroD + UroG	70,1 ± 3,13	69,6 ± 3,13	75,1 ± 3,13	75,7 ± 3,13

Os resultados representam média ± erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para n ≥ 4 em cada grupo; \* p < 0,05 para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; \*\* p < 0,05 para comparação em relação ao grupo controle.

### 6.2.6. Reabsorção tubular fracionada de cloreto

Conforme observado na tabela 10-7, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa quando avaliado em intervalos de 30, 60, 90 e 120 min, demonstrando pouca interferência do tempo neste grupo. Guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) não produziu alterações na reabsorção tubular de cloreto quando comparado ao controle interno (30 min) ou quando comparado ao grupo controle. Uroguanilina (0,5 µg/ml; 60, 90, 120 min) produziu redução da reabsorção tubular de cloreto desde 90 min ( $p < 0,05$ ;  $64,8 \pm 2,92$  %) a tingindo maior redução aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $60,4 \pm 2,92$  %) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. Quimostatina (1,0 µM; 60, 90, 120 min) não interferiu na reabsorção tubular de cloreto em relação ao seu controle interno e apresentara valores semelhantes ao grupo controle. A associação de quimostatina (1,0 µM; 30 min) ao tratamento com guanilina (0,3 µg/ml; 60, 90, 120 min) potencializou significativamente a redução da reabsorção tubular de cloreto aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $37,6 \pm 2,72$  %) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle (120 min). BTCI (1,0 µM; 60, 90, 120 min) reduziu a reabsorção tubular de cloreto aos 60 min ( $p < 0,05$ ;  $62,5 \pm 3,58$  %) 90 min ( $p < 0,05$ ;  $60,1 \pm 4,96$  %) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $66,3 \pm 3,80$  %) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. Quando associada ao BTCI (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduziu significativamente a reabsorção tubular de cloreto aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $61,9 \pm 4,13$  %) em relação ao controle interno e ao grupo controle. ANP (0,03 nM; 60, 90, 120 min) ou Urodilatina (0,03 nM; 60, 90, 120 min) não produziram alterações na reabsorção tubular de cloreto. Quando associada ao tratamento com ANP (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduziu significativamente a reabsorção tubular de cloreto aos 90 ( $p < 0,05$ ;  $61,3 \pm 2,50$  %) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $60,2 \pm 2,53$  %) em relação ao controle interno e ao grupo controle, ao passo que uroguanilina (60, 90, 120 min) perdera sua capacidade de incrementar a reabsorção tubular de cloreto ( $p > 0,05$ ; 90 min=  $83,5 \pm 2,39$  %; 120 min=  $81,1 \pm 2,39$  %). Quando associada ao tratamento com urodilatina (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) reduziu ( $p < 0,05$ ) a reabsorção tubular de cloreto aos 90 ( $63,8 \pm 2,39$  %) e 120 min ( $62,6 \pm 2,39$  %). Por outro lado, a associação com urodilatina (30 min) bloqueara o

efeito da uroguanilina (60, 90, 120 min) sobre a reabsorção tubular de cloreto ( $p > 0,05$ ; 90 min =  $79,5 \pm 2,07\%$ ; 120 min =  $79,5 \pm 2,07\%$ ).

Nenhum dos grupos experimentais apresentou grandes variações no intervalo de 30 min em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ).

### **6.2.7. Clearance osmolar**

Conforme observado na tabela 10-8, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa quando avaliado em intervalos de 30, 60, 90 e 120 min, demonstrando pouca interferência do tempo neste grupo. Guanilina ( $0,3 \mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) não produziu alterações no clearance osmolar quando comparado ao controle interno (30 min) ou quando comparado ao grupo controle. Uroguanilina ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) produziu aumento do clearance osmolar atingindo valores significativos aos 120 min ( $p < 0,05$ ;  $0,23 \pm 0,04 \text{ ml/g/min}$ ) quando comparado ao controle interno e ao grupo controle. Quimostatina ( $1,0 \mu\text{M}$ ; 60, 90, 120 min) apresentou transiente e significativo incremento do clearance osmolar aos 90 min ( $p < 0,05$ ;  $0,24 \pm 0,03 \text{ ml/g/min}$ ) em relação ao seu controle interno ou ao grupo controle. A associação de quimostatina (30 min) ao tratamento com guanilina ( $0,3 \mu\text{g/ml}$ ; 60, 90, 120 min) alterou significativamente os valores de clearance osmolar aos 90 ( $p < 0,05$ ;  $0,42 \pm 0,12 \text{ ml/g/min}$ ) e 120 min ( $p < 0,05$ ;  $0,49 \pm 0,18 \text{ ml/g/min}$ ). BTCI ( $1,0 \mu\text{M}$ ; 60, 90, 120 min) aumentou o clearance osmolar aos 60 min ( $p < 0,05$ ;  $0,23 \pm 0,01 \text{ ml/g/min}$ ) para em seguida (90 e 120 min) retornar a valores não significativamente diferentes do controle interno ou do grupo controle. Quando associada ao BTCI (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o clearance osmolar aos 90 ( $0,22 \pm 0,02 \text{ ml/g/min}$ ) e 120 min ( $0,36 \pm 0,09 \text{ ml/g/min}$ ) em relação ao controle interno ( $0,13 \pm 0,02 \text{ ml/g/min}$ ) e ao grupo controle. ANP ( $0,03 \text{ nM}$ ; 60, 90, 120 min) aumentou o clearance osmolar com valores significativos aos 120 min ( $0,30 \pm 0,04 \text{ ml/g/min}$ ) em relação ao controle interno (30 min;  $0,18 \pm 0,04 \text{ ml/g/min}$ ) e grupo controle. Urodilatina ( $0,03 \text{ nM}$ ; 60, 90, 120 min) não produziu alterações no clearance osmolar. Quando associada ao tratamento com ANP (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) aumentara ( $p < 0,05$ ) o clearance osmolar aos 60 ( $0,29 \pm 0,03 \text{ ml/g/min}$ ) e 120 min ( $0,41 \pm 0,04 \text{ ml/g/min}$ ) em relação ao controle interno ( $0,16 \pm$

0,03ml/g/min) e grupo controle, ao passo que uroguanilina (60, 90, 120 min) perdera sua capacidade de incrementar o clearance osmolar (30 min - controle interno=  $0,14 \pm 0,04$  ml/g/min; 90 min=  $0,09 \pm 0,04$  ml/g/min; 120 min=  $0,08 \pm 0,04$  ml/g/min). Quando associada ao tratamento com urodilatina (30 min), guanilina (60, 90, 120 min) não alterara ( $p > 0,05$ ) o clearance osmolar em relação ao controle interno (30 min). A associação com urodilatina (30 min) bloqueara ( $p < 0,05$ ) o efeito da uroguanilina (60, 90, 120 min) sobre o clearance osmolar aos 90 ( $p > 0,05$ ;  $0,18 \pm 0,03$  ml/g/min) e 120 min ( $p > 0,05$ ;  $0,13 \pm 0,03$  ml/g/min) em relação ao controle interno (30 min) e ao grupo controle.

O grupo urodilatina (30 min) mais guanilina (60, 90, 120 min) apresentaram variações com significância estatística ( $p < 0,05$ ) no intervalo de 30 min em relação ao grupo controle, impedindo ou mesmo prejudicando sua avaliação e comparações entre intervalos de tempo de grupos diferentes.

**Tabela 6-7: Reabsorção tubular fracionada de cloreto (%TCl; %)**

<b>Grupo</b>	<b>30min</b>	<b>60min</b>	<b>90min</b>	<b>120min</b>
Controle	79,5 ± 3,51	79,2 ± 3,51	78,5 ± 3,51	77,1 ± 3,51
Guanilina (Guan)	80,1 ± 4,68	82,0 ± 4,25	79,9 ± 3,93	82,1 ± 4,98
Uroguanilina (UroG)	78,0 ± 2,92	74,1 ± 2,92	<u>64,8 ± 2,92***</u>	<u>60,4 ± 2,92***</u>
Quimostatina (Quim)	76,6 ± 3,51	75,5 ± 3,51	73,0 ± 3,51	75,8 ± 3,51
Quim + Guan	78,1 ± 2,72	73,1 ± 2,72	69,2 ± 2,72	<u>67,6 ± 2,72***</u>
BTCI	75,2 ± 1,33	<u>62,5 ± 3,58***</u>	<u>60,1 ± 4,96***</u>	<u>66,3 ± 3,80***</u>
BTCI + Guan	78,3 ± 2,23	65,9 ± 3,54	65,1 ± 2,39	<u>61,9 ± 4,13***</u>
ANP	77,9 ± 2,48	78,1 ± 2,30	80,5 ± 2,39	78,6 ± 2,95
ANP + Guan	77,3 ± 2,36	70,1 ± 2,44	<u>61,3 ± 2,50***</u>	<u>60,2 ± 2,53***</u>
ANP + UroG	82,2 ± 2,39	82,2 ± 2,39	83,7 ± 2,39	85,0 ± 2,39
Urodilatina (UroD)	81,2 ± 2,39	85,4 ± 2,39	83,5 ± 2,39	81,1 ± 2,39
UroD + Guan	71,6 ± 2,39	66,2 ± 2,39	<u>63,8 ± 2,39***</u>	<u>62,6 ± 2,39***</u>
UroD + UroG	79,0 ± 2,07	75,7 ± 2,07	79,5 ± 2,07	79,5 ± 2,07

Os resultados representam média ± erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para  $n \geq 4$  em cada grupo; \*  $p < 0,05$  para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; \*\*  $p < 0,05$  para comparação em relação ao grupo controle.

**Tabela 6-8: Clearance osmolar (Cosm; ml/g/min)**

<b>Grupo</b>	<b>30min</b>	<b>60min</b>	<b>90min</b>	<b>120min</b>
Controle	0,13±0,02	0,13±0,02	0,14±0,02	0,13±0,02
Guanilina (Guan)	0,19±0,06	0,20±0,06	0,19±0,05	0,20±0,06
Uroguanilina (UroG)	0,13±0,04	0,16±0,04	0,20±0,04	<u>0,23±0,04***</u>
Quimostatina (Quim)	0,14±0,01	0,19±0,02	<u>0,24±0,03***</u>	0,21±0,02
Quim + Guan	0,13±0,02	0,26±0,07	<u>0,42±0,14***</u>	<u>0,49±0,18***</u>
BTCI	0,13±0,02	<u>0,23±0,01***</u>	0,17±0,01	0,14±0,09
BTCI + Guan	0,13±0,02	0,17±0,03	<u>0,22±0,02***</u>	<u>0,36±0,09***</u>
ANP	0,18±0,04	0,18±0,04	0,21±0,05	<u>0,30±0,04***</u>
ANP + Guan	0,16±0,03	0,21±0,03	<u>0,29±0,03***</u>	<u>0,41±0,04***</u>
ANP + UroG	0,14±0,04	0,12±0,04	0,09±0,04	0,08±0,04
Urodilatina (UroD)	0,12±0,03	0,11±0,03	0,14±0,03	0,15±0,03
UroD + Guan	0,28±0,03**	0,30±0,03**	0,25±0,03**	0,26±0,03**
UroD + UroG	0,13 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,18± 0,03	0,13± 0,03

Os resultados representam média ± erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para  $n \geq 4$  em cada grupo; \*  $p < 0,05$  para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; \*\*  $p < 0,05$  para comparação em relação ao grupo controle.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. *Experimentos controle*

A preparação de rim isolado de rato mostrou-se um modelo experimental bastante estável durante todo o tempo experimental (120 min). Quando da validação do modelo experimental, não houve significância estatística entre quaisquer dos tempos para os principais parâmetros de função renal. Pudemos ainda observar, mediante estatística descritiva e analítica, que os parâmetros de função renal em experimentos controles do modelo experimental utilizado apresentaram-se estáveis e desprovidos de alterações do tipo tempo-efeito.

Estas considerações permaneceram sólidas mesmo quando os experimentos controles foram submetido à análise da variância para intervalos de 30 min – tratamento similar e simultâneo aos grupos experimentais protocolados.

### 7.2. *Grupos experimentais protocolados*

#### 7.2.1. **Metabolismo da guanilina**

Em outras preparações e ensaios biológicos onde se observara efeitos prolongados e potentes para STa, também se observaram menos potente e mais breve a ação da guanilina. Em experimentação animal, quando administrada per-oral, STa causa diarreia, ao passo que, mesmo em doses maiores, guanilina é bem tolerada. Forte e Hamra (Forte & Hamra, 1996) comprovaram que, ao contrário da STa, guanilina era susceptível à ação de quimotripsina e/ou tripsina. No mesmo trabalho, ficou evidente que a quimostatina (um inibidor sintético de diversas proteases) protegia a guanilina da ação proteolítica das mesmas. Também foi comprovado que o peptídeo precursor, a pré-pró-guanilina, tem seus efeitos sobre o epitélio intestinal exacerbados após ser “ativada” por ação proteolítica de proteases. É evidente que as proteases exercem importante papel na modulação dos efeitos biológicos da guanilina (Greenberg et al, 1997; Hamra et al, 1996-a e 1996-b).

A estrutura da guanilina é a base da labilidade proteolítica do peptídeo. Não somente a carência de uma terceira ponte dissulfídica como a própria seqüência de aminoácidos torna a guanilina susceptível ao processo proteolítico. Carpick e Garipey (Carpick & Garipey, 1993) permutaram parte da seqüência de aminoácidos na região central da guanilina. Os aminoácidos permutados tornaram a estrutura do novo peptídeo semelhante à estrutura da STa, porém ainda era ausente a terceira ponte dissulfídica. Denominaram o novo peptídeo de N<sup>9</sup>P<sup>10</sup>guanilina. Quando da análise dos efeitos biológicos da N<sup>9</sup>P<sup>10</sup>guanilina, ficou comprovado que ela se assemelhava à STa em estrutura, efeitos biológicos e reduzida susceptibilidade à quimotripsina.

Realizamos um estudo comparativo entre o análogo lisil e o peptídeo original. Não só se confirmaram as observações originais como mais ainda se evidenciou que enigmaticamente, guanilina apresentara relação tempo-efeito, abreviada em relação ao análogo lisil. Em outras palavras, enquanto os efeitos renais de lisil-guanilina eram mantidos durante 90 min (tempo máximo de observação na preparação de rim isolado utilizada por Fonteles), guanilina mantinha a natriurese durante não mais que 60 min (Fonteles et al, 1998). O derivado lisínico de guanilina, obtido por engenharia genética, distingue-se pela capacidade natriurética mais duradoura, enquanto guanilina apresenta efeito renal transiente. Em células renais do opossum, guanilina produziu aumento de GMP cíclico semelhante à STa, mas com potência 10 vezes menor, consolidando os dados intestinais observados no rato e no homem sobre sua potência.

Uroguanilina estimula a formação de GMP cíclico em células T84, compete com 125I-ST por seus receptores e estimula a secreção de cloreto quando aplicado a membranas intestinais em câmaras de Ussing. Tem propriedades semelhantes às fisiológicas de guanilina e patológicas de STa. Sua potência farmacológica é intermediária entre STa e guanilina (Forte et al, 1993). Uroguanilina é resistente ao ataque proteolítico das enzimas presentes nas bordas de escova renais, enquanto a guanilina não o é (Miyazato et al, 1996-a e 1996-b; Fan et al, 1995), isto *per se* pode determinar maior eficácia para os seus efeitos em tecidos renais. Hamra (Hamra et al, 1993) também demonstrou sua resistência à ação de proteases.



### **7.2.2. Implicações fisiológicas da uroguanilina**

Assim como há maior natriurese após ingestão de dieta rica em sódio (Lennane et al, 1975; Carey, 1978), também há elevação dos níveis circulantes de uroguanilina (Forte & Hamra, 1996). Em recente revisão, Forte (Forte & Hamra, 1996) sugere que uroguanilina teria papel fisiológico na homeostase de sal e água. Uroguanilina poderia ser um hormônio intestinal que regularia o metabolismo do sódio. É importante salientar que não foi observado aumento da produção de ANP circulante mediante o aumento da carga de sódio (Saville et al, 1988).

Em 1996, Fonteles observou potentes efeitos natriuréticos e caliuréticos promovidos por uroguanilina. Fonteles demonstrou, ainda, que lisil-guanilina apresentava importantes efeitos natriuréticos, caliuréticos e diuréticos no rim isolado e perfundido do rato.

Esta relação entre dieta rica em sal e níveis altos de uroguanilina foi estudada por Kinoshita (Kinoshita et al, 1997). Esses autores estudaram a excreção urinária de uroguanilina imunoreativa em pacientes submetidos a alta concentração de sódio na dieta (10g/dia), e detectaram  $137.8 \pm 14.1$  pmol/dia e os compararam àqueles que apenas receberam 7g/dia nos quais observaram  $95.1 \pm 16.3$  pmol/dia; portanto, significativamente, menos que no primeiro grupo. Este trabalho demonstra, de maneira inequívoca, aquilo que fora teorizado anos antes por Carey em 1978.

### **7.2.3. Comparação do efeitos renais de baixas doses de guanilina e uroguanilina - inferência das relações de dose-efeito e tempo-efeito.**

A dose de guanilina empregada não induz alterações significativas na fisiologia renal. Guanilina (0,3 µg/ml) não interferiu na pressão de perfusão aferida da artéria renal, nem no fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, reabsorção tubular fracionada de sódio (%TNa<sup>+</sup>), potássio (%TK<sup>+</sup>) ou de cloreto (%TCl<sup>-</sup>; %). O clearance osmolar também não foi alterado pela guanilina. Em preparação similar e empregando dose quase tão baixa quanto esta, Fonteles

(Fonteles et al, 1998) fez observações semelhantes. Fonteles detectou efeitos caliuréticos da guanilina na dose de 0,5 µg/ml; a nossa dose de 0,3 µg/ml não interfere *per si* no transporte tubular renal de nenhum eletrólito estudado. Em nossos experimentos, uroguanilina (0,5 µg/ml) induziu aumento da pressão de perfusão no intervalo de 120 min. Nesta mesma dose, uroguanilina aumentou o fluxo urinário nos intervalos de 90 e 120 min, ao mesmo tempo que reduziu a reabsorção tubular fracionada de sódio, potássio e cloreto durante 60 min, logo após sua introdução na solução de perfusão (intervalos de 90 e 120 min). Embora ambos os peptídeos sejam encontrados no plasma e apresentem dimensões passíveis de filtração glomerular, somente uroguanilina é encontrada na urina (Miyazato et al, 1996-a e 1996-b; Fan et al, 1995), sugerindo maior resistência da mesma ao metabolismo tubular renal. Uroguanilina também apresenta maior afinidade pelo receptor GC-C presente nos túbulos renais (Hamra et al, 1993). Estas duas últimas observações servem de argumentos explicativos para que, na função tubular renal, uroguanilina apresente efeito mais potente - que guanilina - e mais rápido - que aquele observado na própria pressão de perfusão. Uroguanilina sozinha também aumentou o clearance osmolar no intervalo de 120 min. Estes efeitos, atribuíveis à uroguanilina em nossas observações, foram também compartilhados por Fonteles (Fonteles et al, 1998).

#### **7.2.4. Efeitos nefrotóxicos ou fisio-farmacológicos de quimostatina e BTCI na perfusão de rim isolado de rato.**

Durante o intervalo de 90 min, quimostatina (600 µg/ml) induziu transiente aumento do ritmo de filtração glomerular sem qualquer interferência na reabsorção tubular de eletrólitos (intervalos de 30, 60, 90 e 120 min). Fisiologicamente isto explica o aumento do fluxo urinário e do clearance osmolar no intervalo de 90 min. Estas alterações funcionais não são compatíveis com efeitos nefrotóxicos, onde há redução da filtração e do fluxo urinário renais. Sabendo-se que a dose de quimostatina é capaz de inibir a ação de diversas proteases (Elliott, 1987), parece ser ferramenta farmacológica bem apropriada para o estudo do metabolismo renal da guanilina.

O BTCI produz *per se* importantes alterações na fisiologia renal da preparação. À perfusão do BTCI segue-se imediato incremento da pressão de perfusão, da filtração glomerular e do fluxo urinário de forma transiente aos 60 min. Estas alterações apresentam-se fisiologicamente bem correlacionadas. Em adição, BTCI reduziu a reabsorção tubular de eletrólitos aos 90 min de intervalo. Seria muito fácil a explicação dos efeitos do BTCI como ação direta do mesmo sobre o rim. Considerando o maior intervalo de tempo entre as respostas tubulares (%TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup> e %TCL<sup>-</sup>) e as vasculares (PP e RFG) acreditamos que ocorra intermediação de algum outro fator derivados do rim naquelas respostas.

Considerando a proteção ao ataque de proteases renais conferida pela natureza do BTCI e da quimostatina, acreditamos que estes mediadores apresentem natureza protéica. Enquanto BTCI é inibidor específico da tripsina e quimiotripsina, outros peptídeos naturalmente produzidos e/ou degradados por outras proteases renais têm seu papel e metabolismo inalterados. Quimostatina, um inibidor de protease inespecífico, parece inibir ou compensar os efeitos inerentes às proteases tubulares renais que interferem com peptídeos natriuréticos. Uma vez que as respostas tubulares são precedidas das alterações vasculares, no caso do BTCI, ou totalmente dissociadas uma da outra, como é o caso da quimostatina, é bem provável que sejam intermediadas por agentes diferentes. Entre possíveis candidatos estão FNS, uroguanilina, guanilina, endotelina, etc.

### **7.2.5. Interações entre quimostatina/BTCI e o metabolismo renal da guanilina**

Após clonada, pré-pró-guanilina, precursora da guanilina com 115 aminoácidos, apresenta uma seqüência hidrofóbica de aminoácidos de sinalização. Esta seqüência COOH-terminal é altamente conservada entre as espécies humana, de ratos e de camundongos. Esta seqüência hidrofóbica de aminoácidos apresenta sítios dibásicos lisina-lisina aparentemente relacionados com a sinalização para ação proteolítica. A ação proteolítica sobre a pré-pró-guanilina gera sua forma biologicamente mais ativa (Schulz et al, 1992; Wiegand et al, 1992-a e 1992-b; de Sauvage et al, 1992; Garcia et al, 1993).

Quando do estudo comparativo entre guanilina e lisil-guanilina, Fonteles (Fonteles et al, 1996) encontrou diferenças na ação renal dos dois peptídeos, já descritos anteriormente. Não seria absurdo sugerir que a natriurese, com característica transiente na guanilina e duradoura na lisil-guanilina, seja conseqüente à modulação dos efeitos da guanilina por proteases renais.

As alterações nos parâmetros de função renal normalmente presentes em doses mais elevadas de guanilina, foram claramente realçadas para 0,3 µg/ml quando houve o pré-tratamento dos rins com quimostatina (600 µg/ml). Quimostatina mais guanilina prolongou até o fim do experimento (90 e 120 min) o aumento do fluxo urinário normalmente presente na quimostatina sozinha (90 min); fato compreensível pelo que se segue. Embora ambos os fármacos fossem isentos de atividade tubular renal nas doses utilizadas, quando associados, houve precoce e sustentado aumento das perdas renais de sódio, potássio e cloreto - reflexo da redução na reabsorção tubular fracionada destes eletrólitos. Em adição a estes achados, esta mesma associação não incrementou a filtração glomerular, configurando-se perfil de alterações funcionais do órgão semelhantes às doses mais altas de guanilina previamente publicadas por Fonteles (Fonteles et al, 1998). Fonteles também observou que mesmo altas doses de guanilina não sustentam os efeitos natriuréticos e caliuréticos durante o intervalo de 120 min. Os achados em nossos experimentos sugerem que a atividade natriurética e caliurética da guanilina tenha sido melhor conservada, assumindo características semelhantes às já descritas por nós para uroguanilina. Lembramos que uroguanilina é abundante na urina de mamíferos, comparado com os níveis baixos ou não detectáveis de guanilina na urina do gambá, do ser humano e do rato (Crane et al, 1992; Koesling et al, 1992; Levin, 1993). Quimostatina induziu transiente aumento do clearance osmolar no intervalo de 90 min; a associação quimostatina mais guanilina prolongou este aumento até o fim do experimento (intervalos de 90 e 120 min). Quando em associação com BTCI, guanilina apresentou discreta interferência no perfil de resultados obtidos quando foi utilizado BTCI sozinho.

Forte (Forte & Hamra, 1996) demonstrou *in vitro* o quanto interfere proteases como a quimiotripsina na conversão de pré-pró-guanilina e uroguanilina em peptídeos biologicamente ativos, bem como ocorre inativação da guanilina por estas mesmas proteases. Quase sempre

os polipeptídeos são removidos da circulação renal por duas vias (Mann et al, 1983). A predominante é a filtração glomerular que é seguida pela degradação tubular proximal. Dependendo da estrutura do peptídeo, a hidrólise prossegue após o contato com a membrana da borda em escova para os peptídeos lineares pequenos. Para peptídeos complexos, a internalização precede sua completa degradação. Considerando-se as dimensões da guanilina, do BTCI e da quimostatina - moléculas de pequenas dimensões - acreditamos que o metabolismo da guanilina e sua inibição pela quimostatina ocorra nas bordas em escova dos túbulos renais, envolvendo outras proteases que não especificamente sítio de ação da tripsina ou da quimiotripsina-like (Santos-Neto et al, 1997).

#### **7.2.6. Comparação do efeitos renais de baixas doses de ANP e urodilatina - inferência das relações de dose-efeito e tempo-efeito.**

Durante a insuficiência cardíaca, mediante distensão das paredes dos átrios, elevam-se os níveis de ANP circulantes em até 10 vezes. ANP promove aumento nas perdas renais de sal e água, o que reduz o volume de fluidos circulante (Globits et al, 1998; Guyton, 1996-c, 1996-d e 1996-e).

Alguns pesquisadores sugerem que, somente em estados cuja pressão arterial esteja normal ou alta, os efeitos renais do ANP reduzem o volume de sangue circulante mesmo em estados de sobrecarga de sal e água. A natriurese dependente de pressão ou pressão natriurética é compatível com as observações de que grandes quantidades de infusões de ANP não aumentam a natriurese ou a diurese se há pressão arterial baixa (Yamamoto et al, 1994; Kida et al, 1986; Guyton, 1996-c, 1996-d e 1996-e).

Em nossos experimentos, ANP aumentou o fluxo urinário e o clearance osmolar somente no intervalo de 120 min. A pressão de perfusão apresentou tendência de queda sem alcançar níveis de significância, bem como a filtração glomerular apresentou tendência ao incremento sem alcançar níveis de significância. Contrariando dados da literatura, não houve diurese dependente de pressão em nossos experimentos com rim isolado e perfundido de rato.

Por outro lado, de forma bastante coerente com dados da literatura atual, ANP não induziu alterações significativas na reabsorção tubular fracionada de eletrólitos. Reforça-se a tese de natriurese dependente de pressão.

Mediante outra análise de nossos experimentos, é provável que, em baixas doses, ANP promova vasodilatação da arteríola aferente do glomérulo, aumentando não significativamente a filtração glomerular, porém aumentando a filtração de eletrólitos, especialmente de sódio, nos túbulos renais (filtração de sódio 30min =  $155,25 \pm 16,47$   $\mu\text{Eq/g/min}$ ; filtração de sódio 120min =  $214,97 \pm 23,76$   $\mu\text{Eq/g/min}$ ;  $p < 0,05$ ). Fisiologicamente deveria haver aumento do transporte tubular renal de eletrólitos, porém, na presença de ANP (0,1 ng/ml), não há. Explica-se assim o aumento tardio da diurese. Contrariando algumas observações anteriores (Drummer et al, 1996) a despeito da utilização de mesmos receptores e vias de sinalização intra-celulares, urodilatina não induziu estas alterações. Por outro lado, urodilatina apresenta alguns resíduos de aminoácidos a mais que ANP; isto implica que embora muito semelhante à dose de ANP, a dose empregada de urodilatina é, em unidades molares, aproximadamente 20% menor.

Nossas observações pertinentes à urodilatina corroboram com os achados de Kirchoff (Kirchoff et al, 1994). Em experimentos com sistema de rim isolado de rato similar ao nosso, Kirchoff sugeriu que somente doses de urodilatina superiores a 0.1 ng/ml poderiam apresentar interferência na reabsorção tubular de eletrólitos pelo rim.

### **7.2.7. Interações entre ANP / Urodilatina & Guanilina / Uroguanilina durante a perfusão de rim isolado de rato.**

As observações experimentais, mesmo em diferentes espécies, podem ser muito úteis quando da interpretação de efeitos farmacológicos. Através do cDNA de células eucarióticas, foram identificados receptores GC-C adicionais, no intestino de porcos e do homem. Pela identificação da seqüência, há semelhança de 81 % entre o GC-C de rato e o humano, sendo que no domínio intracelular há 91 % de semelhança e no domínio extracelular, região relacionada ao ligante, há semelhança de 71 %. Entre o GC-C de porco e o humano há

semelhança de 87 %. Entre as espécies rato e porco há 82 % de semelhança (Wada et al, 1994; Singh et al, 1991; de sauvage et al, 1991; Forte & Currie, 1995).

ANP e seu equivalente renal, a urodilatina, agem indistintamente através de receptores acoplados ao guanilil-ciclase (GC) nos subtipos A e B. Produzem aumento em níveis intracelular de GMPc - seu segundo mensageiro (Millul et al, 1997). STa, guanilina e uroguanilina também estimulam receptores de membrana tipo GC, especificamente o subtipo C. O GC-C caracteriza-se por ser uma proteína de 240 kDa presente na membrana celular. GC-C apresenta seu maior domínio no meio extracelular (410 resíduos NH<sub>2</sub>-terminal). Existem dois domínios intracelulares. Na região COOH-terminal está o domínio catalítico guanilil ciclase, trata-se de uma seqüência de aminoácidos muito bem conservada.

As semelhanças estruturais entre GC-C, GC-A e GC-B não são suficientes para lhes conferir semelhanças funcionais.

O domínio catalítico e a região hidrofóbica transmembranar são similares aos GC-A e GC-B. Há um domínio cinase no GC-C homólogo àquele presente em GC-A com função desconhecida no sistema de transdução dos peptídeos guanilina/STa. Na região kinase-símile, GC-A e GC-B se ligam ao ATP. Enquanto GC-C não depende de ATP, estando esta região com sua função ainda por ser estabelecida, GC-A e GC-B tornam-se constitutivamente ativadas pela deleção da mesma. O 2-cloroATP é capaz de inibir a atividade do GC-C, sendo que o ATP e nucleotídeos relacionados, embora prescindíveis, aumentam a atividade catalítica (Hirayama et al, 1993; Vaandrager et al, 1993-a, 1993-b e 1994; Parkinson et al, 1994, Forte & Currie, 1995). Em geral, diz-se que nenhum ligante de GC-C é compartilhado com GC-A ou GC-B (Drewett et al, 1994; Currie et al, 1992; Forte & Currie, 1995).

Em nossos resultados evidenciamos que há potencialização de efeitos renais entre os peptídeos natriuréticos ANP/urodilatina e guanilina, o que sugere convergência de sinalização celular para os referidos peptídeos. Para tanto, seria necessário a co-existência de receptores para ambas as classes de peptídeos (GC-A/B e GC-C) em mesma célula. Por outro lado, a existência de outros sítios celulares com afinidades distintas (não necessariamente os mesmos sítios) para uroguanilina e guanilina explicaria o paradoxo de aparente "downregulation", ocorrido para uroguanilina mais ANP/urodilatina.

Os estudos com radioligantes empregando  $^{125}\text{I}$ -STa marcada, identificaram dois estados diferentes da afinidade para os receptores de STa (Crane et al, 1992). Segundo Crane, houve correlação entre a ativação do GC e o estado de menor atividade do receptor para a STa. Dois sítios de ligação da membrana celular com cinéticas diferentes para STa foram identificados também em células de carcinoma de cólon humano T84 (Forte et al, 1993). Desde que ANP ou urodilatina influenciaram, da mesma forma, as ações da guanilina, foram confirmadas as evidências correntes que ambos os peptídeos ativam grupo comum dos receptores acoplados à GC-A (Goetz et al, 1990.).

RNA<sub>m</sub> de receptores GC-A são encontrados somente no glomérulo e nos ductos coletores medulares internos (IMCD) dos néfrons de bovinos (Yamamoto et al, 1994). Entretanto, há várias evidências moleculares e funcionais de efeitos de ANP ou da expressão de GC-A em outros segmentos tubulares, células tubulares proximais, como revisto por Harris (Harris et al, 1996). Quando injetada EV,  $^{125}\text{I}$ -guanilina liga a muitos segmentos no rim do rato, incluindo túbulos proximais e o IMCD (Furuya et al, 1997.). Assim, os receptores dos peptídeos natriuréticos e os receptores de guanilina/STa podem ocorrer junto e podem interagir em células dos túbulos proximais e em zonas de medula renal.

Os resultados observados no clearance osmolar sugerem que estas interações ocorrem na parte final dos túbulos distais ou ductos coletores, uma vez que, vasopressina não foi colocada no sistema.

Aumentos significativos na excreção de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Cl}^-$  foram observados para os grupos de guanilina pre-tratados com ANP/urodilatina. Os resultados descritos para a guanilina e a uroguanilina na dose descrita e nos parâmetros medidos nesta preparação do órgão são semelhantes àqueles descritos por Fonteles (Fonteles et al, 1998) quando as concentrações similares da guanilina e da uroguanilina foram adicionadas ao sistema de perfusão no ensaio de rim isolado de rato. Kirchoff e os colegas de trabalho descreveram natriurese significativa de rins perfundidos isolados do rato após o tratamento, seguindo com urodilatina e ANP em concentrações mais elevadas (Kirchoff et al, 1994). Utilizamos doses sublimiáres destes peptídeos no estudo atual para sondar efeito de *priming* e não para estudar



efeitos farmacológicos. O sinergismo entre ANP/urodilatina com guanilina e o bloqueio dos efeitos renais da uroguanilina por ANP/urodilatina, refletido no fluxo urinário, no %TNa<sup>+</sup>, %TK<sup>+</sup>, %TCl<sup>-</sup>, %ENa<sup>+</sup>, %EK<sup>+</sup>, %ECI<sup>-</sup> e na Cosm observadas, não podem ser completamente compreendidos com base no estado atual do conhecimento, mais ainda que os peptídeos da guanilina são tidos por agirem nos mesmos receptores e por compartilharem da mesma via de sinalização - GMPc. Nós formulamos duas hipóteses para estes achados. Primeiramente, ANP/urodilatina poderiam alterar a conformação do receptor de STa/guanilina no rim, conferindo maior afinidade para guanilina, e menor afinidade para a uroguanilina, uma vez que, os estados diferentes de afinidade foram relatados para o receptor de guanilina/ST, sabendo-se ainda que receptores para ANP/urodilatina e o receptor de guanilina/STa ocorrem junto em algumas células renais, possivelmente na medula renal. Outra hipótese seria que subtipos diferentes dos receptores com afinidades distintas para guanilina e uroguanilina poderiam existir, de sorte que algum subtipo poderia interagir diferentemente com ANP/urodilatina. Mann e colegas de trabalho identificaram um novo receptor para STa nas células IEC-6 intestinal que não ativa o GC-C. Entretanto, o significado fisiológico deste receptor permanece obscuro (Mann et al, 1993.). É importante considerar que a uroguanilina, mas não a guanilina, é encontrada na urina de mamíferos, sugerindo por sua vez que a guanilina deve ser clivada por proteases renais, produzindo peptídeos derivados com estrutura e bioatividade desconhecidas. Apesar dos mecanismos obscuros destas interações, este estudo tem conseqüências fisiopatológicas importantes nos estados em que os níveis séricos e/ou de excreção urinária destes peptídeos encontram-se alterados e correlacionam-se com desequilíbrios hidroeletrólíticos, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal aguda (Drummer et al, 1997; Kentsch et al, 1992; Stevens et al, 1996) Conseqüentemente, estes achados interessantes podem abrir novas vias para compreensão de como os peptídeos natriuréticos podem interagir para regular a homeostase da função renal, do sal e da água, bem como, há influência do cross-talking entre tipos diferentes de receptores ligados à GC.

## 8. CONCLUSÃO

Baixas doses (0,3 µg) de guanilina não induzem alterações funcionais no modelo de rim isolado e perfundido de rato, ao passo que uroguanilina (em dose similar) apresenta natriurese e caliurese significativas. Estes resultados são coerentes se comparados aos dados disponíveis na literatura atual.

Quimostatina induziu significativas alterações vasculares no modelo de rim isolado e perfundido de rato, porém não apresentou potencial nefrotóxico na dose experimental ideal preconizada;

Quimostatina não interferiu nas funções tubulares renais do referido modelo, caracterizando-se assim como excelente ferramenta farmacológica para estudo do metabolismo renal de peptídeos;

Sem exibir potencial nefrotóxico, o BTCI (black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor), na dose equimolar à de quimostatina, mostrou-se mais potente e rápido que a mesma em interferir com todos os parâmetros de função renal no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato.

Verificamos que baixas doses do ANP e da urodilatina não produzem efeitos natriuréticos, caliuréticos ou vasodilatadores no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato. Estas observações condizem com dados disponíveis na literatura atual.

Uma vez protegida do ataque de proteases renais, guanilina apresenta natriurese e caliurese potencializadas a valores obtidos com uroguanilina no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato.

Doses sublimiáres de ANP e urodilatina apresentam sinergismo potencial com guanilina para indução de natriurese e caliurese no modelo experimental de rim isolado e perfundido do rato. Paradoxalmente, nas mesmas doses, uroguanilina tem sua caliurese e natriurese antagonizadas por ANP e urodilatina.

Este trabalho abre novas perspectivas e implicações para os peptídeos natriuréticos na compreensão da homeostase de fluidos e eletrólitos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Biek D.P. and Cohen S.N.: Identification and characterization of recD, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 167(2):594-603, 1986;
- 2 Borke J.L., Jackson W.J., Costoff A., Meyer D.C., Ginsburg J.M., Nosek T.M., Godt R.E., Ogle T.F., Hofman W.F. and Stoney-Jr. S.D.: *Essencial of human physiology - a multimedia resource*. Medical College of Georgia, 1996;
- 3 Bowman R.H. and Maack T.E.: Effect of albumin concentration and ADH on H<sub>2</sub>O and electrolyte transport in perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 226:426-430, 1974;
- 4 Bowman R.H.: Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J. Biol. Chem.* 245:1604-1612, 1970;
- 5 Brown B.L., Walker S.W. and Tomlinson S.: Calcium calmodulin and hormone secretion. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*;23(2):201-18, 1985;
- 6 Busa W.B.: Roles for the phosphatidylinositol cycle in early development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 320(1199):415-26, 1988;
- 7 Carey R.M.: Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man: lack of dependence upon aldosterone. *Circ. Res.* 43: 19-23, 1978;
- 8 Carpick B.W. and Garipey J.: The *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is a long-lived superagonist of guanylin. *Infect. Immun.* 61: 4710-4715, 1993;
- 9 Cetin Y., Kuhn M., Kulaksiz H., Adermann K., Bargsten G., Grube D. and Forssmann W.G.: Enterochromaffin cells of the digestive system: cellular source of guanylin, a guanylate cyclase-activating peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 12;91(8):2935-2939, 1994;

- 10 Crane M.R., Hugues M., O'Hanley P.D. and Waldman S.A.: Identification of two affinity states of low affinity receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: correlation of occupation with lower affinity state with guanylate cyclase activation. *Mol. Pharmacol.* 41, 1073-80, 1992;
- 11 Currie M.G., Fok K.F., Kato J., Moore R.J., Hamra F.K., Duffin K.L. and Smith C.E.: Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:947-951, 1992;
- 12 de Bold A.J.: Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60(3):324-30, 1982;
- 13 de Freitas S.M., de Mello L.V., da Silva M.C., Vriend G., Neshich G. and Ventura M.M.: Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. *FEBS Lett.* 409(2):121-7, 1997;
- 14 de Sauvage F. J., Camerato T. R. and Goeddel D. V.: Primary structure and functional expression of human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 266: 22683-690, 1991;
- 15 de Sauvage F.J., Keshav S., Kuang W.J., Gillett N., Henzel W. and Goeddel D.V.: Precursor structure' expression' and tissue distribution of human guanylin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(19):9089-93, 1992;
- 16 Drewett J.G. and Garbers D. L.: The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr. Rev.* 15: 135-162, 1994;
- 17 Drummer C., Fiedler F., Koning A. and Gerzer R.: Urodilatin, a kidney-derived natriuretic factor, is excreted with a circadian rhythm and is stimulated by saline infusion in man. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1 (9): 1109-1113, 1991;
- 18 Drummer C., Franck W., Heer M., Forssmann W.G., Gerzer R. and Goetz K.: Postprandial natriuresis in humans: further evidence that urodilatin, not ANP, modulates sodium excretion. *Am. J. Physiol.* 270: F301-F310, 1996;

- 19 Drummer C., Kentsch M., Otter W., Heer M., Herten M. and Gerzer R.: Increased renal natriuretic peptide (urodilatin) excretion in heart failure patients. *Eur. J. Med. Res.* 2:8, 347-54, 1997;
- 20 Elliott D.C.: *Data for Biochemical Research*, 3rd Ed., Dawson Editores, R.M.C., (Clarendon Press) pp. 328-329, 1987;
- 21 Fan X.H., Hamra F.K., Eber S.L., Smith C.E., Currie M.G., Freeman R.H. and Forte L.R.: Purification and properties of uroguanylin from rat urine. *FASEB J.* 9: A6, 1995;
- 22 Fan, X., Hamra F.K., Freeman R.H., Eber S.L., Krause W.J., Lim R.W., Pace V.M., Currie M.G. and Forte L.R. Uroguanylin: Cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and prouroguanylin from plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 457-462, 1996;
- 23 Fasano A: *Cellular Microbiology: How Enteric Pathogens Socialize with Their Intestinal Host.* *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 26(5):520-532, 1998;
- 24 Feinstein G., Malemud C.J. and Janoff A.: The inhibition of human leucocyte elastase and chymotrypsin-like protease by elastatinal and chymostatin. *Biochem. Biophys. Acta.* 429(3):925-32, 1976;
- 25 Field M., Graf-Jr L.H., Laird W.J. and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2800-2804, 1978;
- 26 Flynn T.G., de Bold M.L. and de Bold A.J.: The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28;117(3):859-65. 1983;
- 27 Fonteles M.C. and Lima A.A.M. Functional Comparison of Kidney: Perfused with fatty acid-free and rich albumin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 15 (4-5): 296, 1982;

- 28 Fonteles M.C., Cohen J.J., Black A.J. and Wertheim S.J.: Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.* 244: F235-F246, 1983;
- 29 Fonteles M.C., Greenberg R.N., Monteiro H.S.A., Currie M.G. and Forte L.R.: Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 275: F191-F197, 1998;
- 30 Fonteles M.C., Helleguarch A., Pirotzky E., Viossat I., Braquet P. and Chabrier, E.: Um fator imunologicamente semelhante ao ANF no rim perfundido de coelho. *FESBE.* 134: resumos, 1989;
- 31 Fonteles M.C., Monteiro H.S.A., Soares A.M., Santos-Neto M.S., Greenberg R.N. and Lima A.A.M.: Lysine-1 Analog of guanylin induces intestinal secretion and natriuresis in the isolated perfused kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:75-79, 1996;
- 32 Fonteles M.C., Villar-Pallasi C., Fang G., Larner J. and Guerrant R.L.: Partial characterization of an ANF/Urodilatin-like substance released from perfused rabbit kidney under hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 75-79, 1993;
- 33 Fonteles M.C., Viossat I., Helleguarch A., Chabrier E., Braquet P. and Pirotzky E.: The presence of ANF like material in the perfused rabbit kidney. XIth International Congress of Pharmacology-Amsterdam, *Eur. J. Pharmacol.* 183: 838-839, 1990;
- 34 Forte L. R. and Currie M. G.: Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *The FASEB J.* 9: 643. 650, 1995;
- 35 Forte L.R. and Hamra R.H.: Guanylin and Uroguanylin: Intestinal peptides hormones that regulate epithelial transport. *News Physiol. Sci.* 11: 17-24, 1996;
- 36 Forte L.R., Eber S.L., Turner J.T., Freeman R.H., Fok K.F. and Currie M.G.: Guanylin stimulation of Cl<sup>-</sup> secretion in human intestinal T84 cells via cyclic guanosine monophosphate. *J. Clin. Invest.* 91: 2423-2428, 1993

- 37 Forte L.R., Krause W.J. and Freeman R.H.: *Escherichia coli* enterotoxin receptors: localization in opossum kidney, intestine and testis. *Am. J. Physiol.* 227: F874-F881, 1989;
- 38 Forte L.R., Krause W.J. and Freeman R.H.: Receptors and cGMP signalling mechanism for *E. coli* enterotoxin in opossum kidney. *Am. J. Physiol.* 225: F1040-F1046, 1988;
- 39 Furuya S., Naruse S., Ando E., Nokihara K. and Hayakawa T.: Effect and distribution of intravenously injected <sup>125</sup>I-guanylin in rat kidney examined with high-resolution light microscopic radioautography. *Anat. Embryol. (Berl)* 193(3): 185-93, 1997
- 40 Garbers D.L.: Guanylate cyclase receptor family. *Recent Prog. Horm. Res.* 46:85-96; discussion 96-7, 1990;
- 41 Garbers D.L.: The guanylyl cyclase receptor family. *New Biol.* 2(6):499-504, 1990;
- 42 Garcia K.C., de Sauvage F.J., Struble M., Henzel W., Reilly D. and Goeddel D.V.: Processing and characterization of human proguanylin expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268(30):22397-401, 1993;
- 43 Gilman A.G.: G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep* Apr;15 (2):65-97, 1995;
- 44 Gilman A.G.: Nobel Lecture. G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615 – 649, 1987;
- 45 Gilman A.G.: The Albert Lasker Medical Awards. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *JAMA* Oct 6;262 (13):1819-25, 1989;
- 46 Globits S., Frank H., Pacher B., Huelsmann M. and Pacher R.: Atrial Natriuretic Peptide Release Is More Dependent on Atrial Filling Volume Than on Filling Pressure in Chronic Congestive Heart Failure. *Am. Heart J.* 135 (4):592-597, 1998;

- 47 Goetz K.L., Drumm J.L., Leadley R., Fiedler F. and Gerzer R.: Evidences that urodilatin, rather than ANP regulates renal sodium excretion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 867-74, 1990;
- 48 Greenberg R.N., Hill M., Crytzer J., Krause W.J., Eber S.L., Hamra F.K., Forte L.R.: Comparison of effects of uroguanylin' guanylin' and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J. Investig. Med.* 45(5):276-82, 1997;
- 49 Guba, M., Kuhn M., Forssmann W. G., Classen M., Gregor M. and Seidler U.: Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion: Proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology* 111: 1558-1568, 1996;
- 50 Guyton A.C. and Hall J.E.: *Textbook of Medical Physiology*, 9<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, chapter 1: Functional Organization of the Human Body and Control of the "Internal Environment", pp 03-09, 1996-a;
- 51 Guyton A.C. and Hall J.E.: *Textbook of Medical Physiology*, 9<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, chapter 65: Digestion and Absorption in the Gastrointestinal Tract, pp 833-843, 1996-b;
- 52 Guyton A.C. and Hall J.E.: *Textbook of Medical Physiology*, 9<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, chapter 26: Urine Formation by the Kidneys: I Glomerular Filtration, Renal Blood Flow and Their Control, pp 315-329, 1996-c;
- 53 Guyton A.C. and Hall J.E.: *Textbook of Medical Physiology*, 9<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, chapter 27: Urine Formation by the Kidneys: II Tubular Processing of the Glomerular Filtrate, pp 331 - 347, 1996-d;
- 54 Guyton A.C. and Hall J.E.: *Textbook of Medical Physiology*, 9<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, Chapter 9: Heart Muscle, The Heart as a Pump, pp 107 - 120; 1996-e;



- 55 Guyton A.C. and Hall J.E.: Textbook of Medical Physiology, 9<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, Chapter 8: Contraction and Excitation of Smooth Muscle, pp 95 - 108, 1996-f;
- 56 Guyton A.C. and Hall J.E.: Textbook of Medical Physiology, 9<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company, chapter 4: Transport of Ions and Molecules Through the cell Membrane, pp 43-54, 1996-g;
- 57 Guyton A.C.: Renal function curves and control of body fluids and arterial pressure. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 591:107-13, 1990;
- 58 Hamra F.K., Fan X., Krause W.J., Freeman R.H., Chin D.T., Smith C.E., Currie M.G., Forte L.R.: Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure, and modulation of bioactivity by proteases. *Endocrinology.* 137(1):257-265, 1996-a;
- 59 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.R. and Currie M.G.: Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10464-10468, 1993;
- 60 Hamra F.K., Krause W.J., Smith C.E., Freeman R.H., Currie M.G. and Forte L.R.: Colonic mucosa of the opossum contains uroguanylin and guanylin peptides. *Am. J. Physiol.* 270: G708-G716, 1996-b;
- 61 Hardman J.G., Limbird L., Molinoff P.B., Ruddon R.W. and Gilman A.G.: Goodman & Gilman's Pharmacological Basis Therapeutics, 9th Edition, Publisher: McGraw-Hill CD-ROM: 0-07-864186-1, 1996
- 62 Harris P.J., Hiranyachattada S., Antoine A.M., Walker L., Reilly A.M. and Eitle E.: Regulation of sodium transport by angiotensin II and atrial natriuretic factor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.*, 3: 5112-18, 1996;

- 63 Hess R., Kuhn M., Schulz-Knappe P., Raida M., Fuchs M., Klodt J., Adermann K., Kaever V., Cetin Y. and Forssmann W.-G.: GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett* 374: 34-38, 1995;
- 64 Hill O., Cetin Y., Cieslak A., Magert H.-J. and Forssmann W.-G.: A new human guanylate cyclase-activating peptide (uroguanylin): precursor cDNA and colonic expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1253: 146-149, 1995;
- 65 Hirayama T., Wada A., Hidaka Y., Fujisawa J., Takeda Y. and Shimonishi Y.: Expression of a truncated guanylate cyclase (GC-C), a receptor for heat-stable enterotoxin and its dimer formation in CSO-7 cells. *Microb. Pathog.* 15: 283-291, 1993;
- 66 Hope R.A., Longmore J.M., Moss P.A.H. and Warrens A.N. *Oxford Manual de Clínica Médica*, 2<sup>a</sup> edição, Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda, Capítulo 6: Doenças Infeciosas, pp 170. 253, 1994;
- 67 Johnson M.D.: Relative natriuretic activities of synthetic atriopeptins I, II and III. *Life Sci*: 20;38(3):225-31, 1986;
- 68 Katzung B.G.: *Farmacologia Básica e Clínica*, 5<sup>a</sup> edição, Editora Guanabara Koogan S.A., capítulo 2: Receptores Farmacológicos e Farmacodinâmica, pp 8 a 26, 1994-a;
- 69 Katzung B.G.: *Farmacologia Básica e Clínica*, 5<sup>a</sup> edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Capítulo 19: Broncodilatadores e Outros Agentes Utilizados na Asma, pp 209 a 220, 1994-b;
- 70 Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Nakafuku M. and Satoh T.: Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 60:349-400, 1991;
- 71 Kentsch M., Ludwig D., Drummer C., Gerzer R. and Muller-Esch G.: Haemodynamic and renal effects of urodilatin bolus injection in patients with congestive heart failure. *Eur. J. Clin. Invest.* 22: 662-69, 1992;

- 72 Kida O., Kondo K., Tanaka K.: Natriuretic and hypotensive effects of chronically administered alpha-human atrial natriuretic polypeptide in sodium-deplete or replete conscious spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens. Suppl.* Dec;4(6):S529-31, 1986;
- 73 Kinoshita H., Fujimoto S., Nakazato M., Yokota N., Date Y., Yamaguchi H., Hisanaga S., Eto T.: Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases. *Kidney Int.*52(4):1028-1034, 1997;
- 74 Kirchoff K., Bub A., Marxen P. and Frossman W-G.: Urodilatin inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused rat kidney. *Exp. Nephrol.* 2, 6 : 231-7, 1994;
- 75 Kita T., Smith C.E., Fok K.F., Duffin K.L., Moore W.M., Karabotsos P.J., Kachur J.F., Hamra F.K., Pidhorodeckyj N.V., Forte L.R. and Currie M.G.: Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am. J. Physiol.* 266: F342-F348, 1994;
- 76 Knoop F.C. and Owens M.: Pharmacologic action of Escherichia coli heat-stable (STa) enterotoxin. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 28(2):67-72, 1992-a;
- 77 Koesling D., Bohme E. and Schultz G.: Guanylyl-cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* 5(13): 2785-91, 1992-b;
- 78 Krause W.J., Freeman R.H. and Forte L.R.: Autoradiographic demonstration of specific binding sites for E. coli enterotoxin in various epithelia of the North American opossum. *Cell Tissue Res.* 260: 387-394, 1990;
- 79 Krause W.J., Freeman R.H., Eber S.L., Hamra F.K., Fok K.F., Currie M.G. and Forte L.R.: Distribution of Escherichia coli heat-stable enterotoxin/ guanylin/ uroguanylin receptors in the avian intestinal tract. *Acta. Anat. (Basel)*;153(3):210-219, 1995;
- 80 Kuhn M, Raida M., Adermann K., Schulz-Knappe P., Gerzer R., Heim J.-M. and Forssman W.-G.: The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). *FEBS Lett.* 318: 205-209, 1993;

- 81 Kuhn M., Kulaksiz H., Adermann K., Rechkemmer G. and Forssmann W.G.: Radioimmunoassay for circulating human guanylin. FEBS Lett, 341(2-3):218-22, 1994;
- 82 Laney-Jr D.W., Bezerra J.A., Kosiba J.L., Degen S.J. and Cohen M.B.: Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. Am. J. Physiol. 266(5 Pt 1):G899-906, 1994;
- 83 Laskowski Jr.M. and Kato I.: Protein Inhibitor of Preteinases. Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626, 1980;
- 84 Laychock S.G.: Coordinate interactions of cyclic nucleotide and phospholipidmetabolizing pathways in calcium-dependent cellular processes. Curr. Top Cell Regul. 30:203-42, 1989;
- 85 Lee K.A.: Transcriptional regulation by cAMP. Curr. Opin. Cell Biol. 3(6):953-9 1991;
- 86 Lennane R.J., Peart W.S., Carey R.M. and Shaw J.: A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. Clin. Sci. Mol. Med. 49: 433-436, 1975;
- 87 Levin E.R.: Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. Am. J. Physiol. 264 :4 Pt 1, E483-89, 1993;
- 88 Lima A.A.M. and Fonteles M.C.: Efeitos das toxinas do *V. cholerae* e da *E. coli* no rim perfundido. XVIII Congresso Brasileiro de Fisiologia. S-31, p. 46, São Lourenço, MG - 1983;
- 89 Lima A.A.M., Monteiro H.S.A. and Fonteles M.C.: The effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. Pharmacol. Toxicol. 70: 163-167, 1992;

- 90 Linder M.E. and Gilman A.G.: G Proteins: Tucked into the internal surface of the cell's outer membrane, these versatile molecules coordinate cellular responses to a multitude of signals that impinge from without. *Sci. Am.* 56 - 65, 1992;
- 91 Mann E.A., Cohen M.B. and Gianella R.A.: Comparison of receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: novel receptor present in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.* 264.(Gastrointest. Liver Physiol. 27): G172-178, 1993;
- 92 Mann E.A., Cohen M.B. and Gianella R.A.: Comparison of receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: novel receptor present in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.* 264.(Gastrointest. Liver Physiol. 27): G172-178, 1993;
- 93 Martinez-Maldonado M. and Opava-Stitzer S.: Free water clearance curves during saline, manitol, glucose and urea. *J. Physiol.* 280: 487-497, 1978;
- 94 McKenzie J.C., Tanaka I., Misono K.S. and Inagami I.: Immunohistochemical localization atrial natriuretic factor in the kidney adrenal medulla, pituitary and atrium of rat. *J. Histochem. Cytochem.* 78: 1-5, 1985;
- 95 Millul V., Ardailou N., Placier S., Baudouin B. and Ronco P.M.: Receptors for natriuretic peptides in a human cortical collecting duct cell line. *Kidney Int.* 51:1, 281-87, 1997;
- 96 Miyazato M., Nakazato M., Matsukura S., Kangawa K. and Matsuo H.: Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra-gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.* 398: 170-174, 1996-a;
- 97 Miyazato M., Nakazato M., Yamaguchi H., Date Y., Kojima M., Kangawa K., Matsuo H. and Matsukura S.: Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 644-648, 1996-b;
- 98 Morhy L. and Ventura M. M.: The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata (L.) Walp.* seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Bras. Cienc.* 59(1-2):71-81, 1987;

- 99 Murray R.: Rehydration strategies--balancing substrate, fluid, and electrolyte provision. *Int. J. Sports Med.* 19 Suppl. 2:S133-5, 1998;
- 100 Neer E.J. and Clapham D.E.: Roles of G protein subunits in transmembrane signaling. *Nature (England)* 333, 129-134, 1988;
- 101 Northup J.K., Smigel M.D., Sternweis P.C. and Gilman A.G.: The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution of the activated 45,000-dalton (alpha) subunit. *J. Biol. Chem.* 258(18):11369-76, 1983-a;
- 102 Northup J.K., Sternweis P.C. and Gilman A.G.: The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution, activity, and properties of the 35,000-dalton (beta) subunit. *J. Biol. Chem.* 258(18):11361-8, 1983-b;
- 103 Northup J.K., Sternweis P.C., Smigel M.D., Schleifer L.S., Ross E.M. and Gilman A.G.: Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(11):6516-20, 1980;
- 104 O'Grady S.M., Palfrey H.C. and Field M.: Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial tissues. *Am. J. Physiol.* 253(2 Pt 1):C177-92, 1987;
- 105 Parkinson S.J., Carrithers S.L. and Waldman S.A.: Opposing adenine nucleotide-dependent pathways regulates guanylyl cyclase C in the rat intestine. *J. Biol. Chem.* 269: 22683-22690, 1994;
- 106 Powell D.W., Berschneider H.M., Lawson L.D. and Martens H.: Regulation of water and ion movement in intestine. *Ciba Found Symp.* 112:14-33, 1985;
- 107 Riordan J.R.: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 609-630, 1993;
- 108 Ross E.M. and Gilman A.G.: Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* 49:533-64,1980;
- 109 Ross E.M.: Physical separation of the catalytic and regulatory proteins of hepatic adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 256(4):1949-53 1981;

- 110 Ross, E. M., Howlett, A. C., Ferguson, K. M., and Gilman, A. G.: Reconstitution of hormone-sensitive adenylate cyclase activity with resolved components of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 253, 6401-6412, 1978;
- 111 Santos-Neto M. S., Oliveira A.V., Greenberg R., Monteiro H.S.A. e Fonteles M.C.: Ações da guanilina no rim perfundido. Resumos da IX Reunião Anual das Federações das Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, M.G, p 144, 1994-a;
- 112 Santos-Neto M.S., Carvalho A.F., Silva A.C., Forte, L.R. and Fonteles M.C.: Excreção de sódio e cloreto induzidas pela guanilina são potencializadas pela quimostatina – inibidor de protease. Resumos do VI Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão, Rio de Janeiro – RJ; Resumos da XII Reunião Anual de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, Caxambú – MG, 1997;
- 113 Santos-Neto M.S., Oliveira A.V., Greenberg R., Monteiro H.S.A. and Fonteles M.C.: Curva dose-resposta sigmóide de guanilina em perfusão renal. Resumos do XIII Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, p 161, Fortaleza, Ce., 1994-b;
- 114 Satoh T., Cohen H.T. and Katz A.I.: Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. I. Role of cyclic AMP and phospholipase A2. *J. Clin. Invest.* 89(5):1496-500, 1992;
- 115 Saville M.A., Geer P.G., Wang B.C., Leadly-Jr. R.J. and Goetz K.L.: A high salt meal produces natriuresis in humans without elevating atriopeptin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188: 389-393, 1988;
- 116 Schultz S., Chrisman T. D. and Garbers D. L.: Cloning and expression of guanylin. its existence in various mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 267: 16019. 16021, 1992;
- 117 Schulz S., Green C.K., Yuen P.S.T. and Garbers D.L.: Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63: 941-948, 1990;

- 118 Sigma Product Information Sheet, Sigma quality control data: chymostatin (Sigma Prod. No. C7268, CAS NUMBER: 9076-44-2), <http://www.sigma-aldrich.com/> 1998;
- 119 Singh S, Singh G, Heim J-M. and Gerzer R.: Isolation and expression of a ganylate cyclase-coupled heat-stable enterotoxin receptor cDNA from a human colonic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1455-1463, 1991;
- 120 Snipes R.L.: Intestinal absorptive surface in mammals of different sizes. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 138:III-VIII, 1-90, 1997;
- 121 Soares A.M., Santos-Neto M.S. and Lima A.A.M.: Comparação da Secreção Intestinal do Análogo Lys-1 Guanilina e Enterotoxina Termo Estável da *Escherichia coli* em Mucosa Ileal Isolado de Coelho. Resumos da IX Reunião Anual das Federações das Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, M.G., 1994;
- 122 Sternweis P.C., Northup J.K., Hanski E., Schleifer L.S., Smigel M.D. and Gilman A.G.: Purification and properties of the regulatory component (G/F) of adenylate cyclase. *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.* 14:23-36, 1981-a;
- 123 Sternweis P.C., Northup J.K., Smigel M.D., Gilman A.G.: The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 256(22):11517-26, 1981-b;
- 124 Stevens F.C.: Calmodulin: an introduction. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61(8):906-10, 1983;
- 125 Stevens T.L., Rasmussen T.E., Wei C.M., Kinoshita M., Matsuda Y. and Burnett-Jr. J.C.: Renal role of the endogenous natriuretic peptide system in acute congestive heart failure. *J. Card. Fail.* 2:2, 119-25, 1996.;
- 126 Tatsuta K., Mikami N., Fujimoto K., Umezawa S. and Umezawa H.: The structure of chymostatin, a chymotrypsin inhibitor. *J. Antibiot.* 26(11):625-46, 1973;
- 127 Taylor W.: The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem. J.* 272, 1-13, 1990;



- 128 Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Kunimoto S. and Matsuzaki M.: Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* 23(8): 425-427, 1970;
- 129 Vaandrager A.B., Schulz S., de Jonge, H.R. and Garbers D.L.: Guanylyl cyclase C is a N-linked glycoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *J. Biol. Chem.* 268: 2174-2179, 1993-a;
- 130 Vaandrager A.B., van der Wiel E., Hom M.L., Luthjens L.H. and de Jonge HR: Heat-stable enterotoxin receptor/guanylate cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalent linged in the intestine. *J. Biol. Chem.* 269: 16409-16415, 1994;
- 131 Vaandrager A.B., van der Wiel, E. and de Jonge H.R.: Heat-stable enterotoxin activation of immunepurified guanylate cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 268: 19598-19603, 1993-b;
- 132 Valentin J.P. and Humphreys H.: Urodilatin: a paracrine renal natriuretic peptide. *Semin. Nephrol.* 13 (1): 61-70, 1993;
- 133 Valentin J.P., Sechi L.A., Qiu C., Schambelan M. and Humphreys M.H.: Urodilatin binds to and activates renal receptors for atrial natriuretic peptide. *Hypertension*, 21: 432-438, 1993-b;
- 134 Wada A., Hirayama T., Kitao S., Fujisawa J., Hidaka Y. and Shimonishi Y.: Pig intestinal membrane-bound receptor (ganylate cyclase) for heat-stable enterotoxin: cDNA cloning, functional expression, and characterization. *Microbiol. Immunol.* 38: 535-541, 1994;
- 135 Watson D.W. and Sodeman-Jr. W.A.: *Pathologic Physiology: Mechanisms of Disease*, 6<sup>th</sup> edition, T. M. Sodeman Company, Chapter: The Smal Intestine, pp 824, 1979;
- 136 Way L.W.: *Surgical Diagnosis & Treatment*, 10<sup>a</sup> edição, Editora Appleton & Lange, Chapter 9: Fluid & Electrlyte Management, pp 129. 142, 1994;

- 137 Whitaker T.L., Steinbrecher K.A., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A. and Cohen M.B.: The uroguanylin gene (*Guca1b*) is linked to guanylin (*Guca2*) on mouse chromosome 4. *Genomics*. 45(2):348-354, 1997-a;
- 138 Whitaker T.L., Witte D.P., Scott M.C. and Cohen M.B.: Uroguanylin and guanylin: distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine. *Gastroenterology*. 113(3):1000-6, 1997-b;
- 139 Wiegand R.C., Kato J. and Currie M.G.: Rat guanylin cDNA: characterization of the precursor of an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 812-817, 1992-a;
- 140 Wiegand R.C., Kato J., Huang M.D., Fok K.F., Kachur J.F. and Currie M.G.: Human guanylin: cDNA isolation, structure, and activity. *FEBS Lett.* 311:150-154, 1992-b;
- 141 Yamamoto T., Feng L., Mizuno T., Hirose S., Kawasaki K., Yaiota E., Kihara I. and Wilson C. B.: Expression of mRNA for natriuretic peptide receptor subtypes in bovine kidney. *Am. J. Physiol.* 267 (2Pt2): F318-24, 1994;
- 142 Ye P., Kanoh M., Zhu W., Laszkiewicz I., Royland J.E., Wiggins R.C. and Konat G.: Cyclic AMP-induced upregulation of proteolipid protein and myelin associated glycoprotein gene expression in C6 cells. *J Neurosci Res* 31(3):578-83, 1992; Biek D.P. and Cohen S.N.: Identification and characterization of *recD*, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 167(2):594-603, 1986;

## 10. APÊNDICE I - ESTATÍSTICA ANALÍTICA DOS EXPERIMENTOS CONTROLES

**Tabela 10-1: Pressão de perfusão aferida da artéria renal (PP; mmHg)**

<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
10	117.4	116.0	120.6
20	116.9	111.1	120.6
30	119.0	116.4	121.0
40	117.4	114.0	120.6
50	117.7	117.4	120.6
60	117.4	114.1	120.6
70	118.7	107.4	120.6
80	119.2	117.4	121.0
90	119.0	112.9	124.0
100	121.7	107.9	127.4
110	115.8	107.9	124.0
120	116.7	107.9	119.3

H = 2.05 com 11 graus de liberdade. (P = 0.9983)

Em virtude do teste de normalidade das amostras ( $P < 0.01$ ), foi aplicado o seguinte teste: One Way Kruskal-Wallis (Análise da Variância).

**Tabela 10-2: Fluxo urinário (FU; ml/g/min)**

<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
10	0.158	0.0426	0.01740
20	0.163	0.0423	0.01726
30	0.140	0.0329	0.01342
40	0.158	0.0440	0.01797
50	0.160	0.0346	0.01414
60	0.177	0.0403	0.01647
70	0.160	0.0200	0.00816
80	0.168	0.0313	0.01276
90	0.185	0.0315	0.01285
100	0.163	0.0320	0.01308
110	0.167	0.0367	0.01498
120	0.172	0.0306	0.01249

(P = 0.831)

Em virtude dos teste de normalidade (P = 0.2890) e da variância (P = 0.9652), foi aplicada a análise da variância one way.

**Tabela 10-3: Ritmo de filtração glomerular (RFG; ml/g/min)**

<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
10	0.710	0.560	0.930
20	0.695	0.590	0.920
30	0.570	0.490	0.750
40	0.680	0.560	0.790
50	0.620	0.560	0.700
60	0.695	0.600	0.790
70	0.530	0.520	0.650
80	0.555	0.530	0.650
90	0.670	0.580	0.870
100	0.600	0.510	0.720
110	0.635	0.470	0.790
120	0.660	0.490	0.770

H = 4.77 com 11 graus de liberdade. (P = 0.9416)

Em virtude do teste de normalidade das amostras (P < 0.01), foi aplicado o seguinte teste: Análise da Variância por classificação One Way Kruskal-Wallis.

**Tabela 10-4: Reabsorção tubular fracionada de sódio (%TNa<sup>+</sup>; %)**

<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
10	79.6	3.76	1.535
20	79.0	2.98	1.217
30	79.6	3.01	1.230
40	80.0	3.82	1.558
50	79.9	2.87	1.171
60	80.6	2.80	1.143
70	79.9	3.68	1.504
80	78.9	4.58	1.872
90	80.6	2.31	0.945
100	80.2	1.86	0.761
110	80.7	2.44	0.995
120	80.1	3.20	1.307

(P = 0.996)

Em virtude dos teste de normalidade (P = 0.2025) e da variância (P = 0.8859), foi aplicada a análise da variância one way.

**Tabela 10-5: Reabsorção tubular fracionada de potássio (%TK<sup>+</sup>; %)**

<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
10	67.3	7.44	3.04
20	66.6	9.99	4.08
30	65.8	9.45	3.86
40	67.7	7.60	3.10
50	62.7	9.24	3.77
60	63.3	8.63	3.52
70	65.0	9.28	3.79
80	64.7	10.34	4.22
90	66.6	11.21	4.58
100	65.5	12.18	4.97
110	65.4	14.02	5.72
120	64.9	13.06	5.33

(P = 1.000)

Em virtude dos teste de normalidade (P = 0. 1573) e da variância (P = 0. 9766), foi aplicada a análise da variância one way.

**Tabela 10-6: Reabsorção tubular fracionada de cloreto (%TCl; %)**

<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
10	79.4	0.361	0.209
20	79.9	1.551	0.895
30	79.3	5.065	2.924
40	80.2	1.756	1.014
50	78.4	2.493	1.439
60	79.0	3.310	1.911
70	80.0	4.420	2.552
80	78.3	4.593	2.652
90	77.2	0.368	0.212
100	77.6	2.927	1.690
110	76.9	3.634	2.098
120	76.7	1.940	1.120

(P = 0. 890)

Em virtude dos teste de normalidade (P = 0. 6320) e da variância (P = 0. 7482), foi aplicada a análise da variância one way.



**Tabela 10-7: Clearance osmolar (Cosm; ml/g/min)**

<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>
10	0.142	0.0483	0.01973
20	0.143	0.0388	0.01585
30	0.118	0.0343	0.01400
40	0.128	0.0331	0.01352
50	0.130	0.0316	0.01291
60	0.142	0.0354	0.01447
70	0.138	0.0214	0.00872
80	0.135	0.0152	0.00619
90	0.152	0.0337	0.01376
100	0.128	0.0306	0.01249
110	0.125	0.0295	0.01204
120	0.137	0.0350	0.01430

(P = 0.917)

Em virtude dos teste de normalidade (P = 0.7072) e da variância ((P = 0.6510), foi aplicada a análise da variância one way.

**Tabela 10-8: Clearance de água livre (C água livre; ml/g/min)**

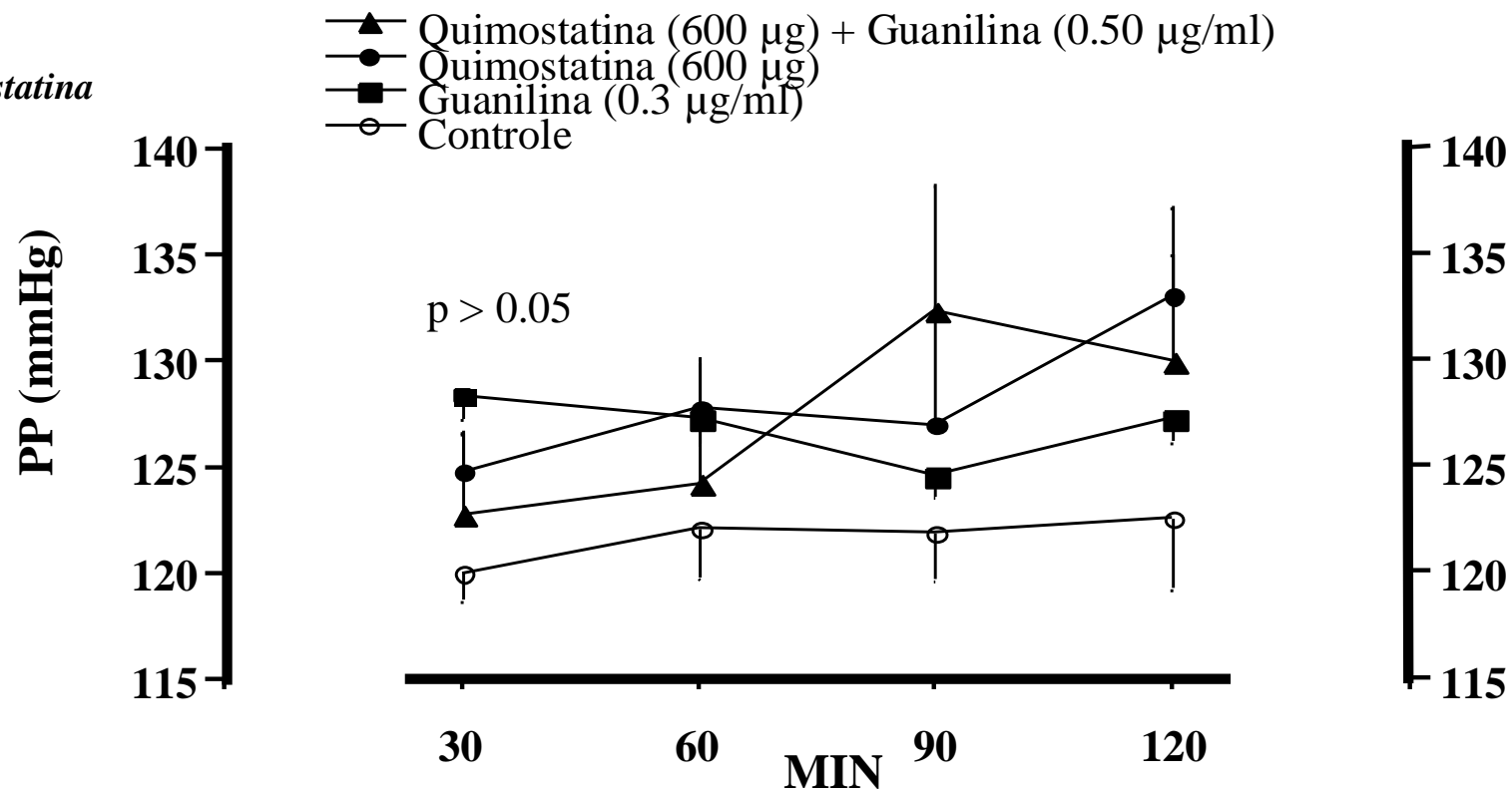
<b>Tempo de Perfusão (min)</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
10	0.0150	0.00	0.0200
20	0.0250	0.01	0.0300
30	0.0200	0.01	0.0300
40	0.0250	0.01	0.0500
50	0.0300	0.01	0.0400
60	0.0450	0.03	0.0500
70	0.0250	0.01	0.0400
80	0.0350	0.03	0.0500
90	0.0350	0.02	0.0500
100	0.0450	0.03	0.0500
110	0.0400	0.02	0.0600
120	0.0350	0.02	0.0500

H = 11.8 com 11 graus de liberdade. (P = 0. 382)

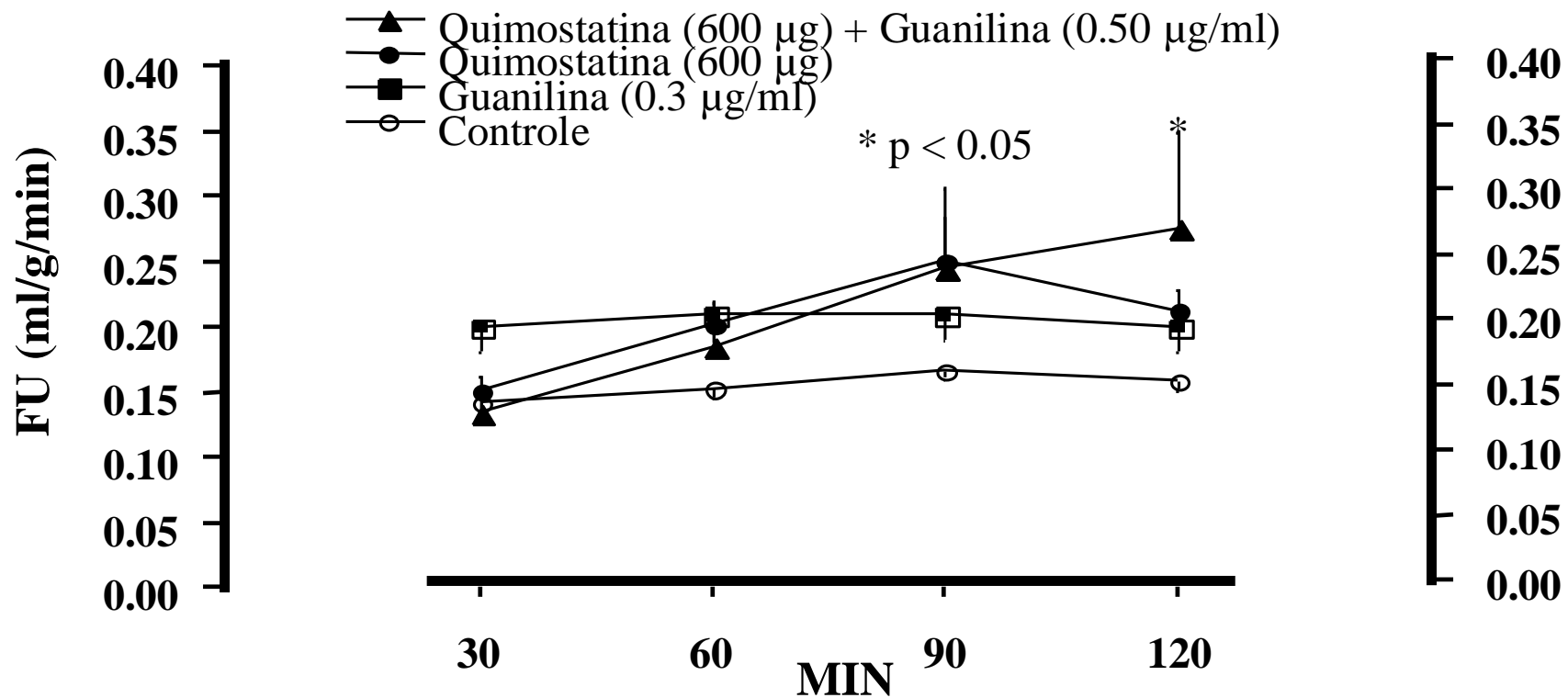
Em virtude do teste de normalidade das amostras (P = 0.0031, ou seja, P < 0.01), foi aplicado o seguinte teste: Análise da Variância por classificação One Way Kruskal-Wallis.

## 11. APENDICE II- GRÁFICOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PROTOCOLADOS

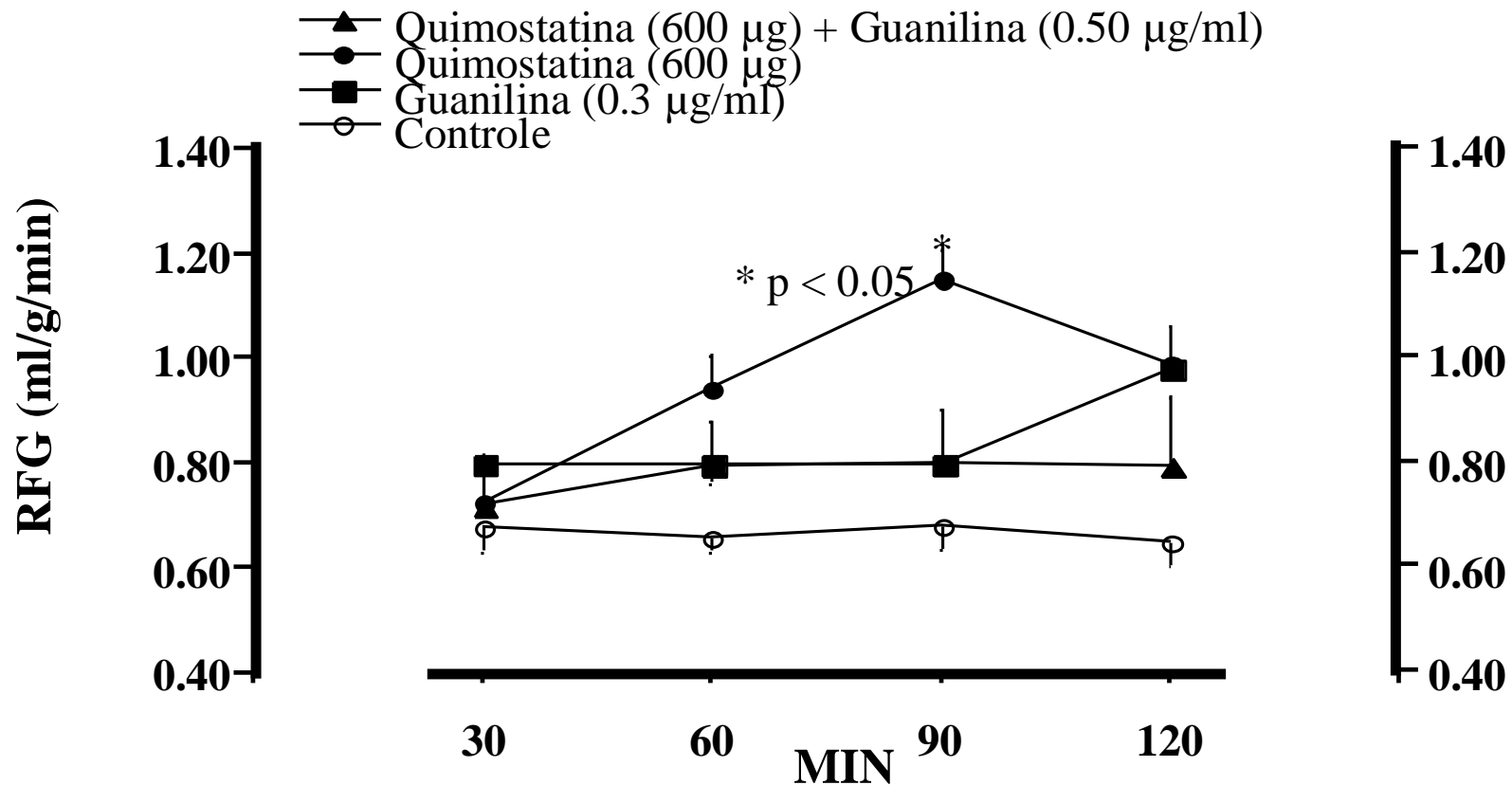
### 11.1. Quimostatina



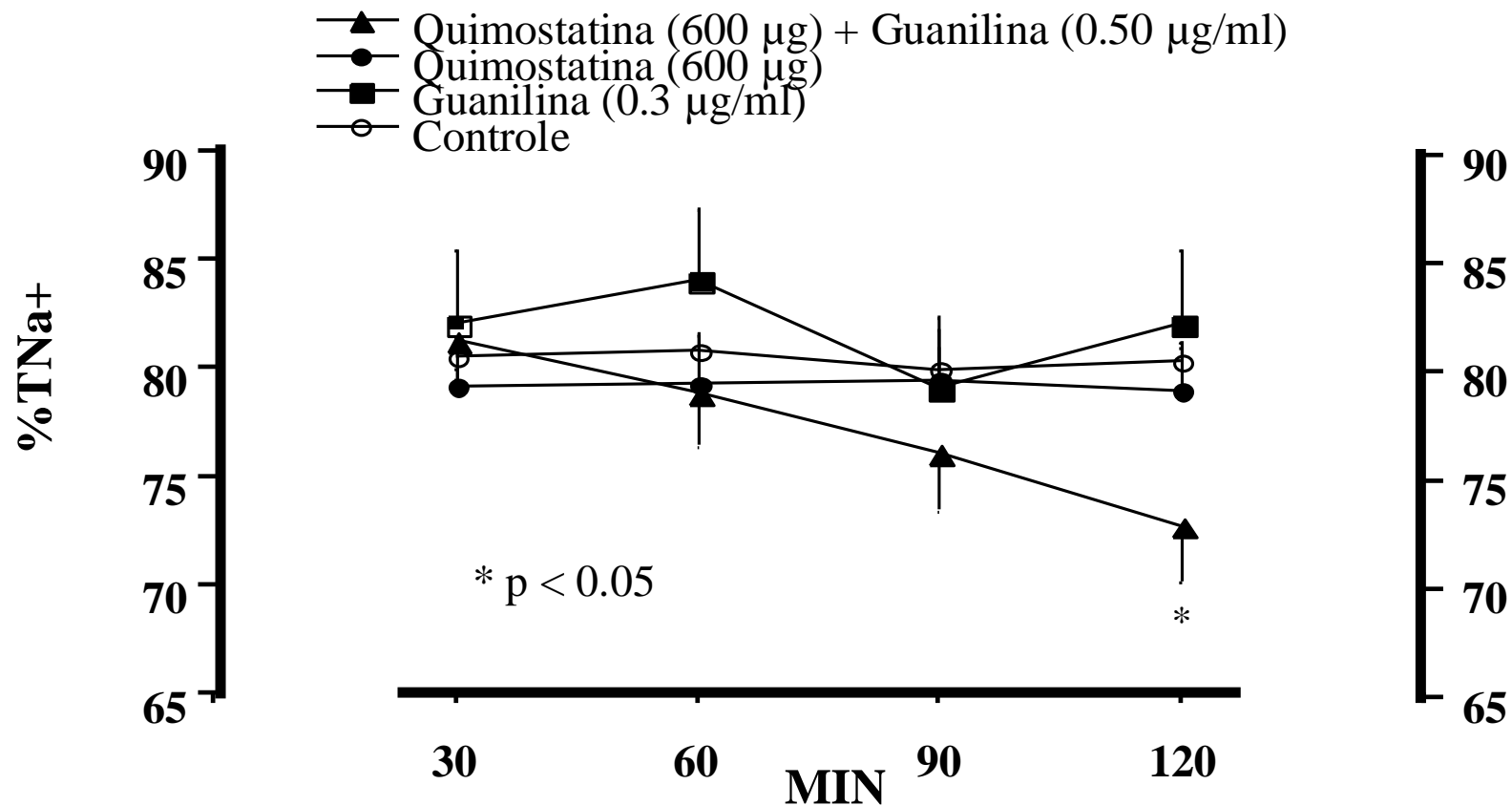
**Figura 1 :** Pressão de Perfusão (PP; mmHg) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Quimostatina (600 µg/ml) ou perfundidos com Quimostatina mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



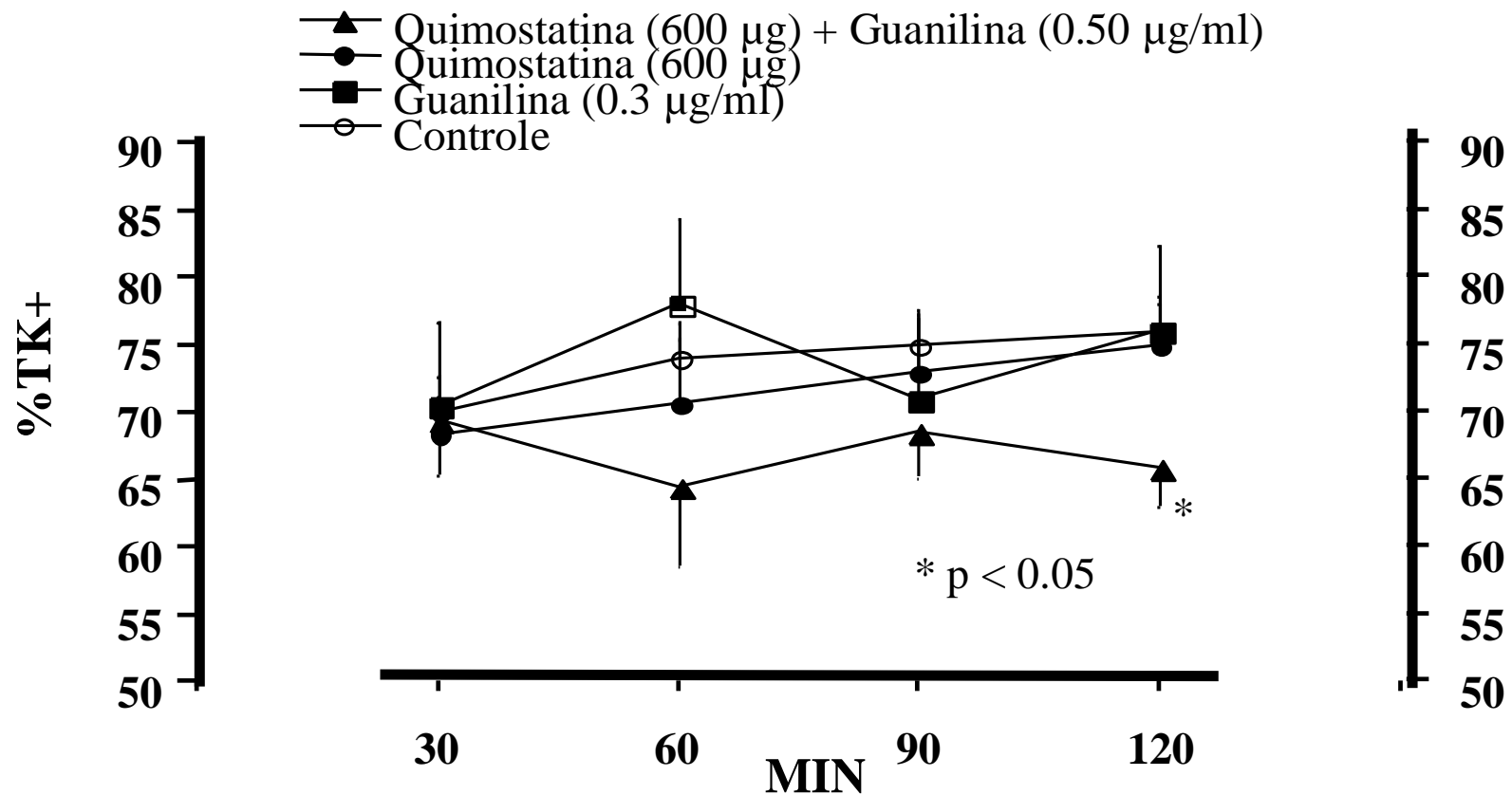
**Figura 2 :** Fluxo urinário (FU; ml/g/min) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Quimostatina (600 µg/ml) ou perfundidos com Quimostatina mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



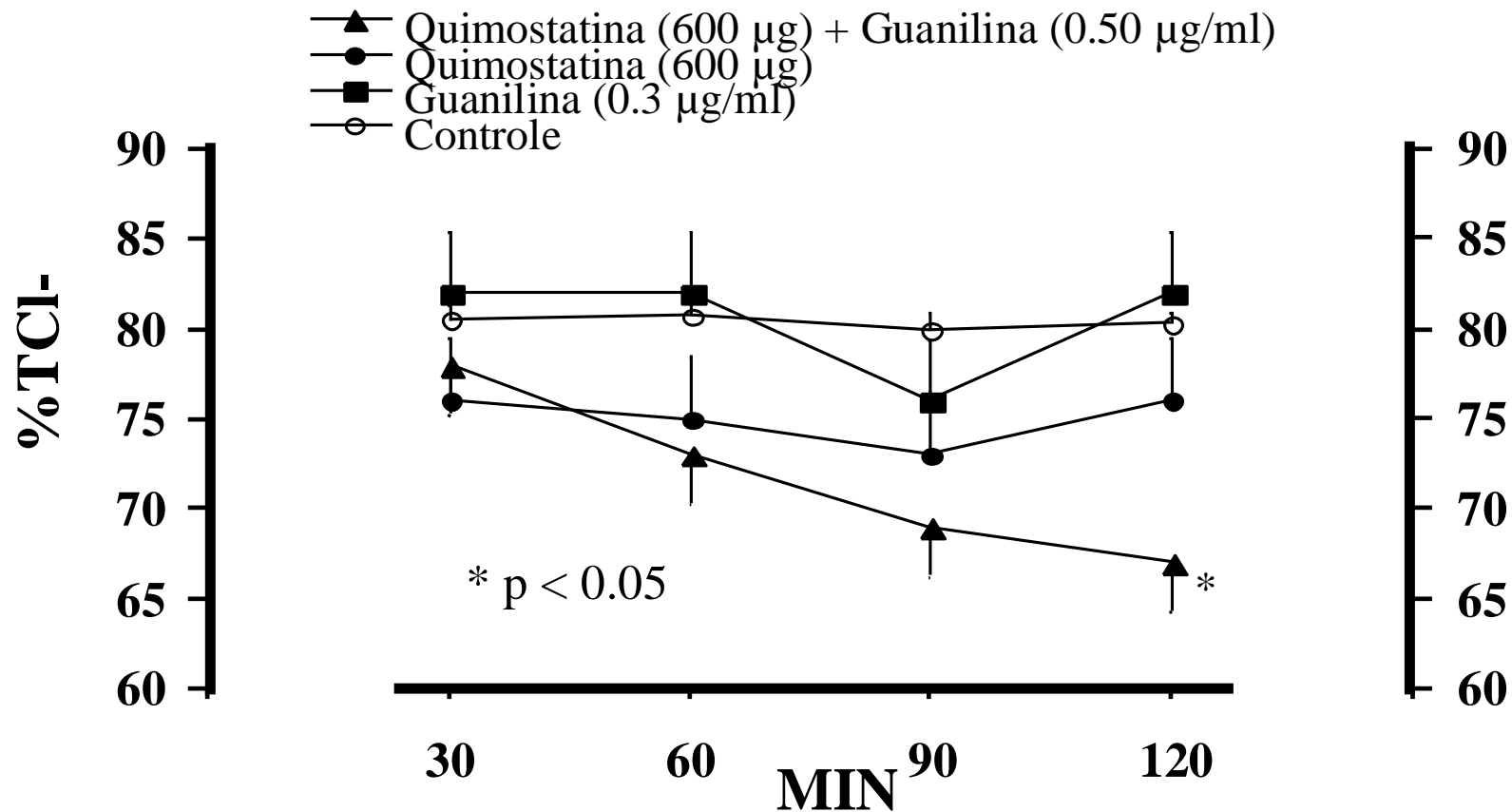
**Figura 3 :** Rítmo de filtração glomerular (RFG; ml/g/min) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Quimostatina (600 µg/ml) ou perfundidos com Quimostatina mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 4 :** Fração de transporte tubular de sódio (%TNa+) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Quimostatina (600 µg/ml) ou perfundidos com Quimostatina mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

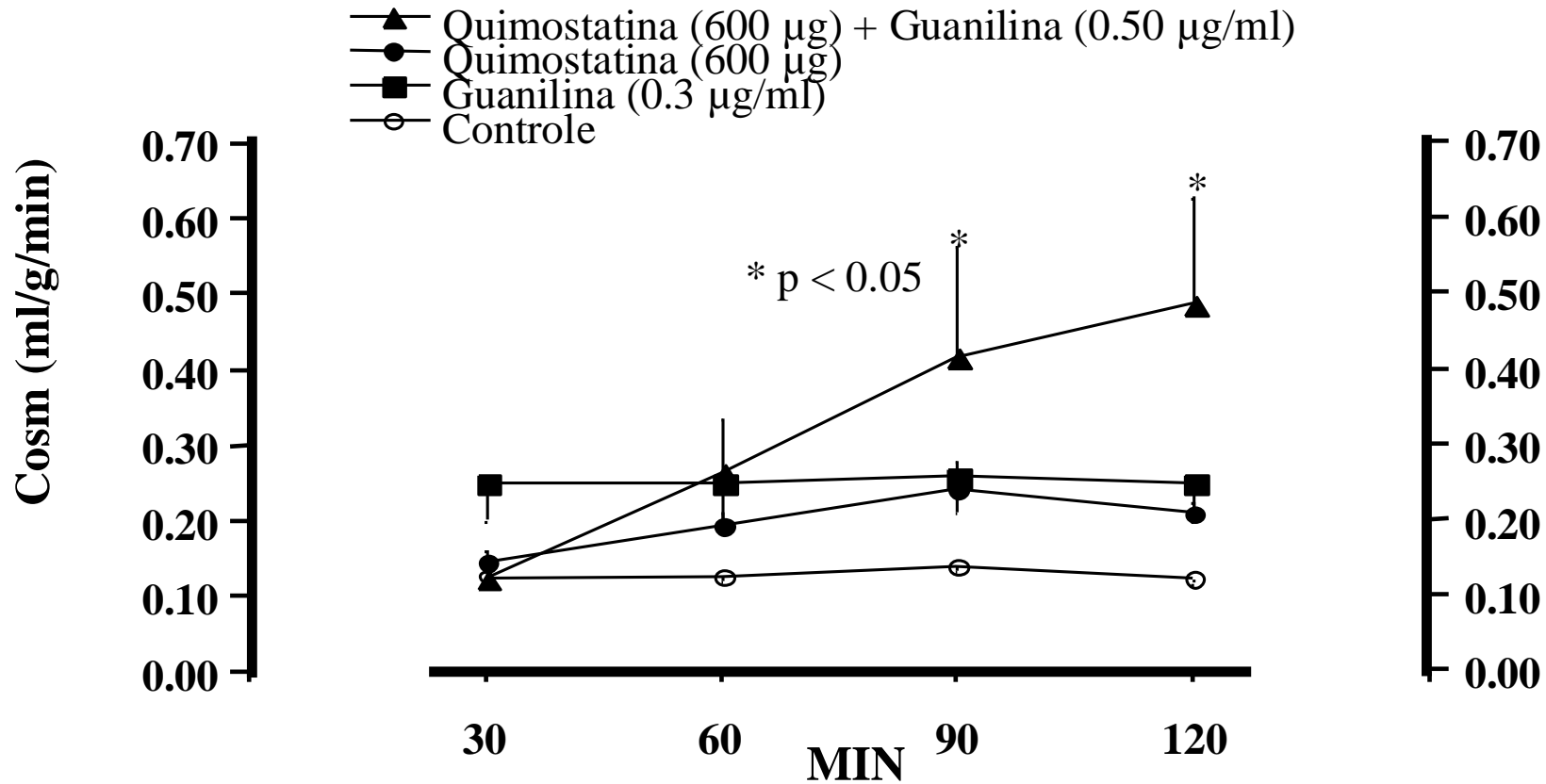


**Figura 5 :** Fração de transporte tubular de potássio (%TK+) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Quimostatina (600 µg/ml) ou perfundidos com Quimostatina mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



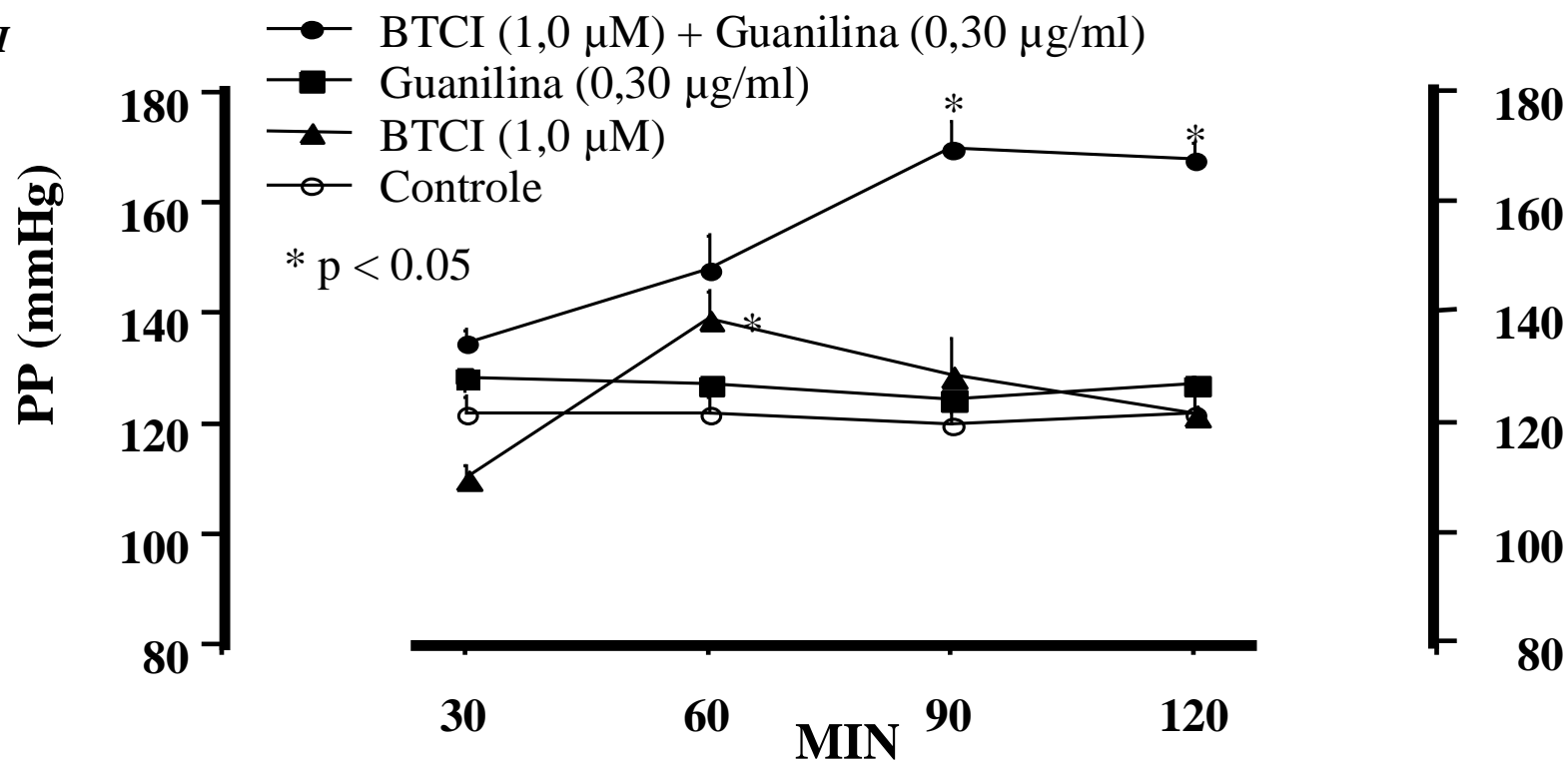
**Figura 6 :** Fração de transporte tubular de cloreto (% TCl-) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Quimostatina (600 µg/ml) ou perfundidos com Quimostatina mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



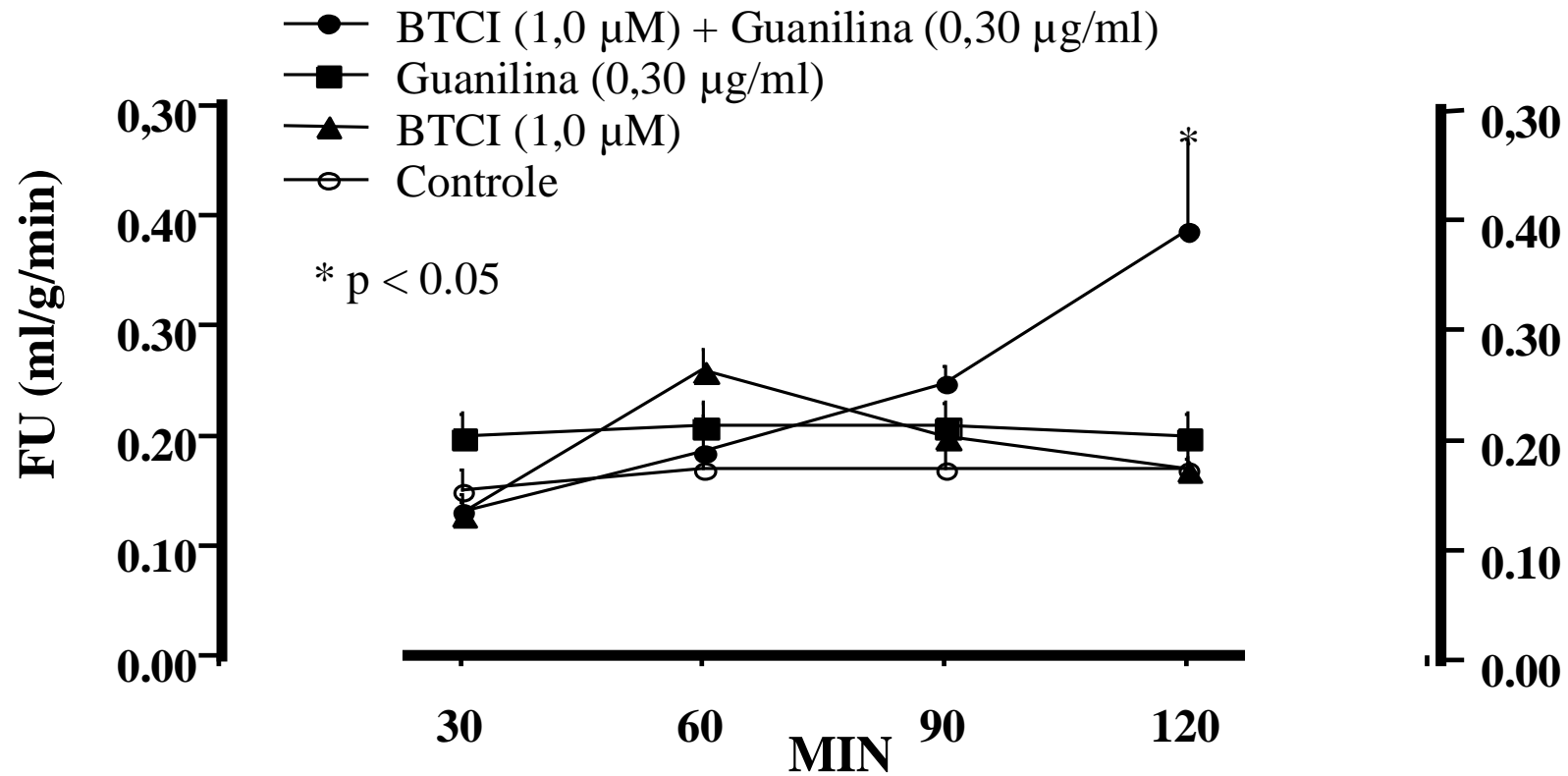


**Figura 7 :** Clearance osmolar (Cosm; ml/g/min) de rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Quimostatina (600 µg/ml) ou perfundidos com Quimostatina mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

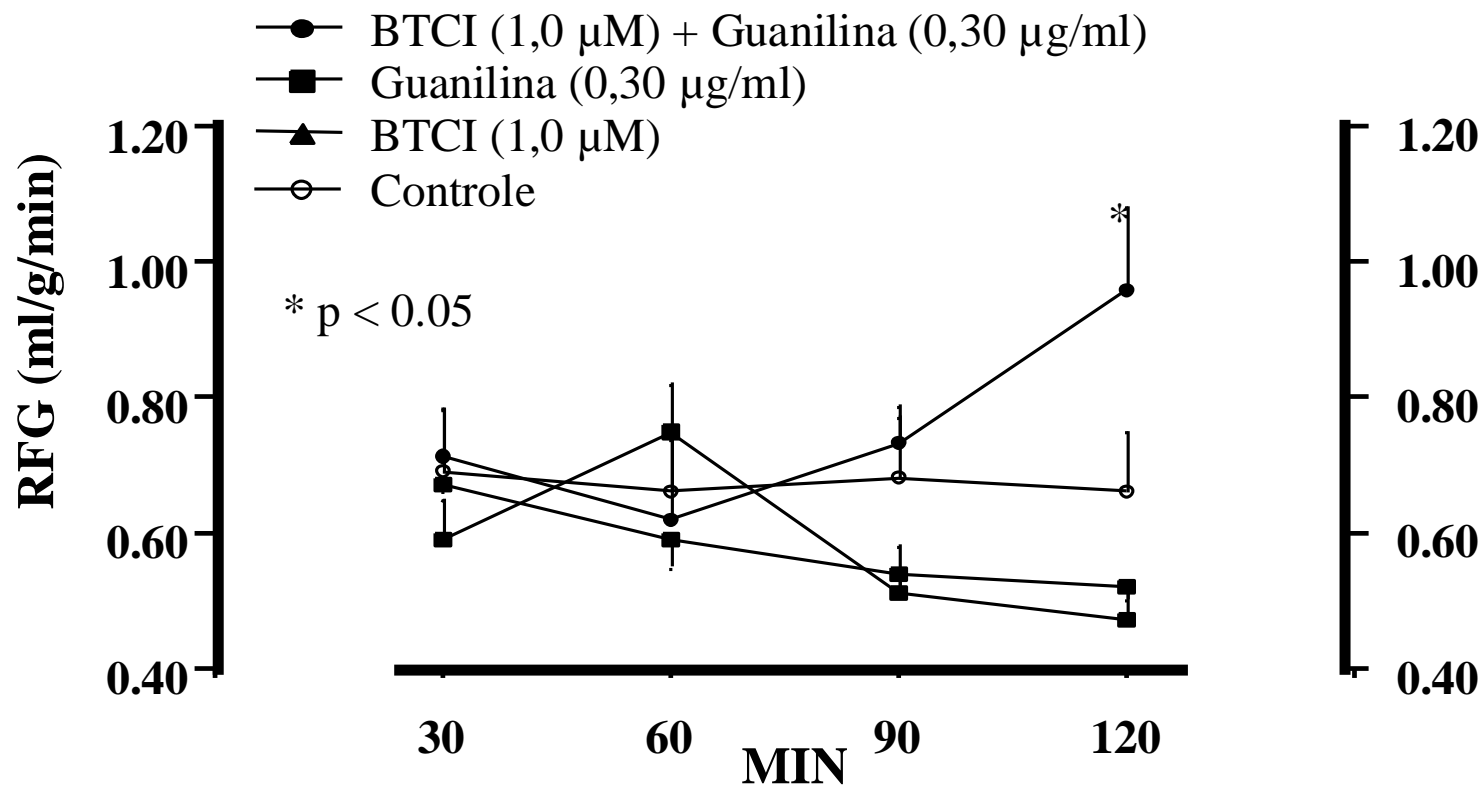
## 11.2. BTCI



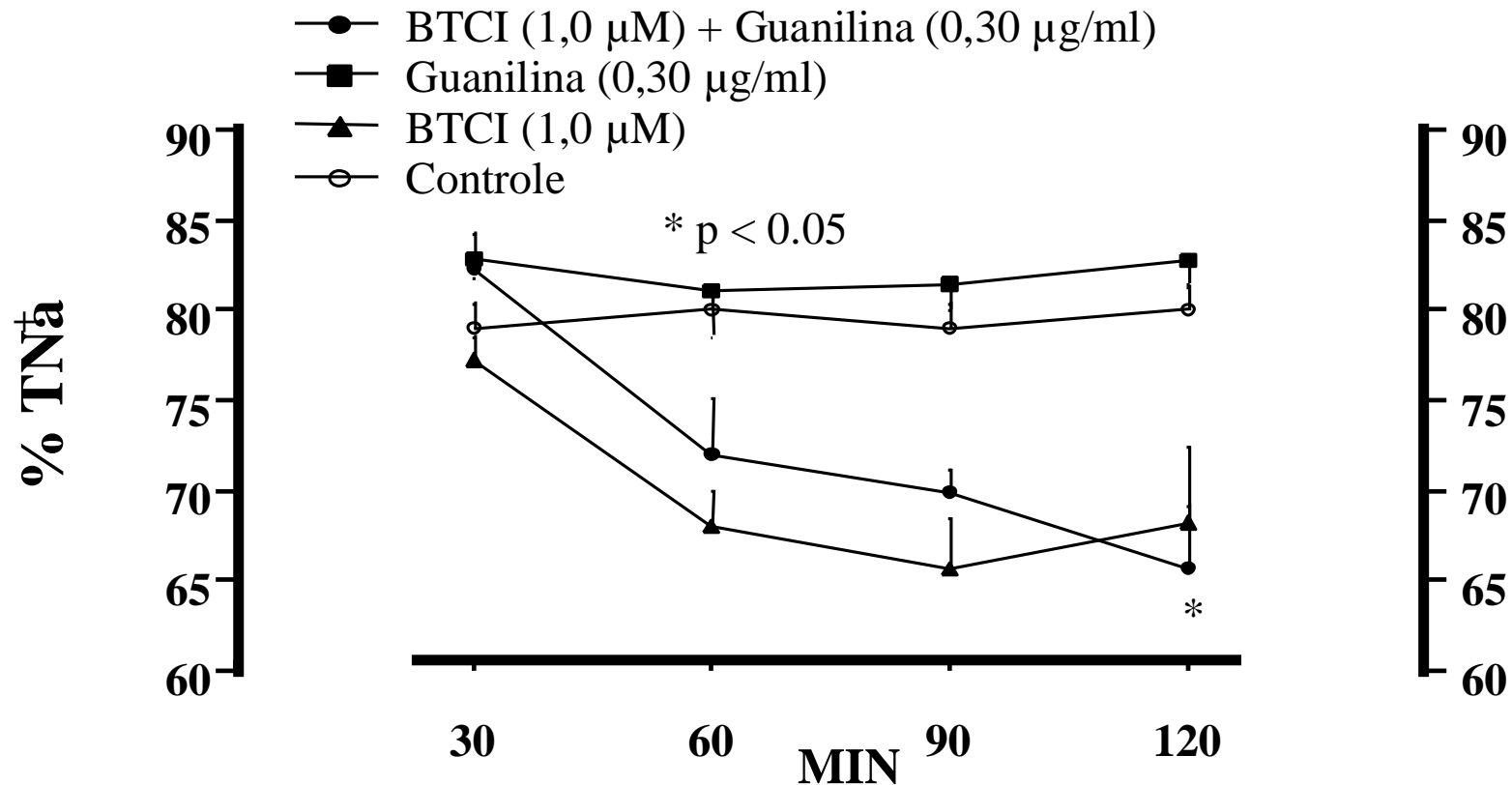
**Figura 1 :** Pressão de Perfusão (PP; mmHg) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ), perfundidos somente com BTCI (1,0  $\mu\text{M}$ ) ou perfundidos com BTCI mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média;  $n \geq 04$ ; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle interno.



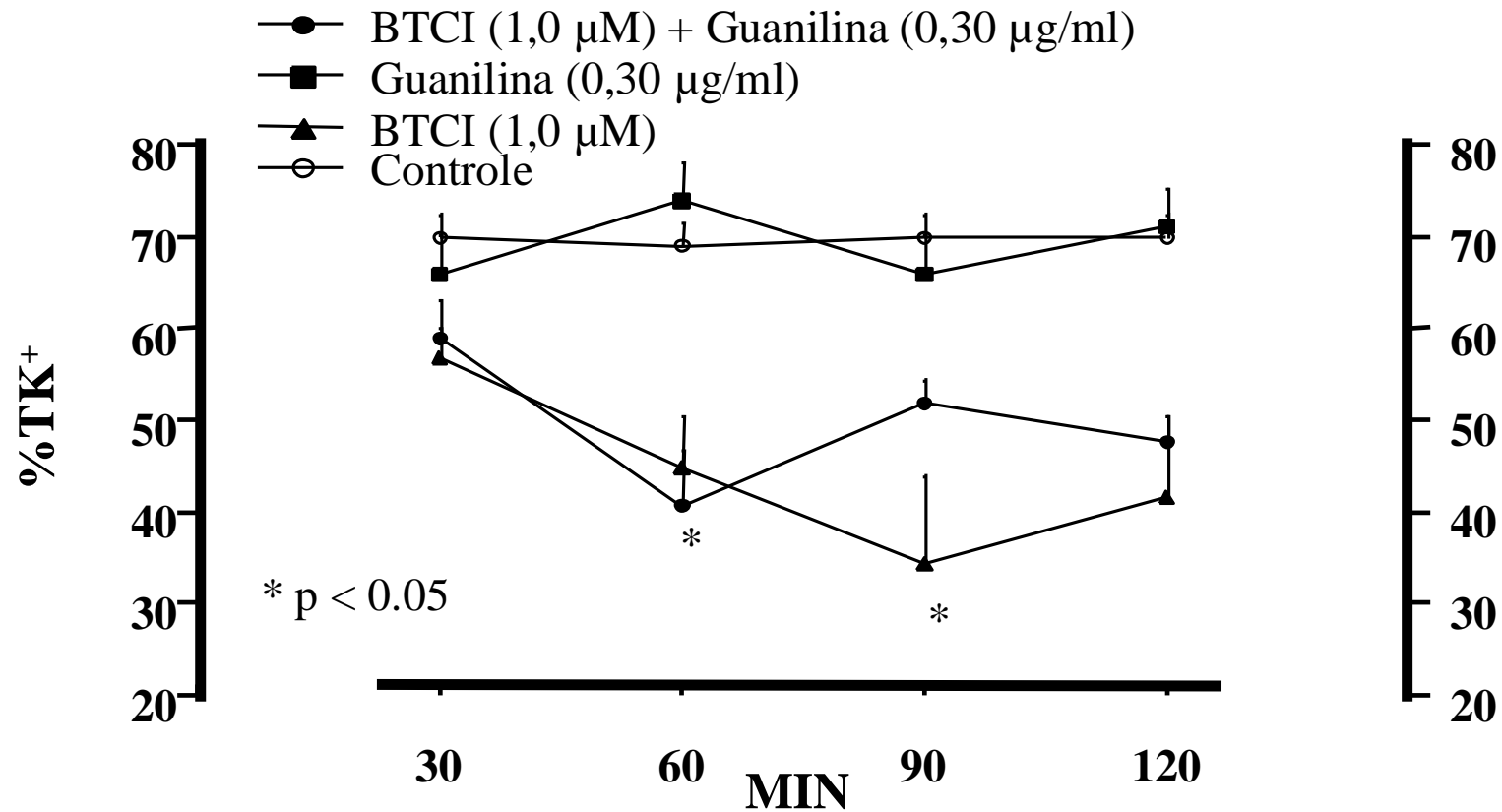
**Figura 2 :** Fluxo urinário (FU; ml/gmin) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3  $\mu$ g/ml), perfundidos somente com BTICI (1,0  $\mu$ M) ou perfundidos com BTICI mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média;  $n \geq 04$ ; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle interno.



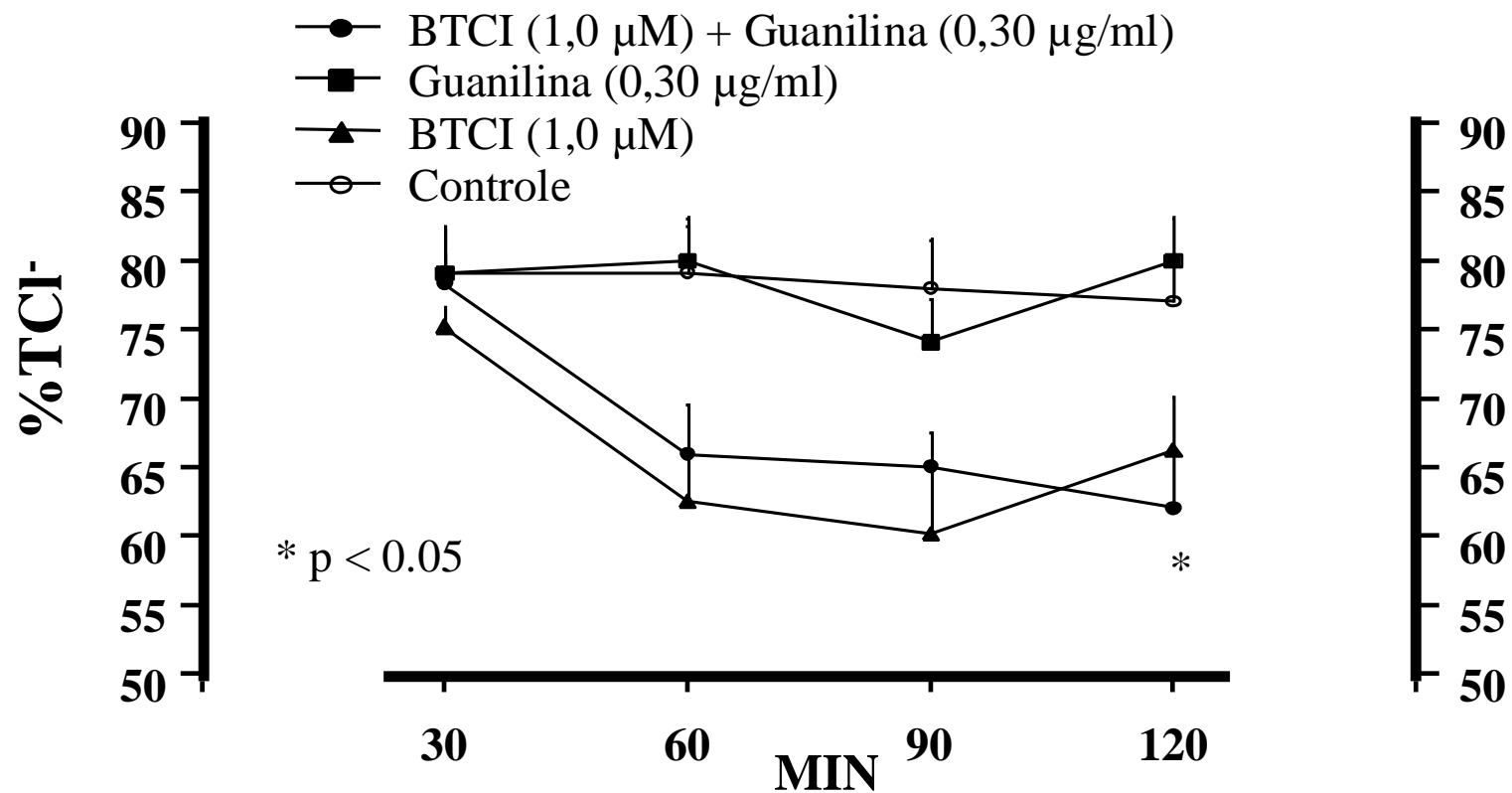
**Figura 3 :** Rítmo defiltração glomerular (RFG; ml/g/min) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 μg/ml), perfundidos somente com BTCl (1,0 μM) ou perfundidos com BTCl mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



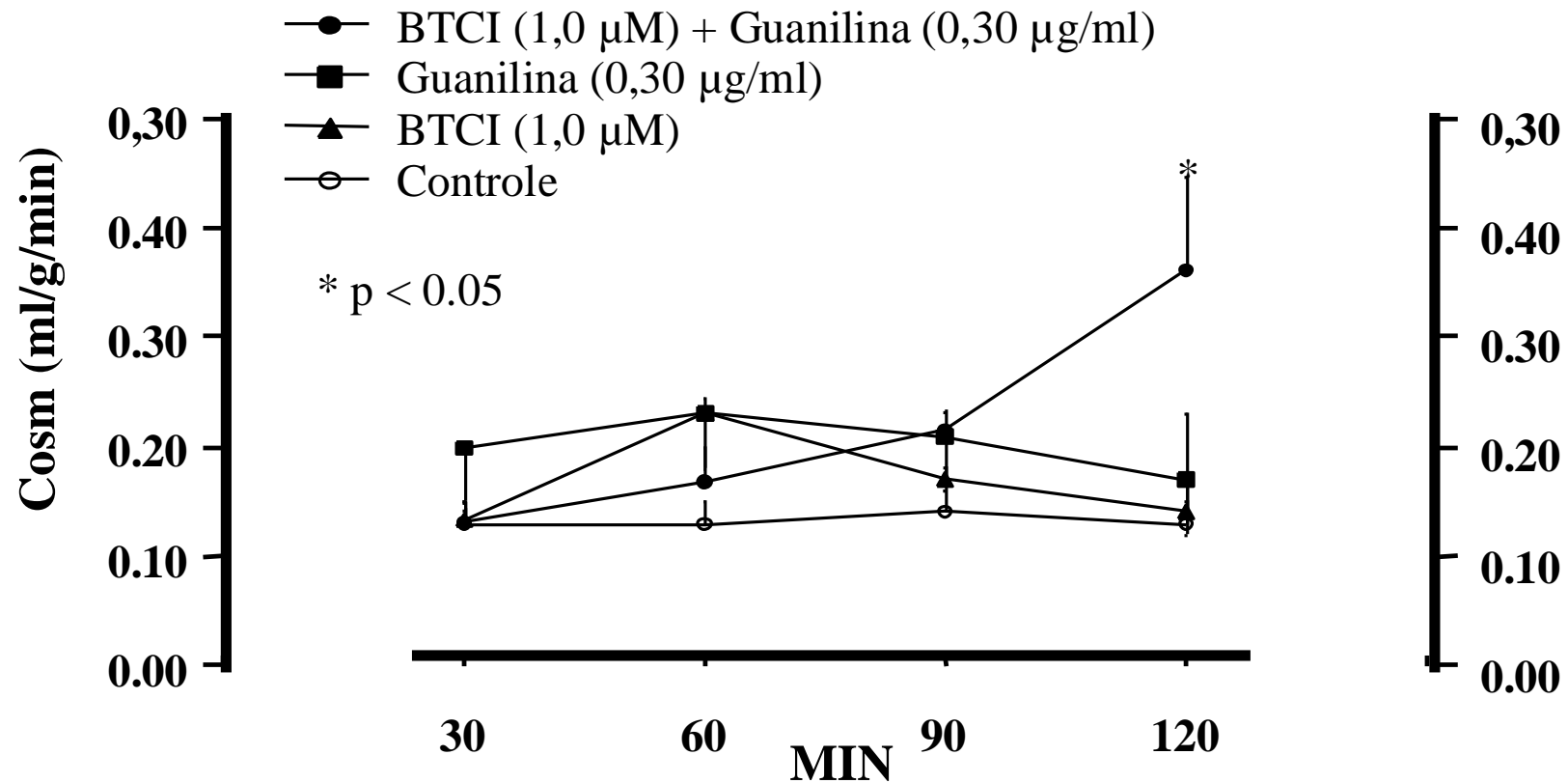
**Figura 4 :** Fração de transporte tubular de sódio (% TNa<sup>+</sup>; %) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 μg/ml), perfundidos somente com BTCl (1,0 μM) ou perfundidos com BTCl mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 5 :** Fração de transporte tubular de potássio (%TK+; %) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 μg/ml), perfundidos somente com BTICI (1,0 μM) ou perfundidos com BTICI mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



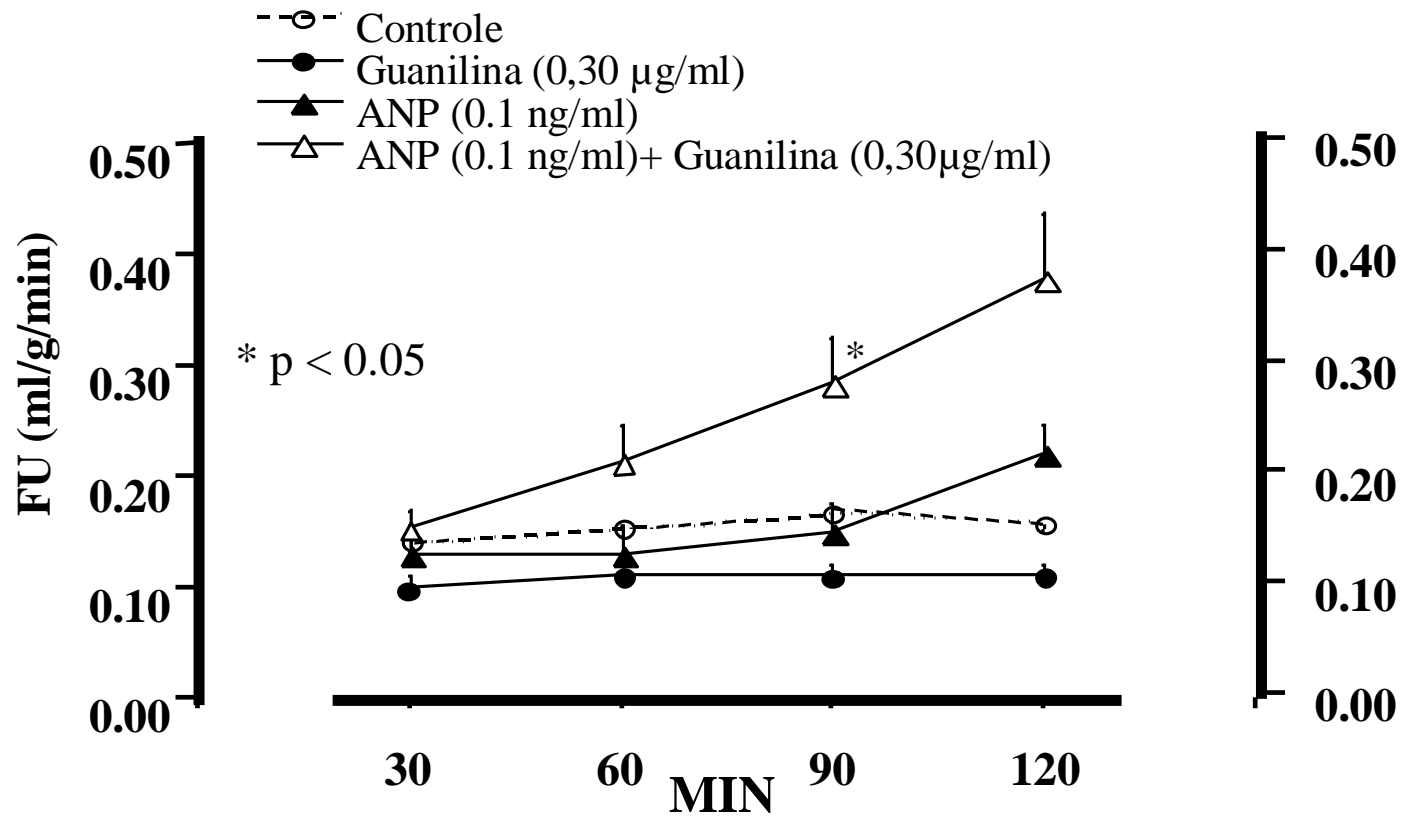
**Figura 6 :** Fração de transporte tubular de cloreto (%TCl; %) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 μg/ml), perfundidos somente com BTCI (1,0 μM) ou perfundidos com BTCI mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



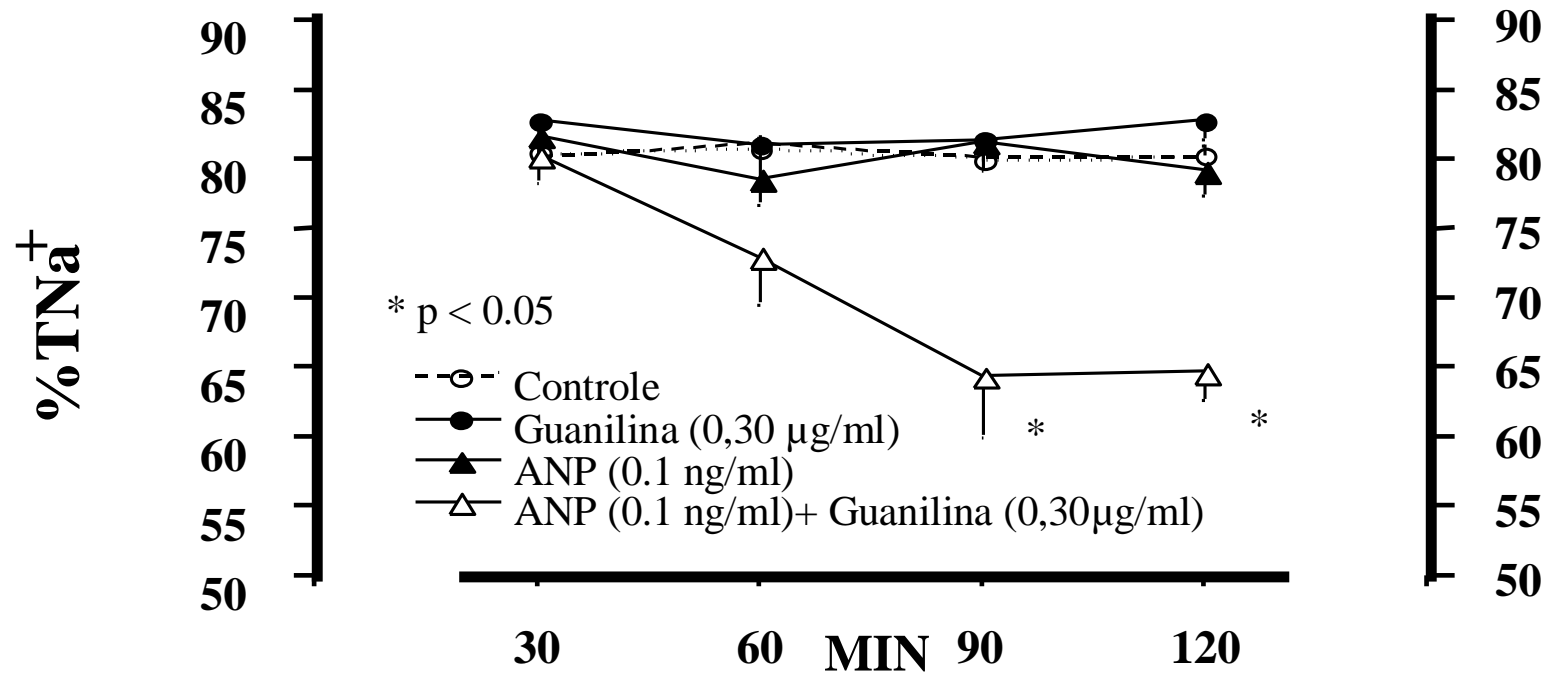
**Figura 7 :** Clearance osmolar (Cosm ; ml/gmin) em rins controle, perfundidos somente com Guanilina (0,3 μg/ml), perfundidos somente com BTICI (1,0 μM) ou perfundidos com BTICI mais Guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



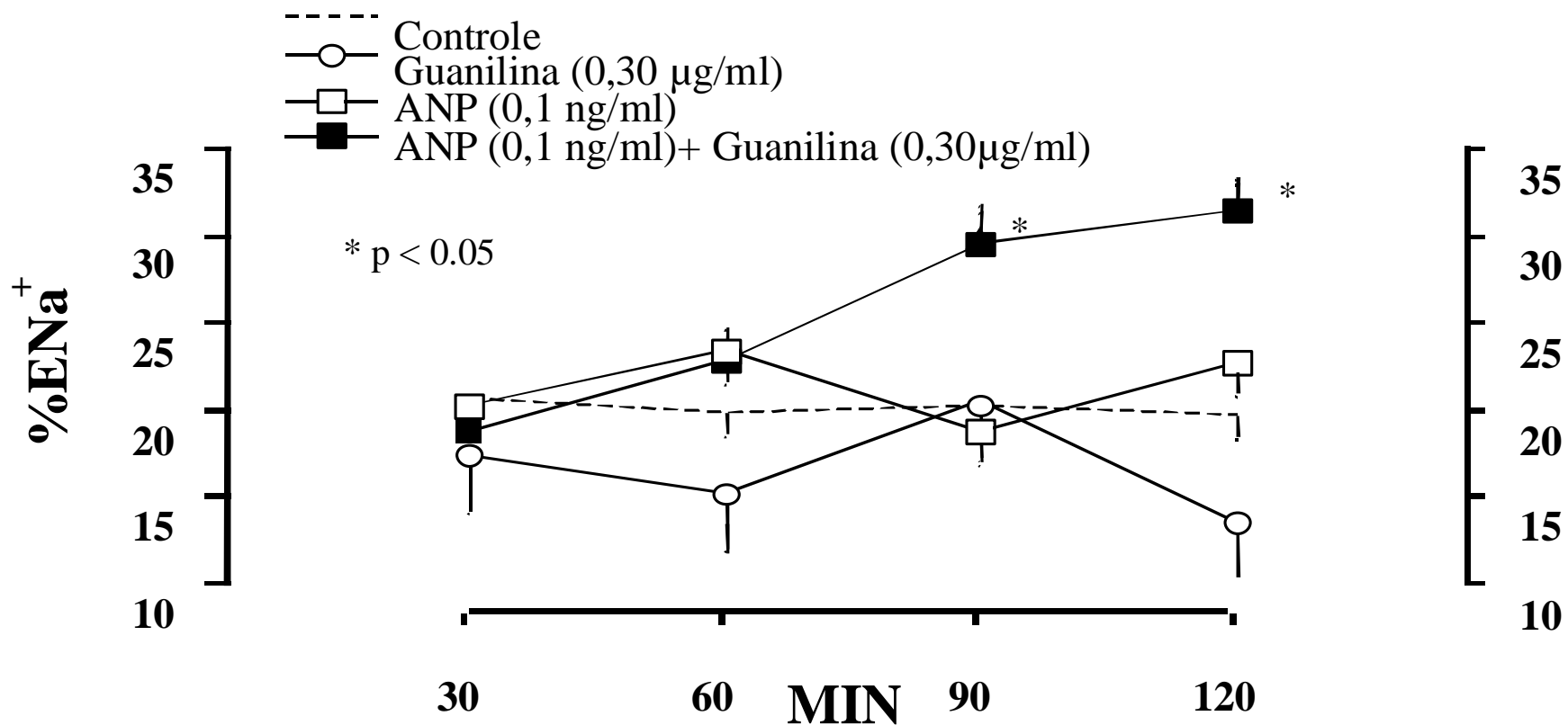
### 11.3. ANP



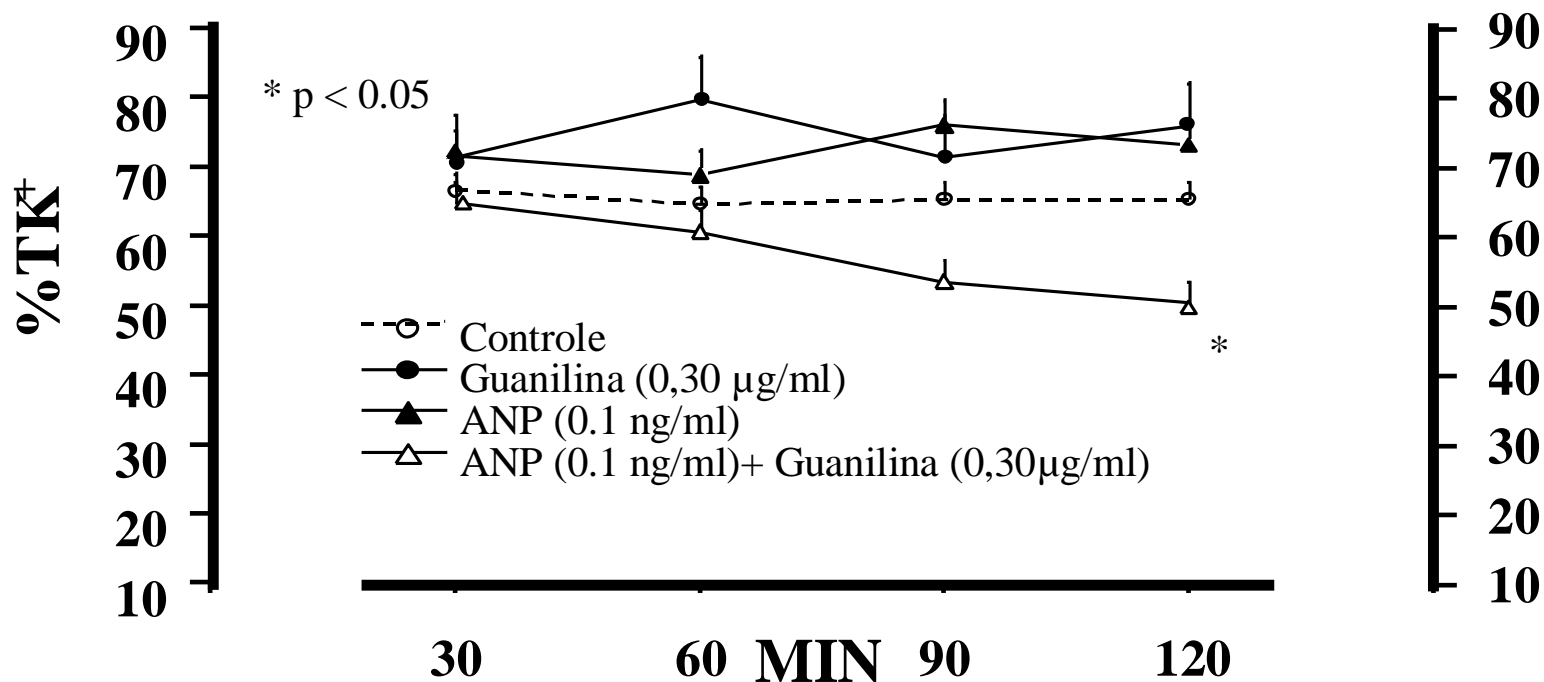
**Figura 1 :** Fluxo urinário (FU; ml/g/nim) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média;  $n \geq 04$ ; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle interno.



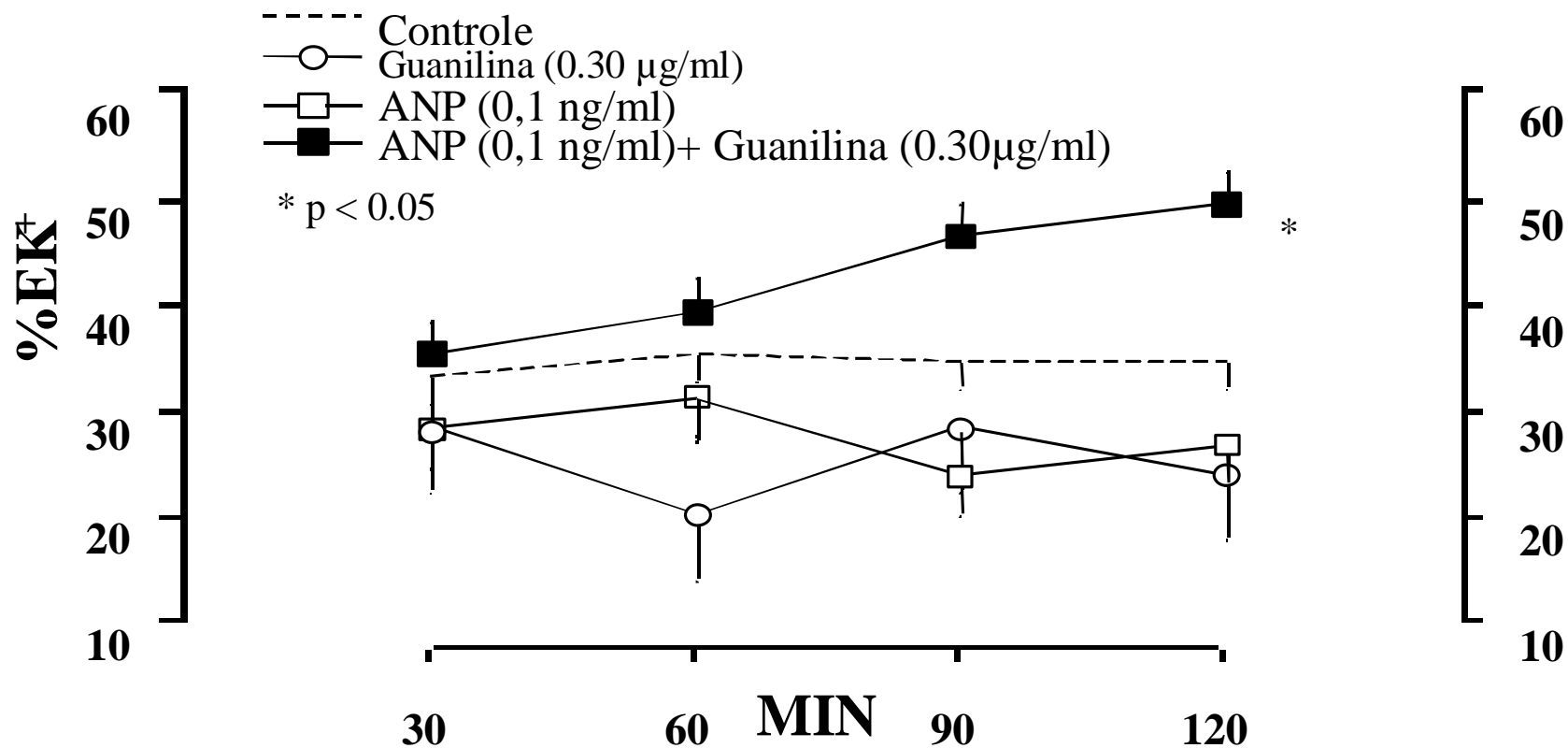
**Figura 2 :** Fração do transporte tubular de sódio (%TNa+; %) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



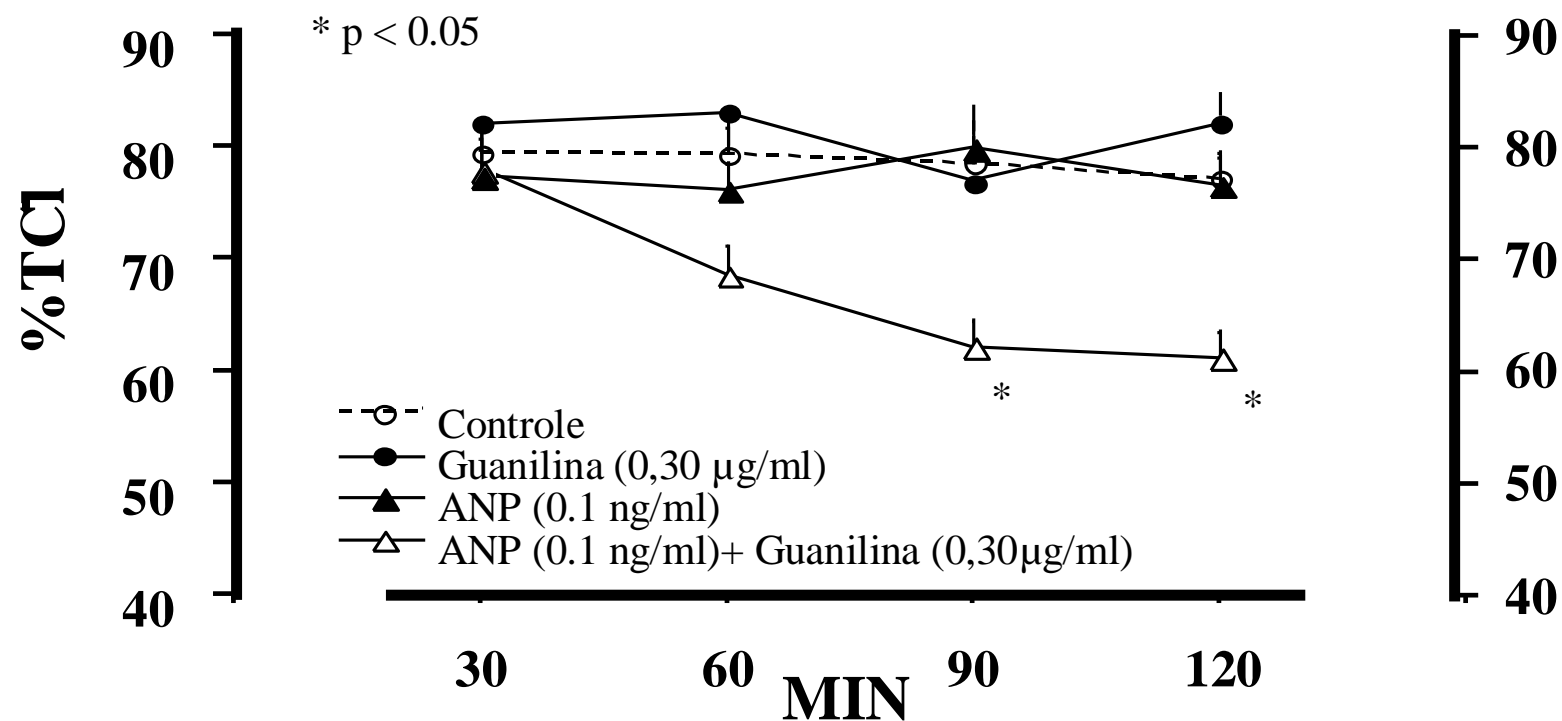
**Figura 3:** Excreção Fractional de sódio de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média;  $n \geq 04$ ; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle interno.



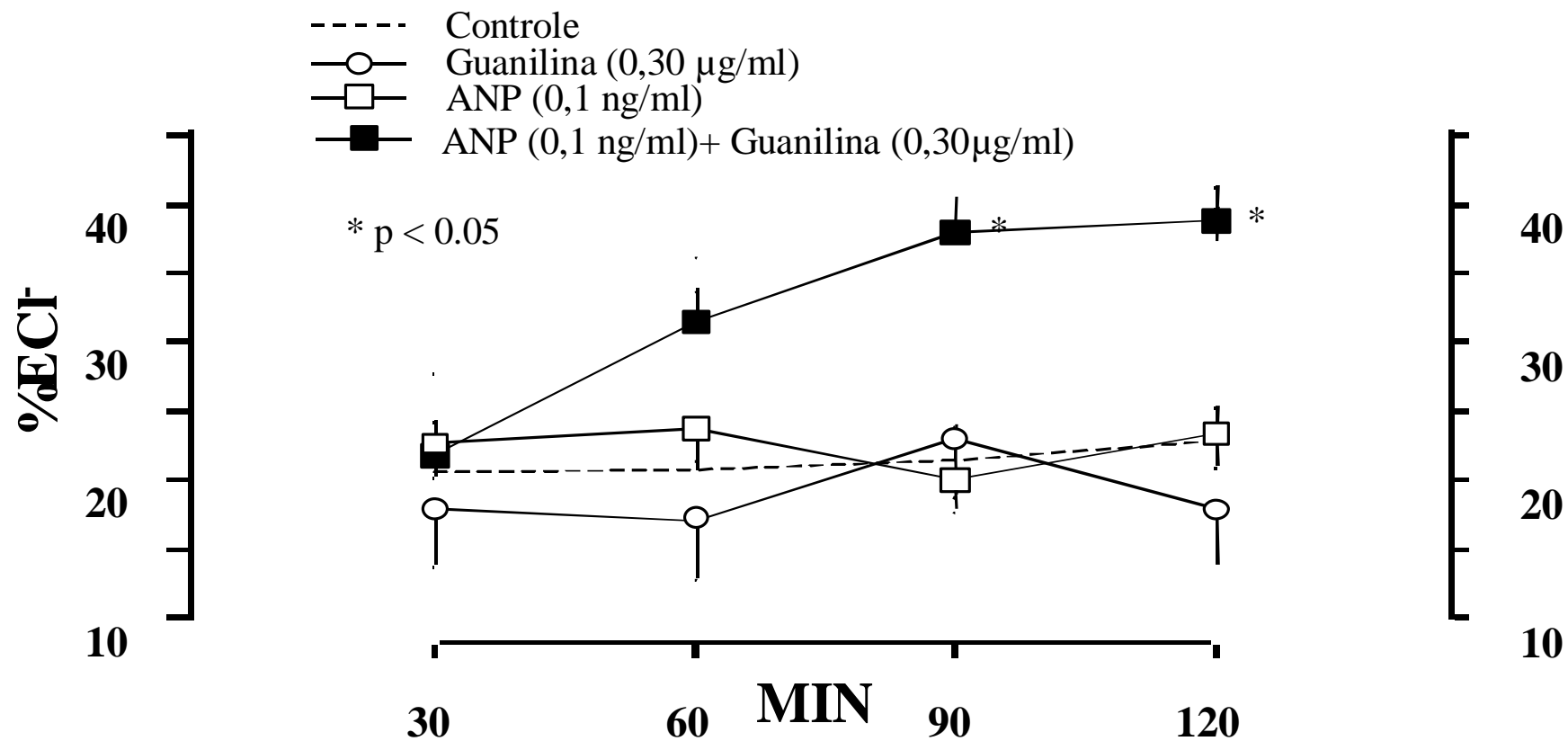
**Figura 4 :** Fração do transporte tubular de potássio (%TK+; %) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



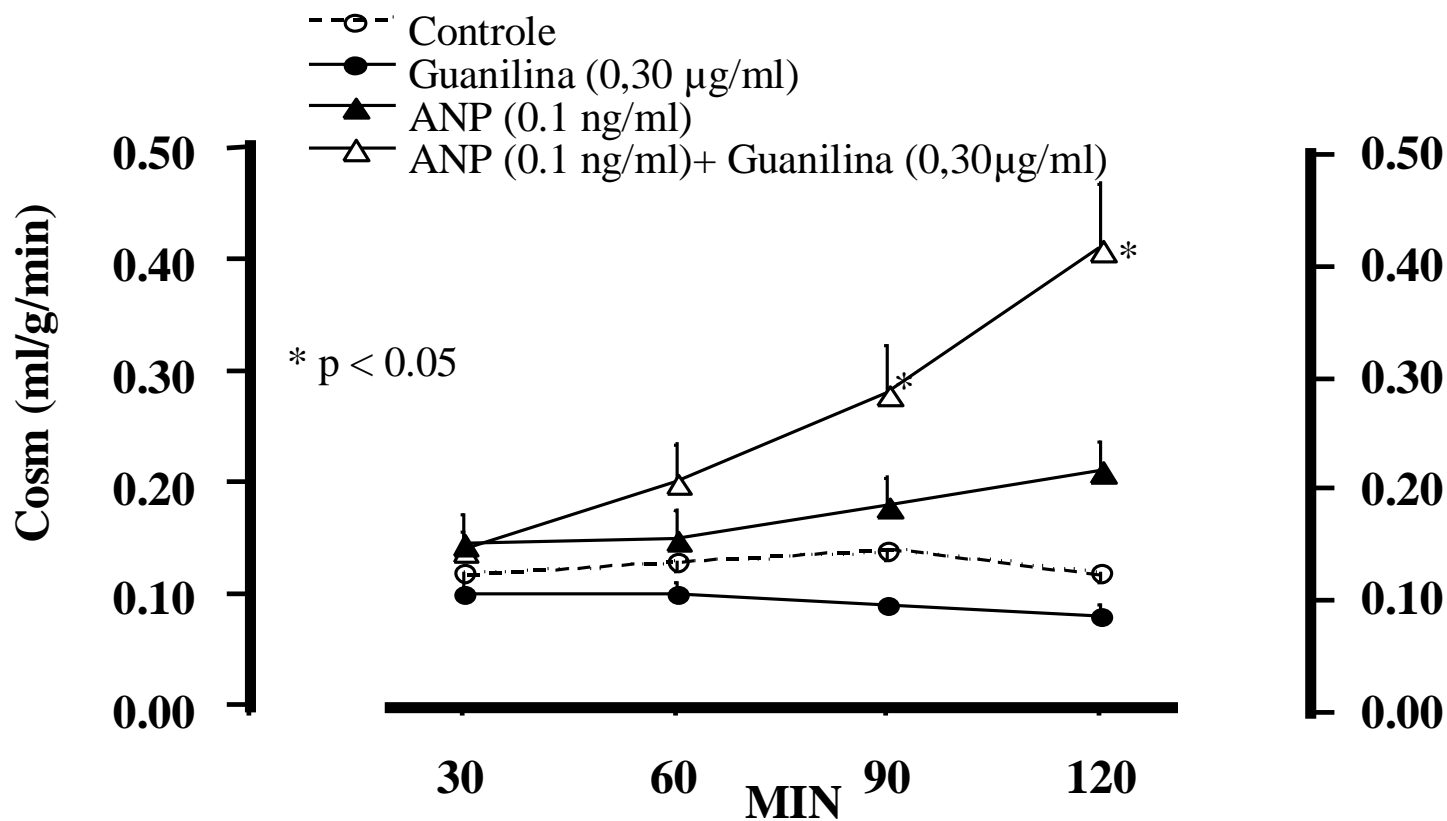
**Figura 5 :** Excreção Fractional de potássio de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 6 :** Fração do transporte tubular de cloreto (%TCl-; %) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

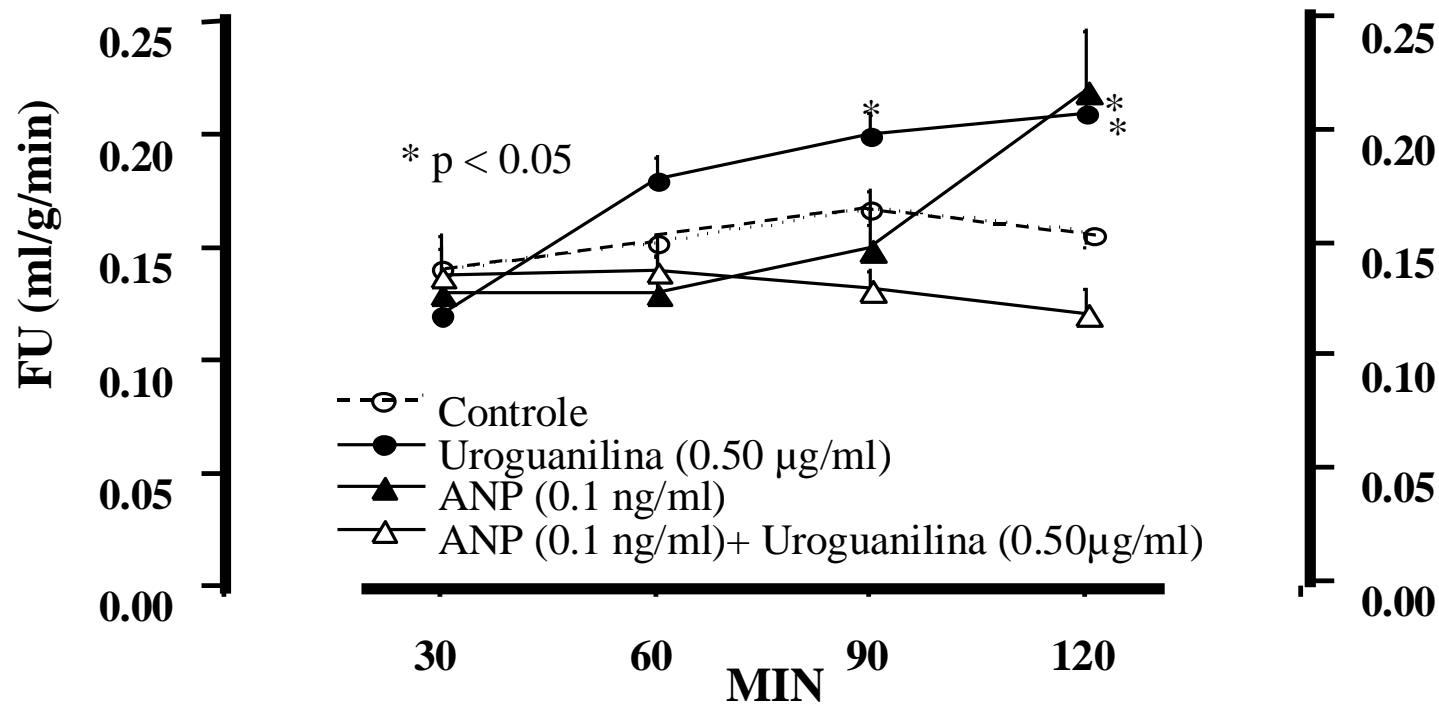


**Figura 7 :** Excreção Fractional de cloreto de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

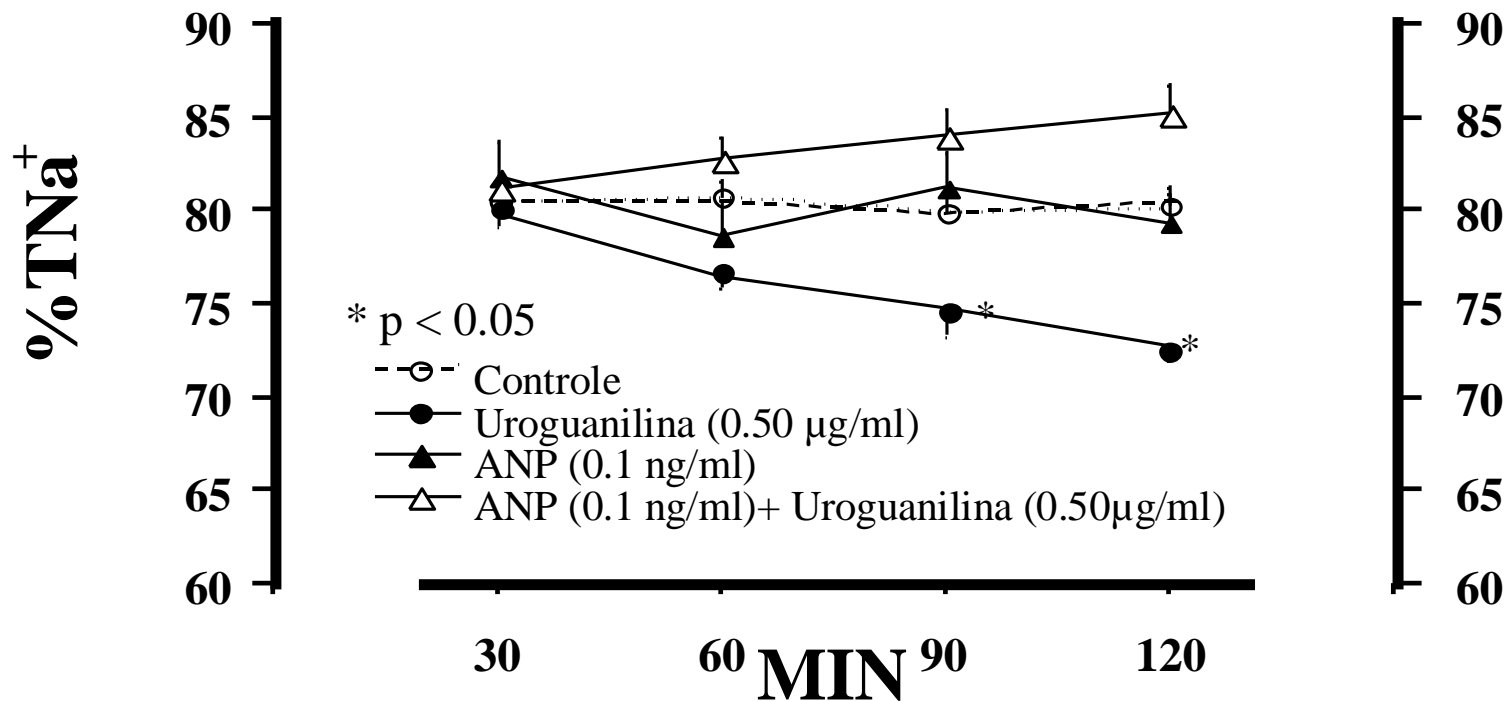


**Figura 8 :** Clearance osmolar (Cosm; ml/g/ni) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

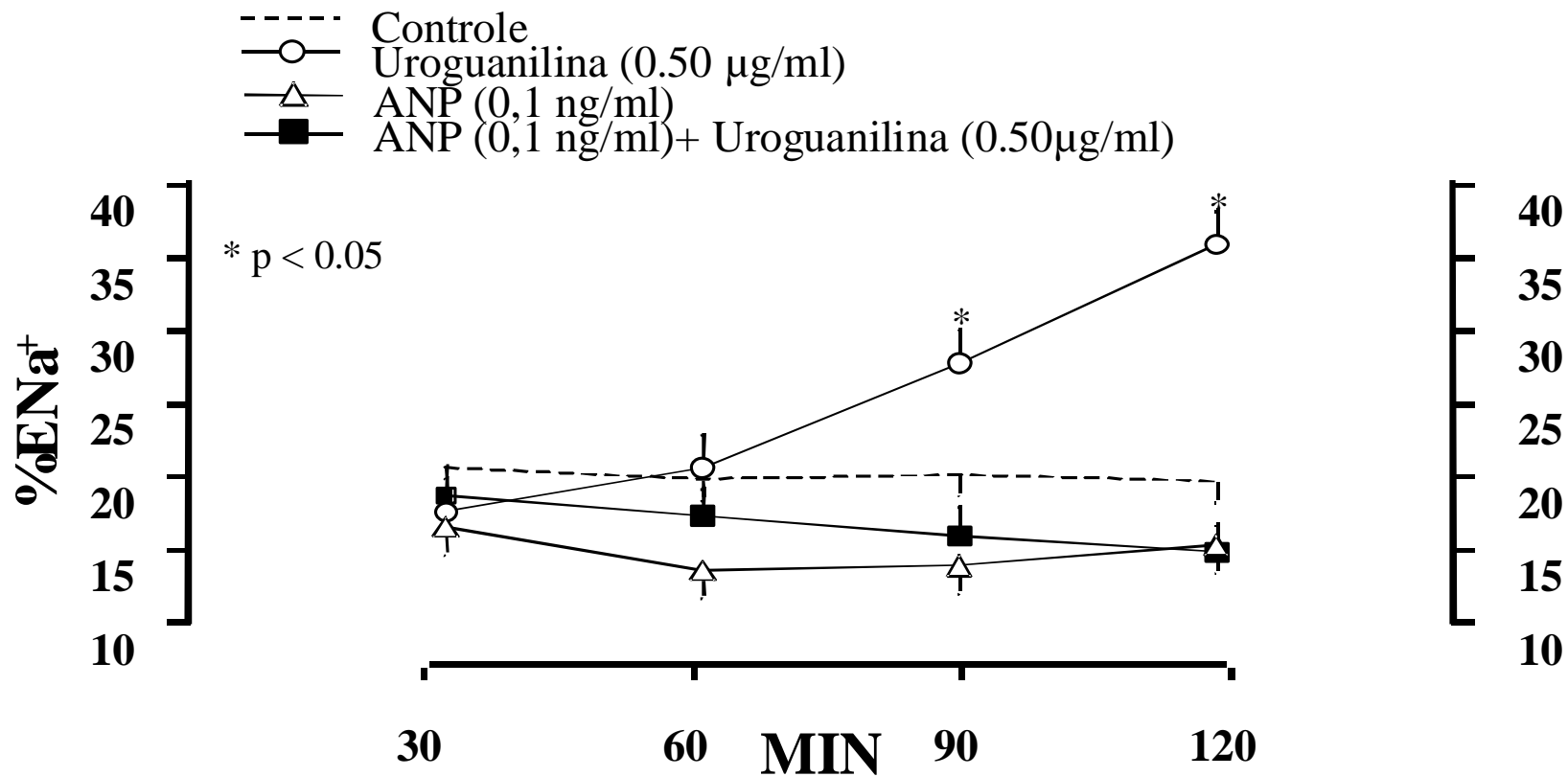




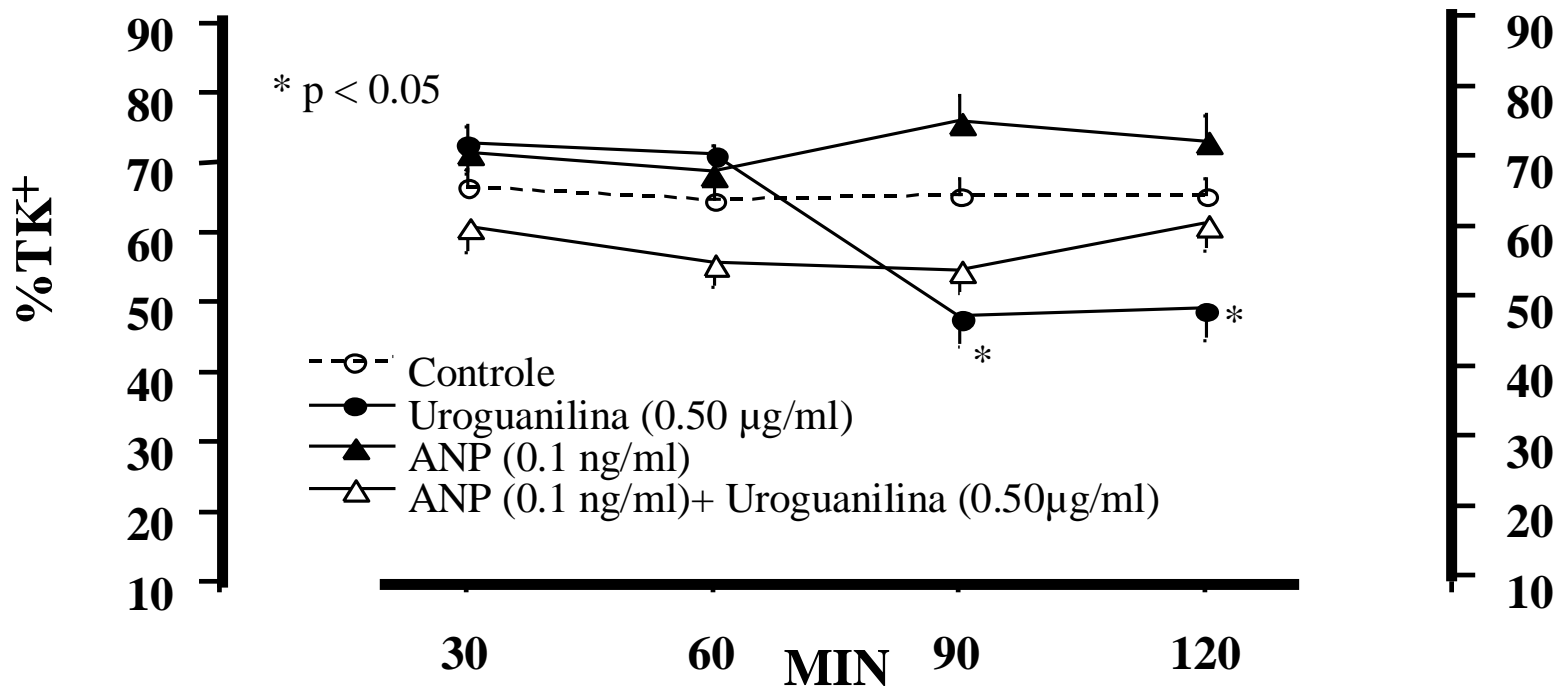
**Figura 9 :** Fluxo urinário(FU; ml/g/nim) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média;  $n \geq 04$ ; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle interno.



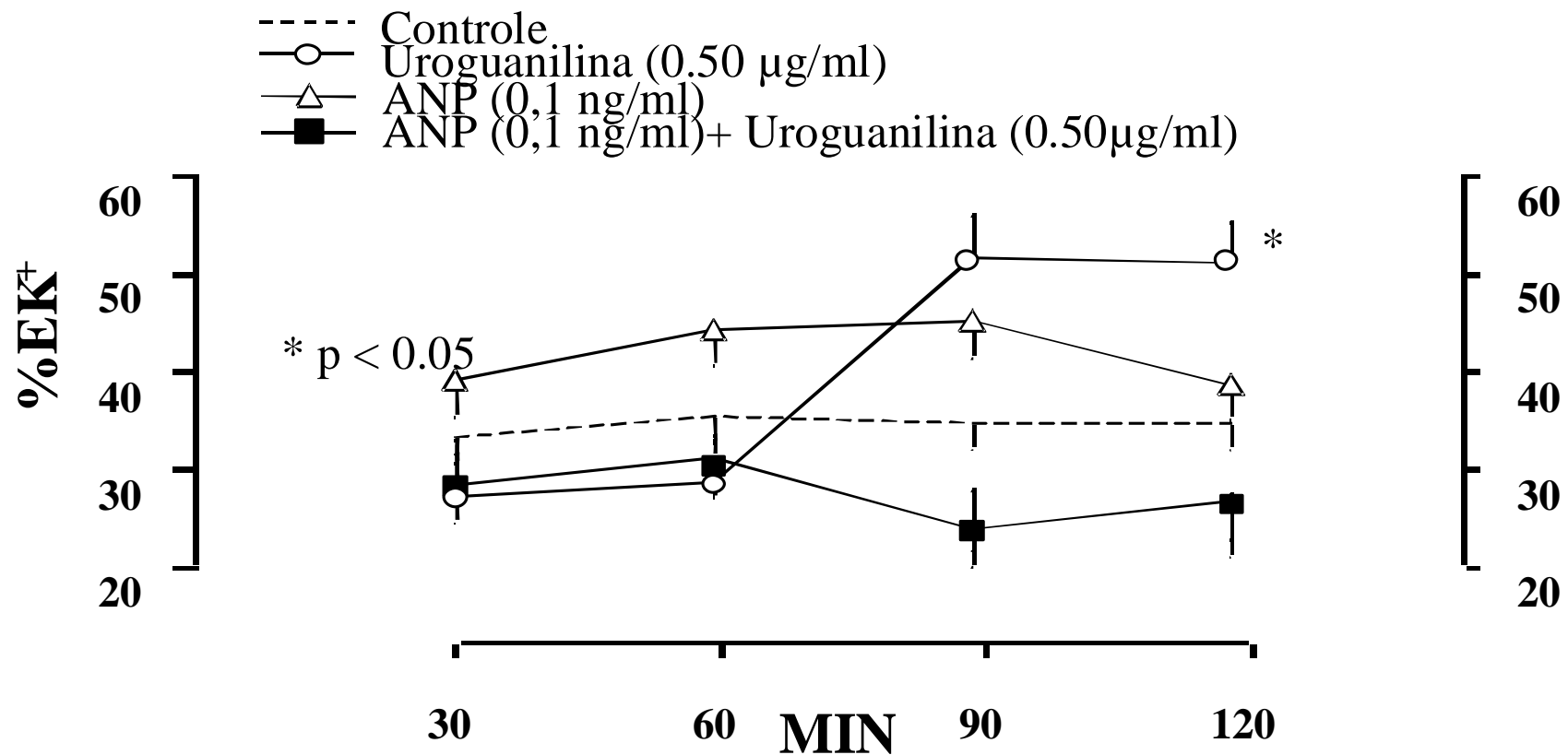
**Figura 10 :** Fração do transporte tubular de sódio (%TNa<sup>+</sup>; %) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



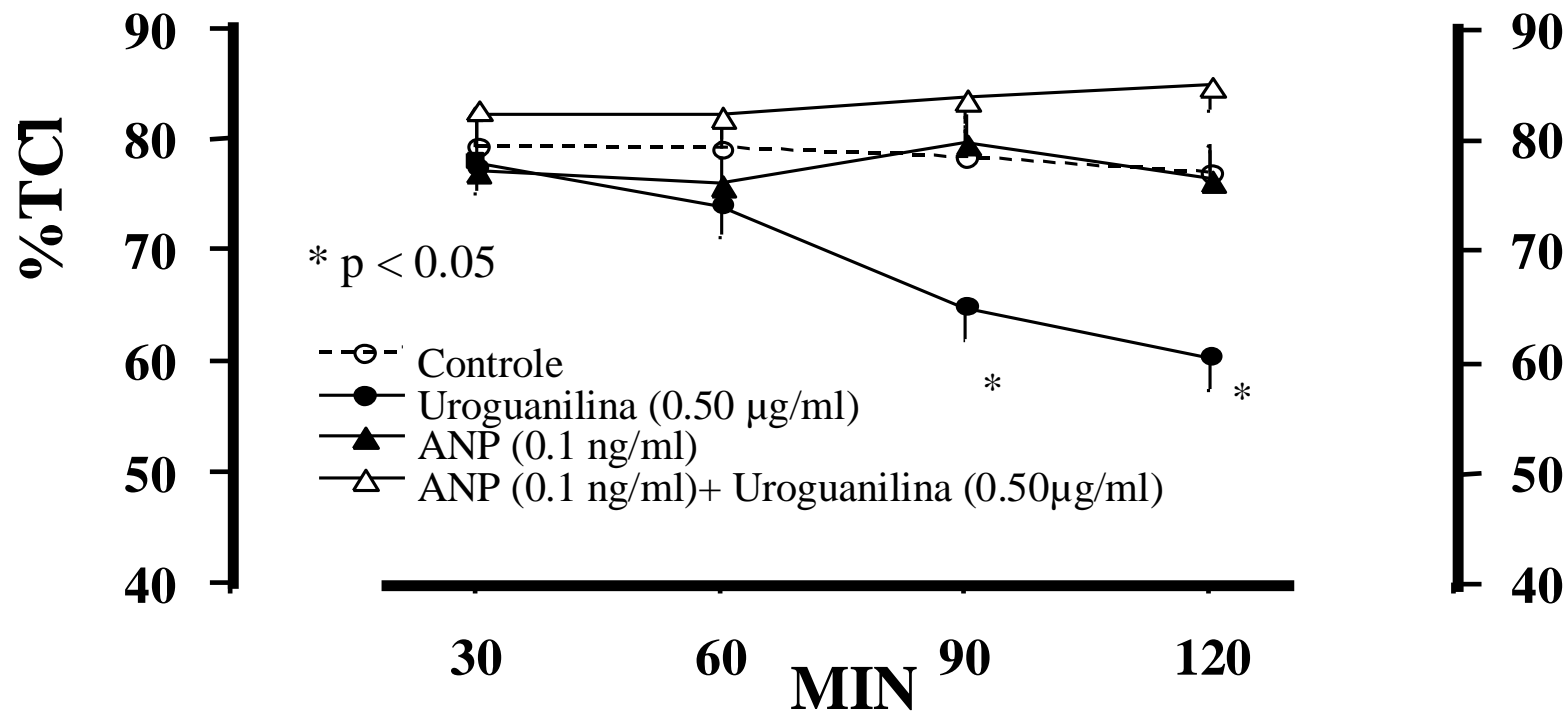
**Figura 11 :** Excreção Fractional de sódio de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



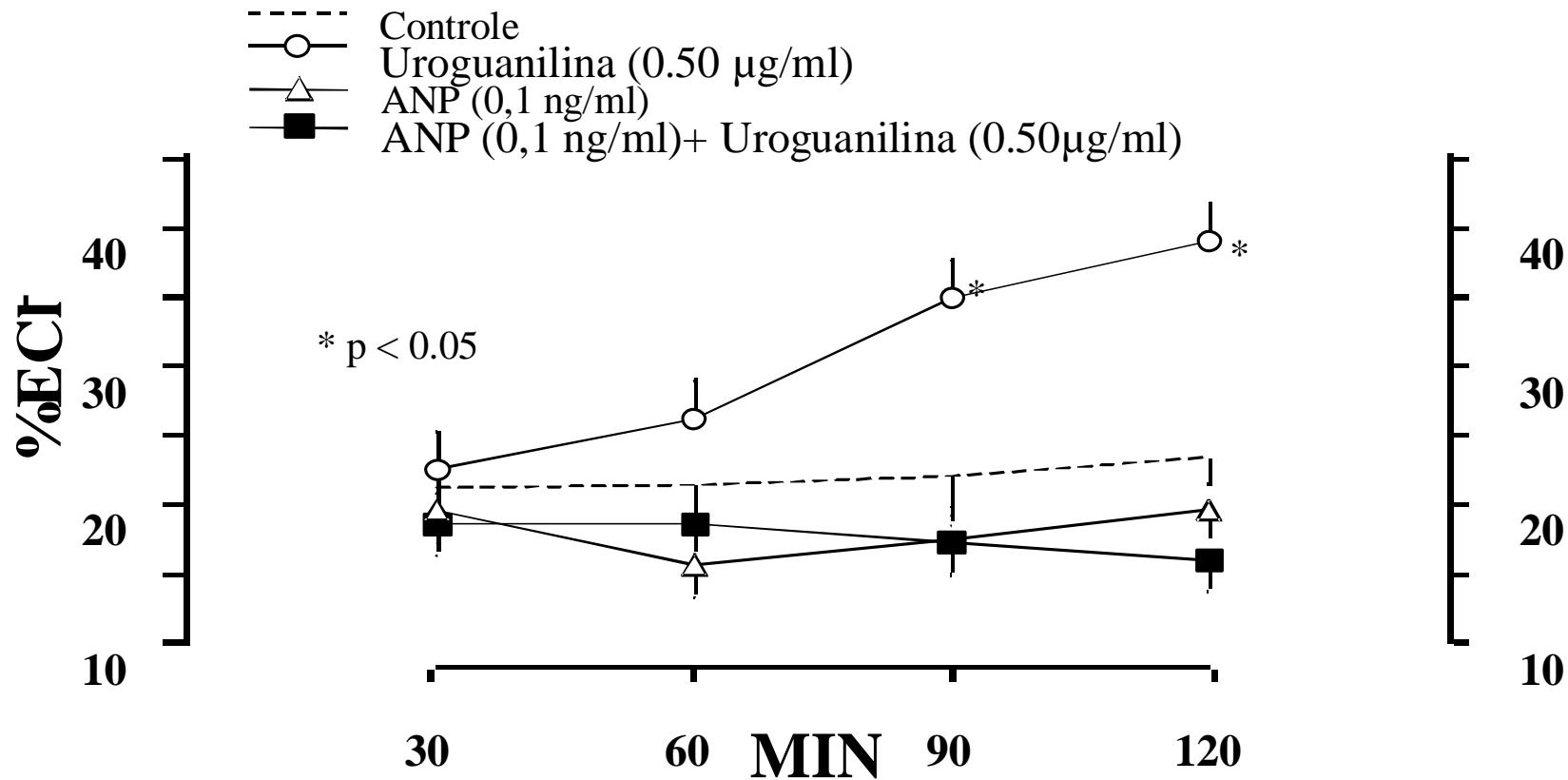
**Figura 12 :** Fração do transporte tubular de potássio (%TK+; %) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



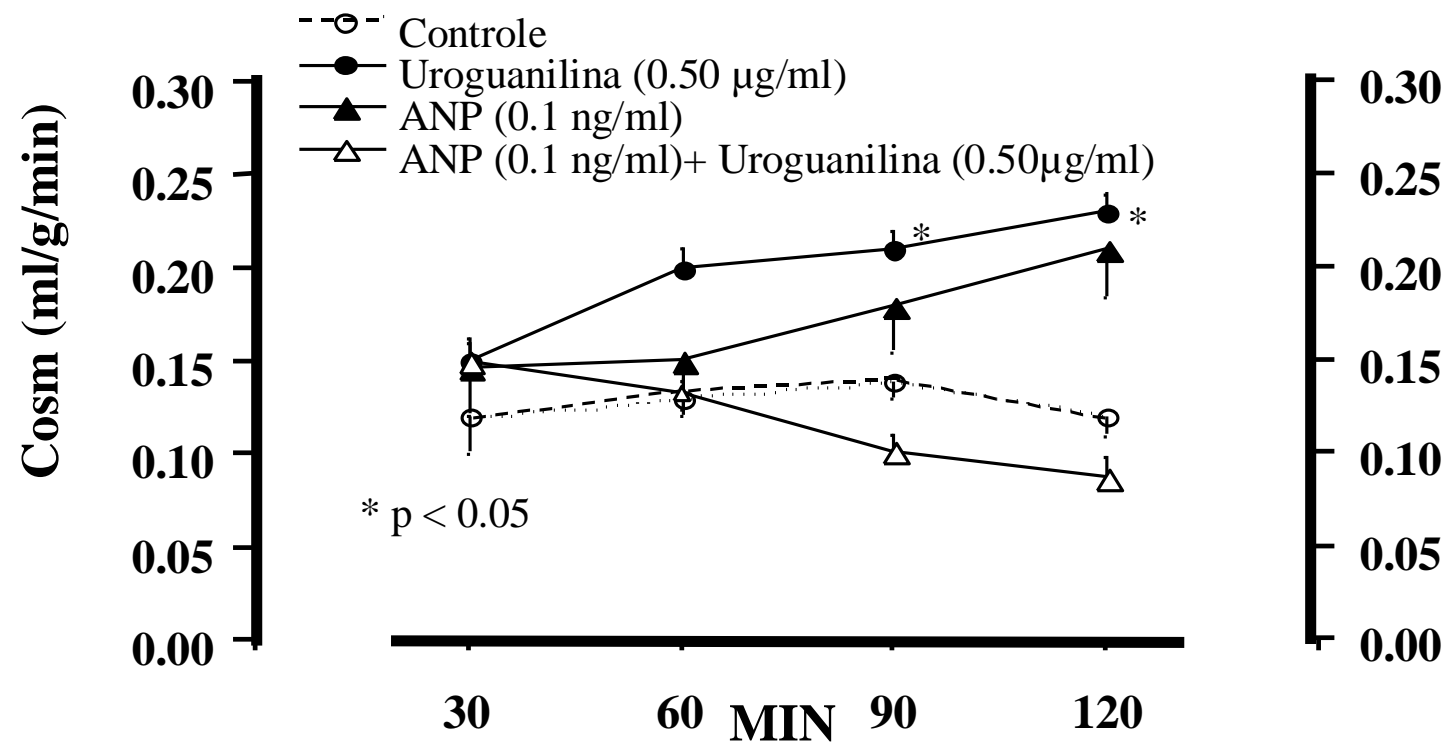
**Figura 13 :** Excreção Fractional de potássio de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 14 :** Fração do transporte tubular de cloreto (%TCl-; %) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



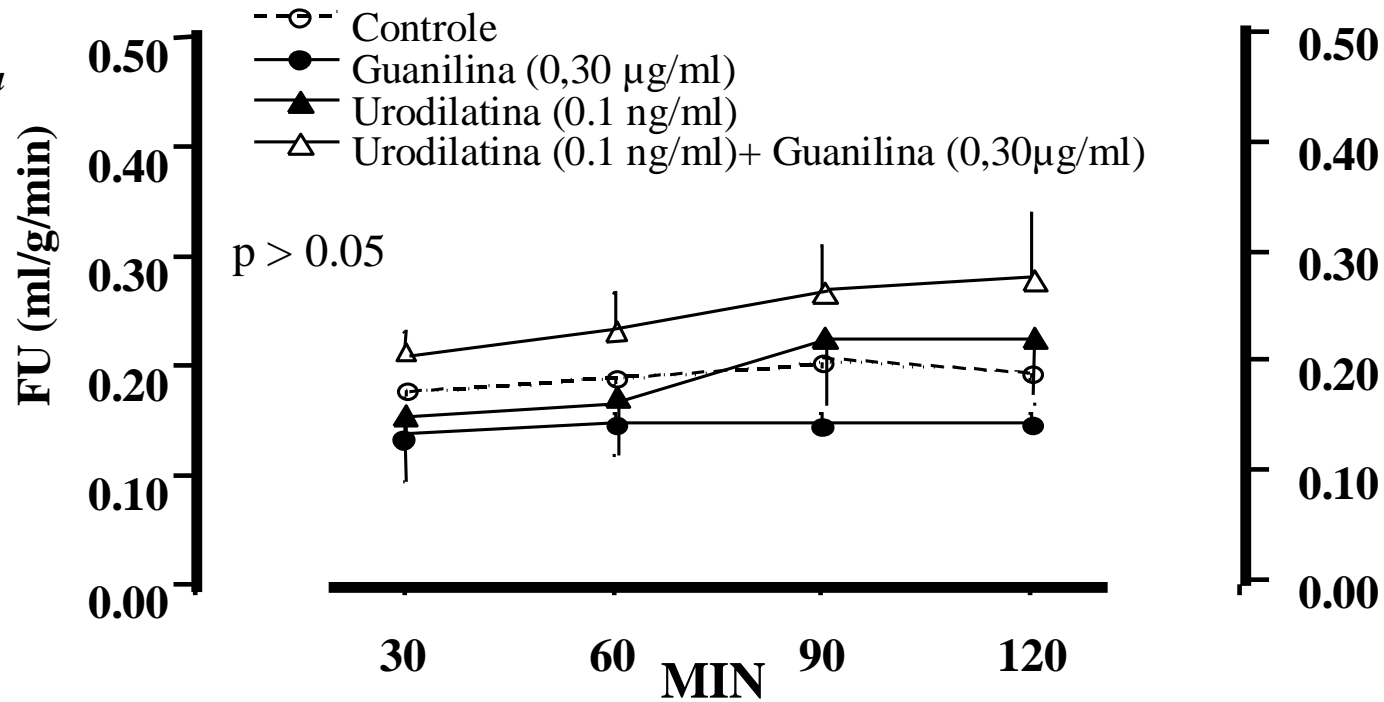
**Figura 15 :** Excreção Fractional de cloreto de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



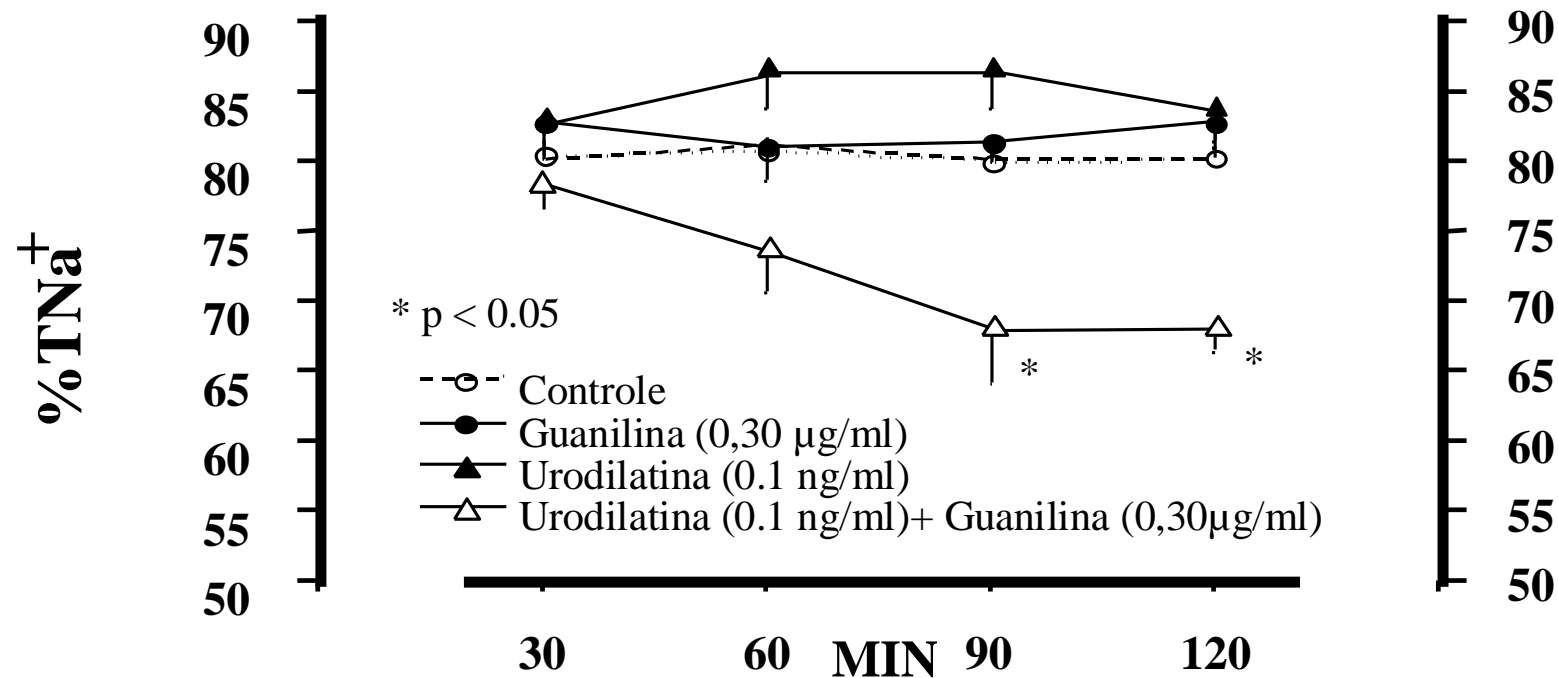
**Figura 16 :** Clearance osmolar (Cosm; ml/g/min) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com ANP (0,1 ng/ml) ou perfundidos com ANP mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



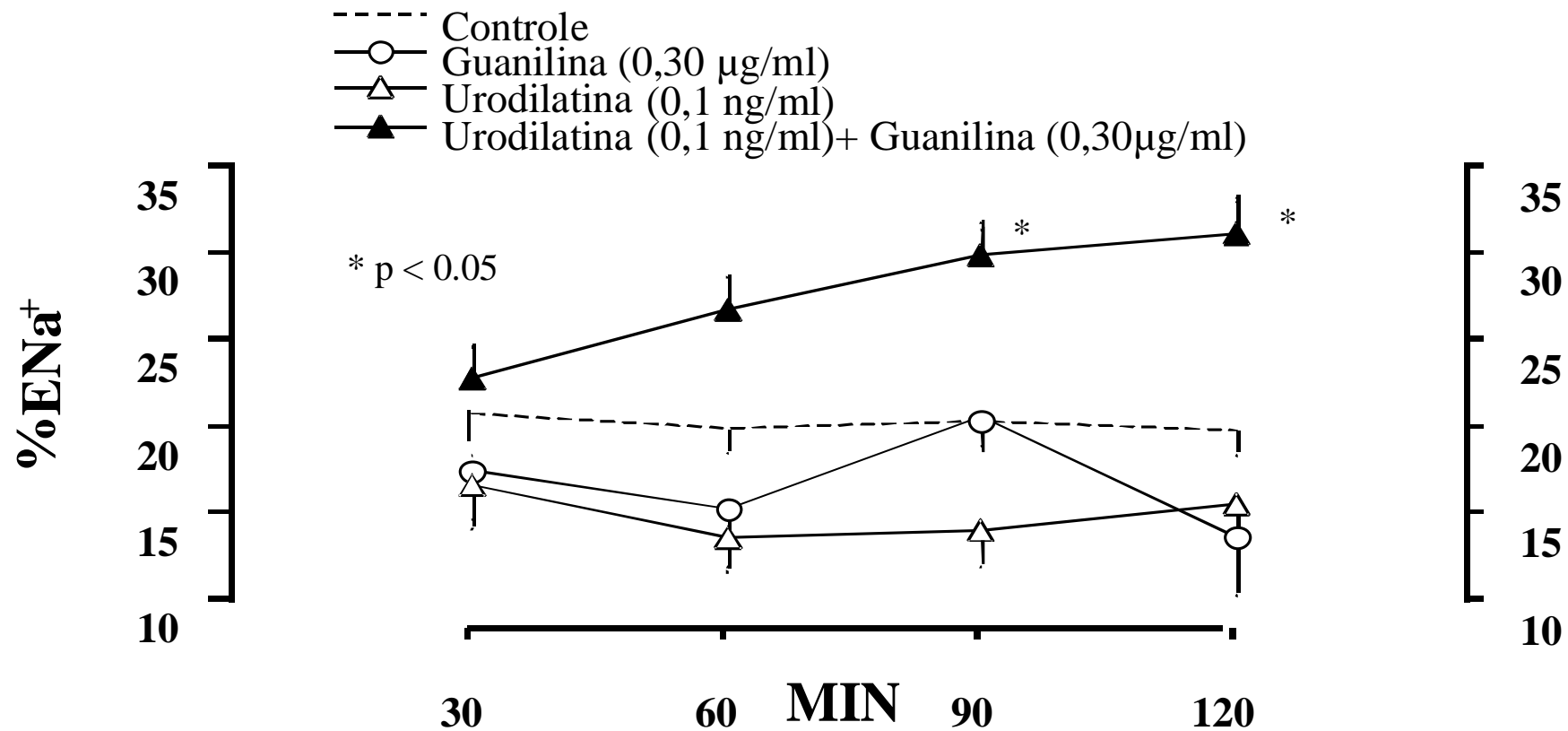
#### 11.4. Urodilatina



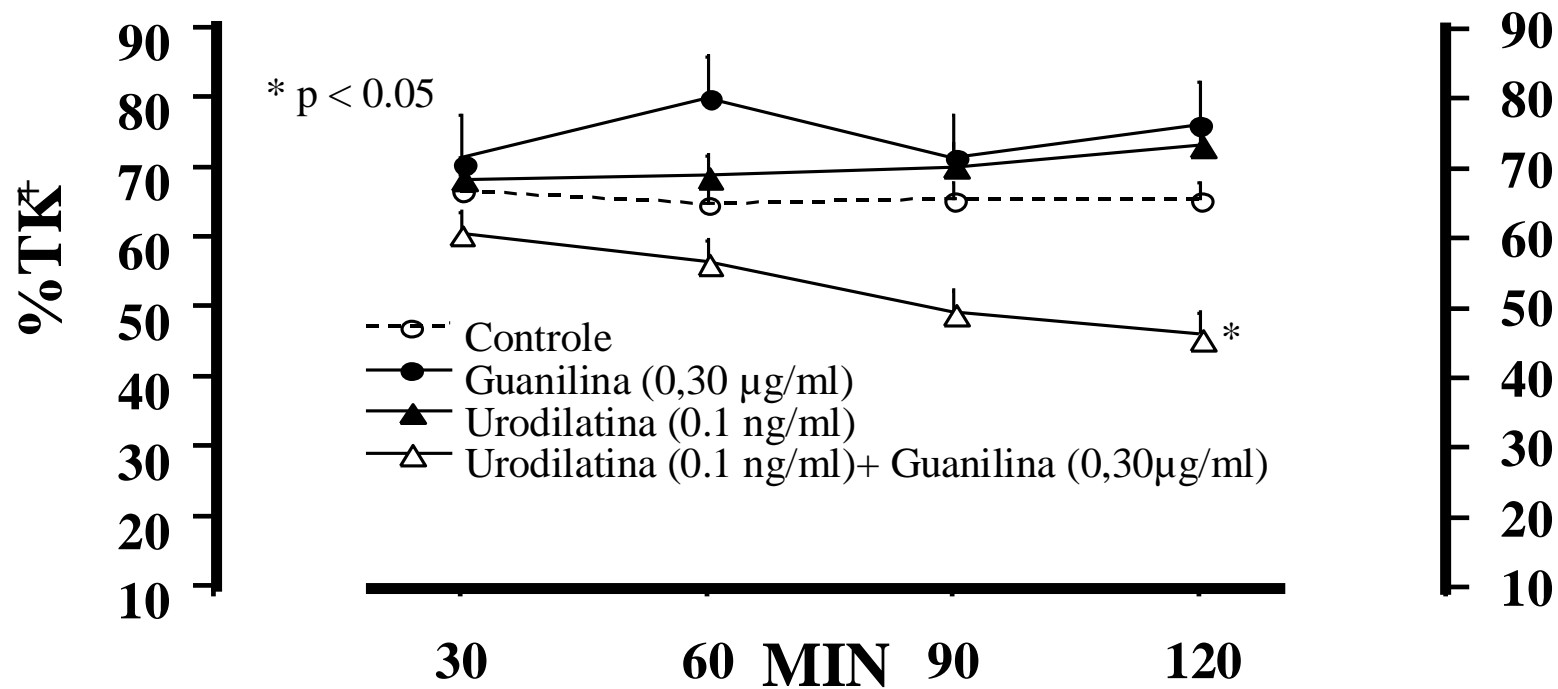
**Figura 1 :** Fluxo urinário (FU; ml/g/nim) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



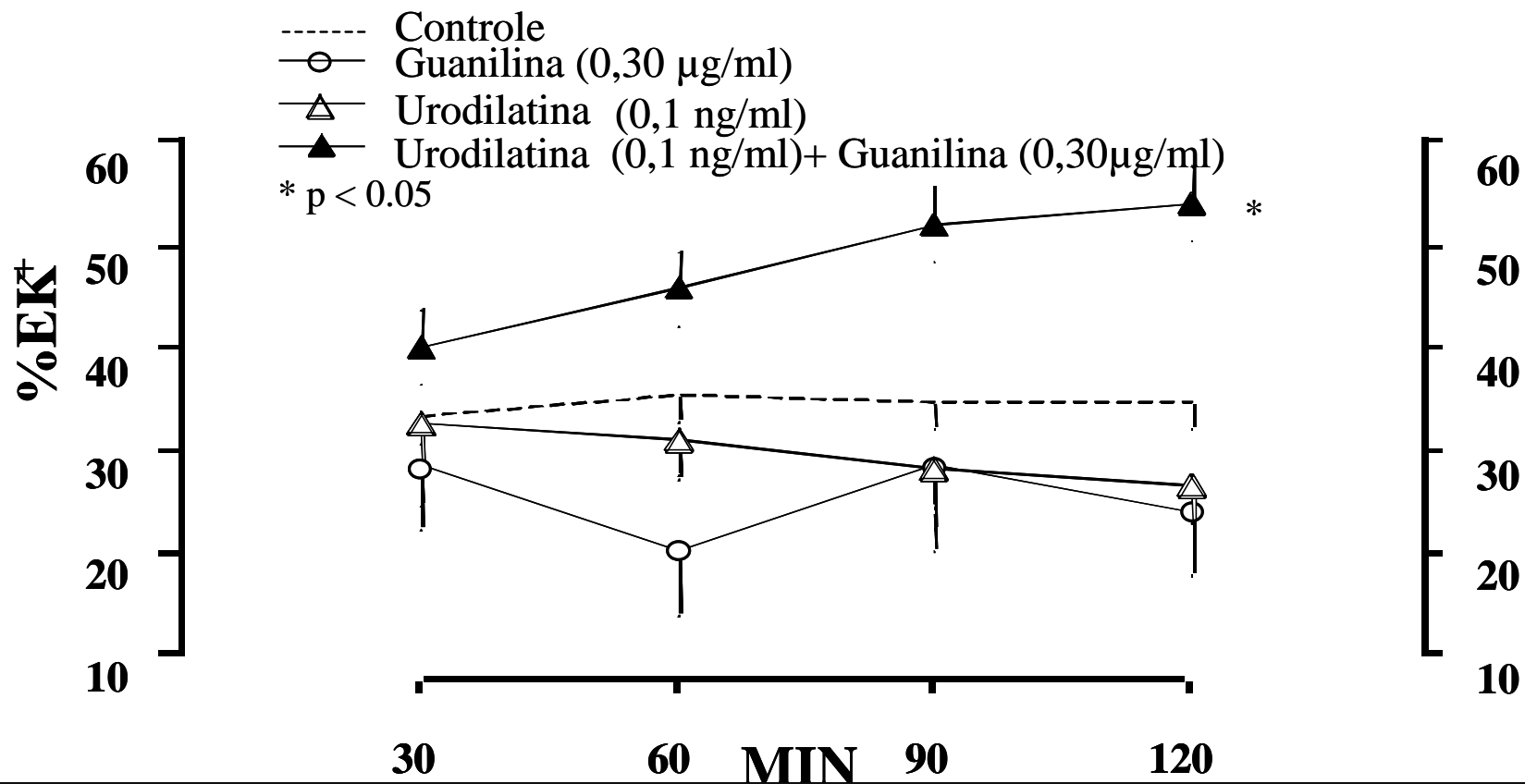
**Figura 2 :** Fração do transporte tubular de sódio (%TNa+; %) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



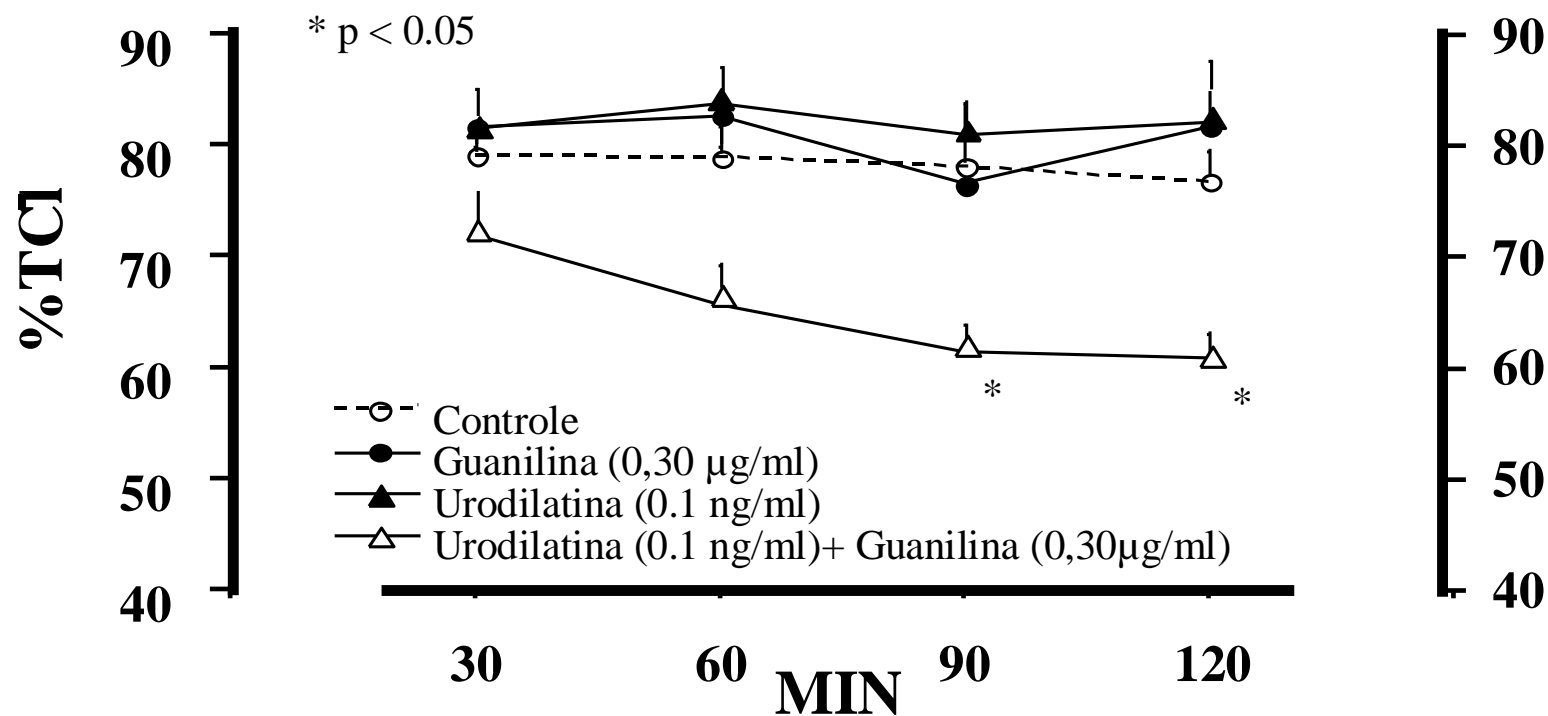
**Figura 3 :** Excreção Fractional de sódio de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



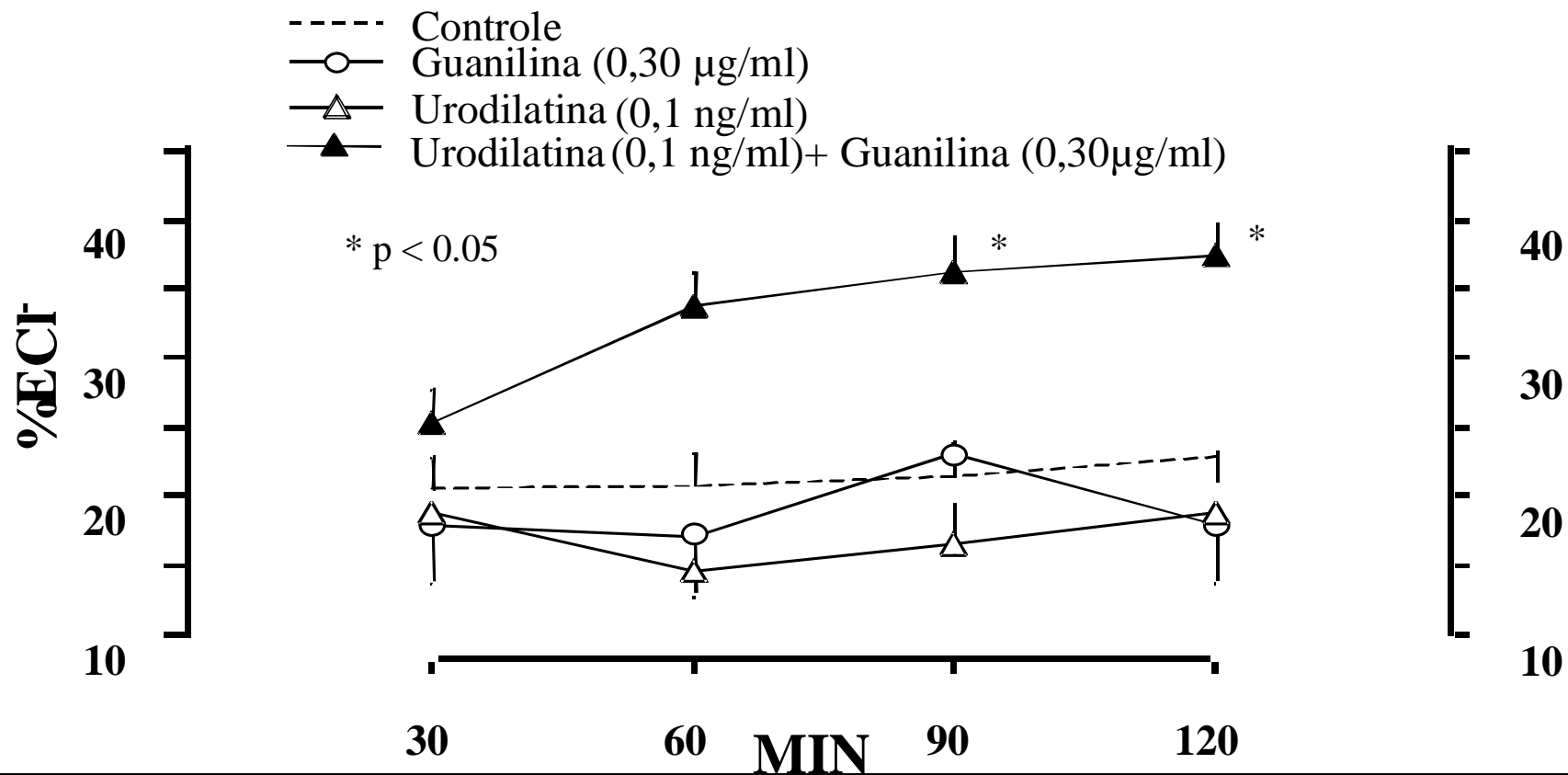
**Figura 4 :** Fração do transporte tubular de potássio (%TK+; %) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



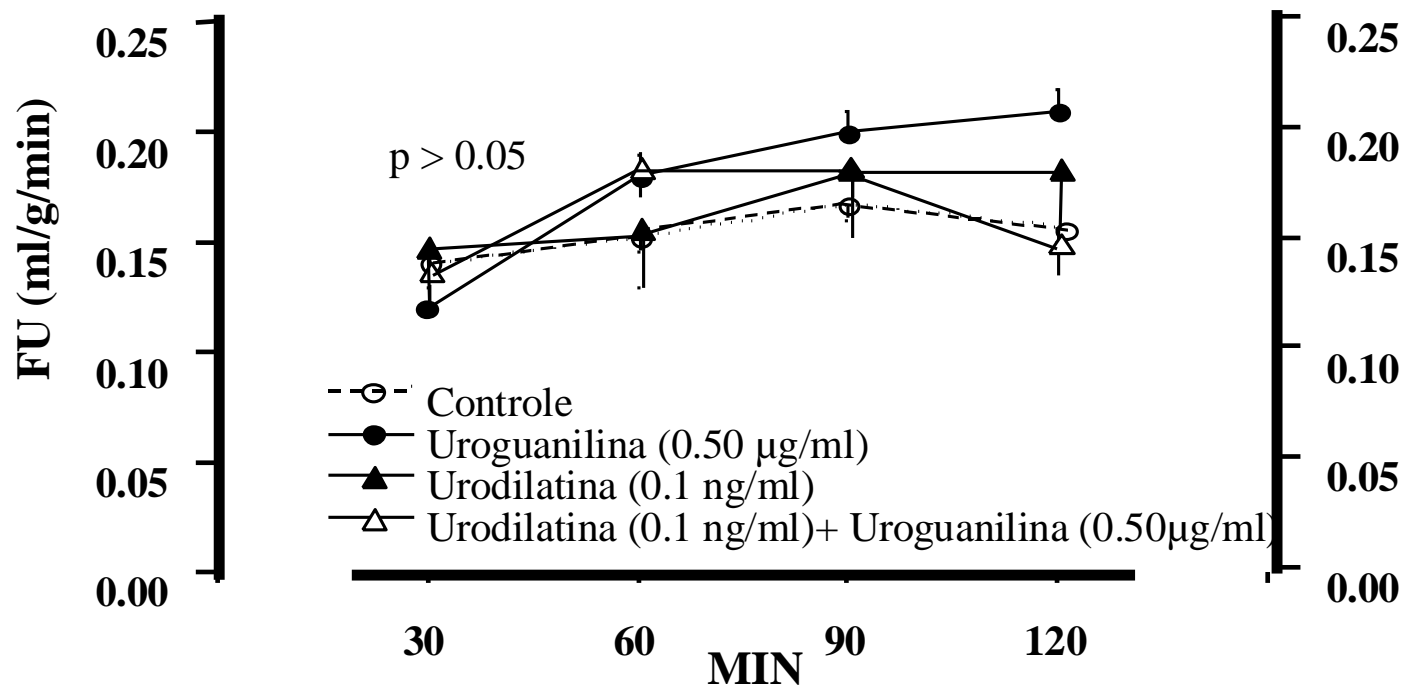
**Figura 5 :** Excreção Fractional de potássio de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 6 :** Fração do transporte tubular de cloreto (%TCl-; %) de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

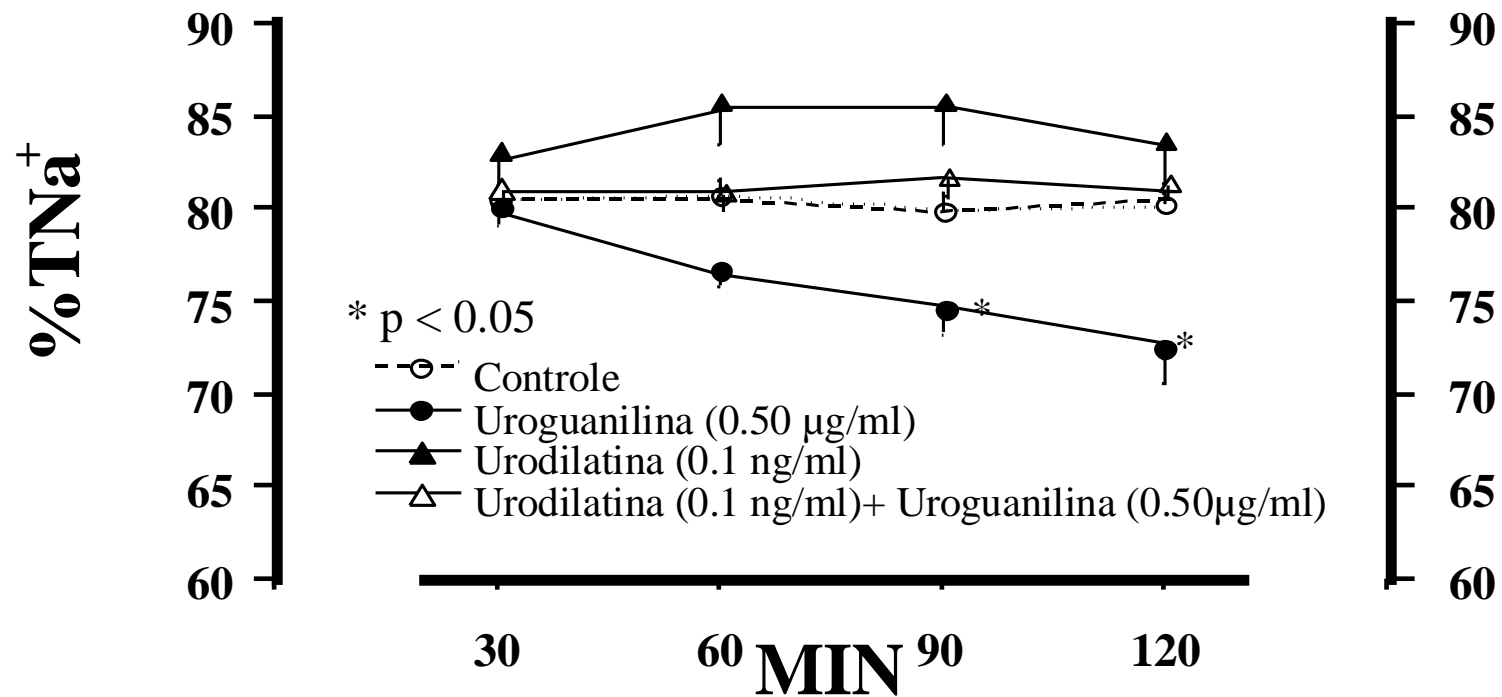


**Figura 7 :** Excreção Fractional de cloreto de rins controle, perfundidos somente com guanilina (0,3µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais guanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

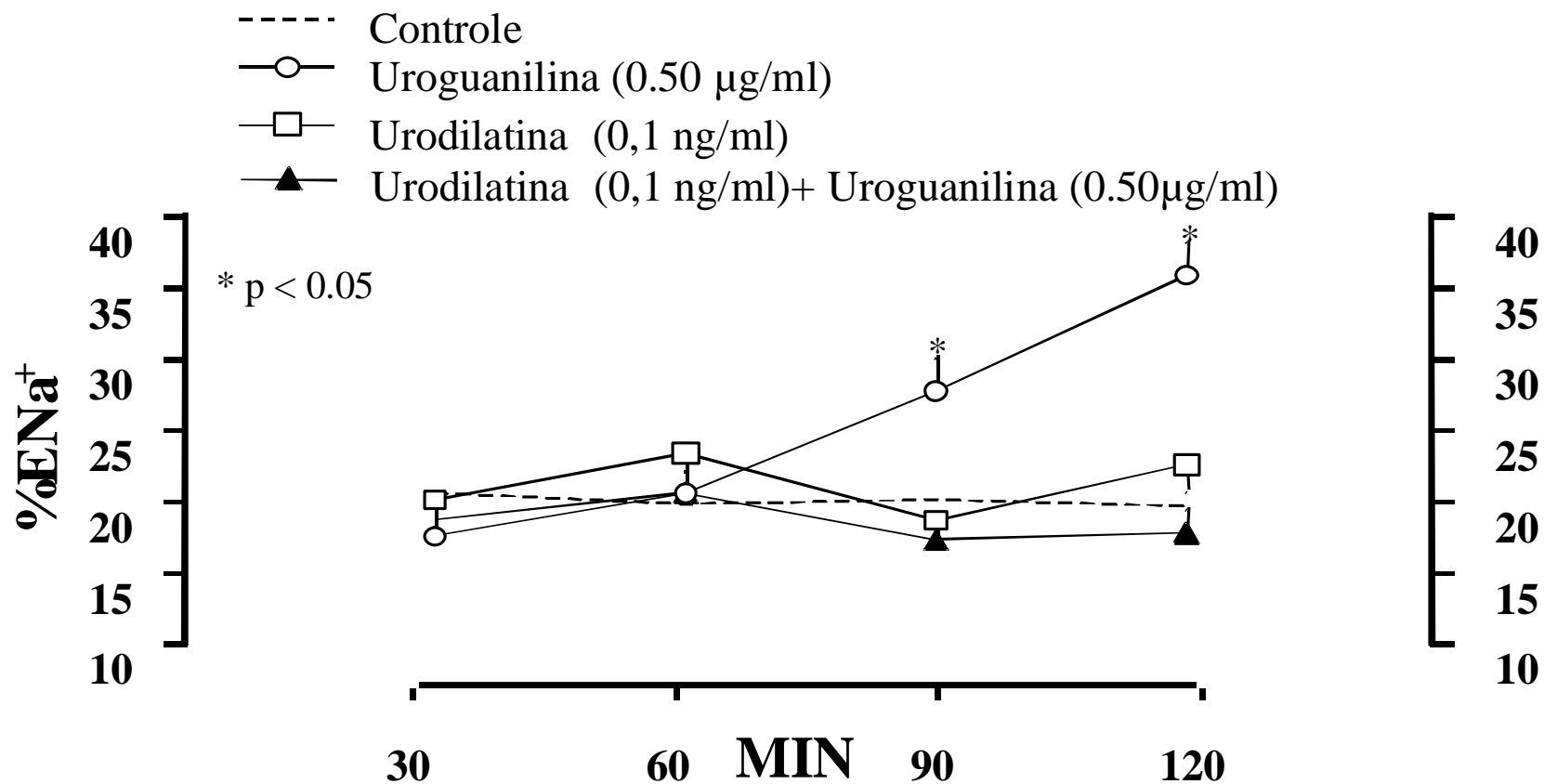


**Figura 8 :** Fluxo urinário(FU; ml/g/nim) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

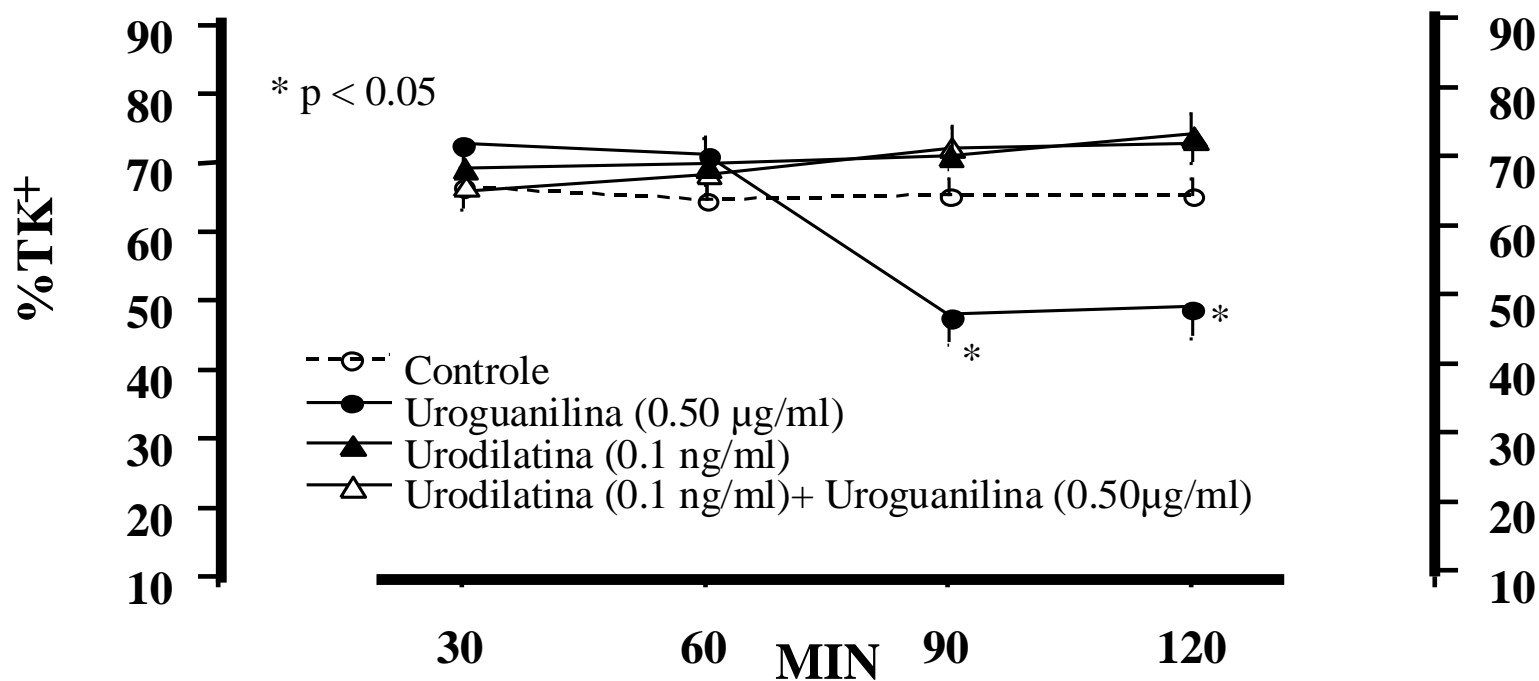




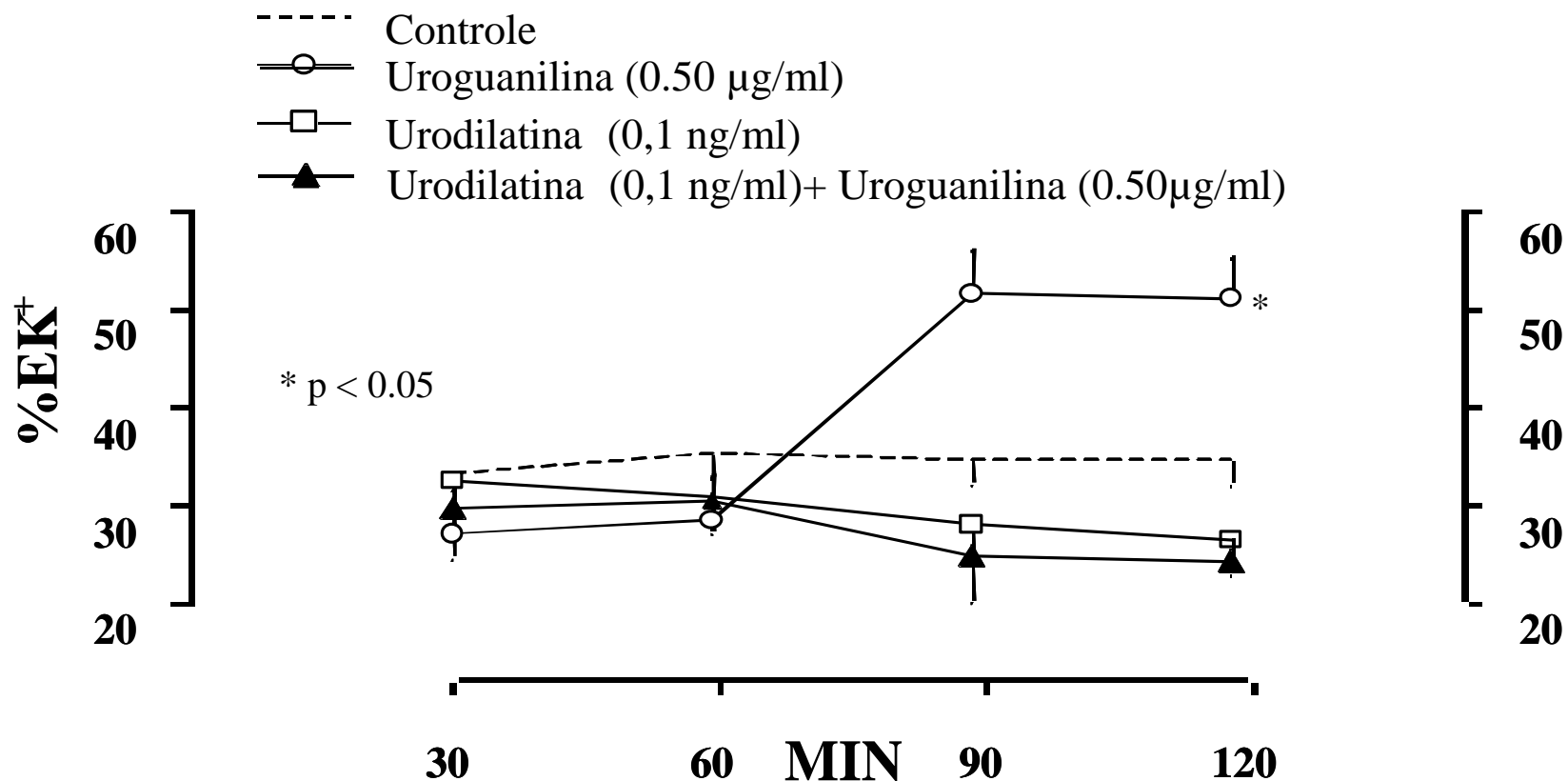
**Figura 9 :** Fração do transporte tubular de sódio (%TNa<sup>+</sup>; %) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



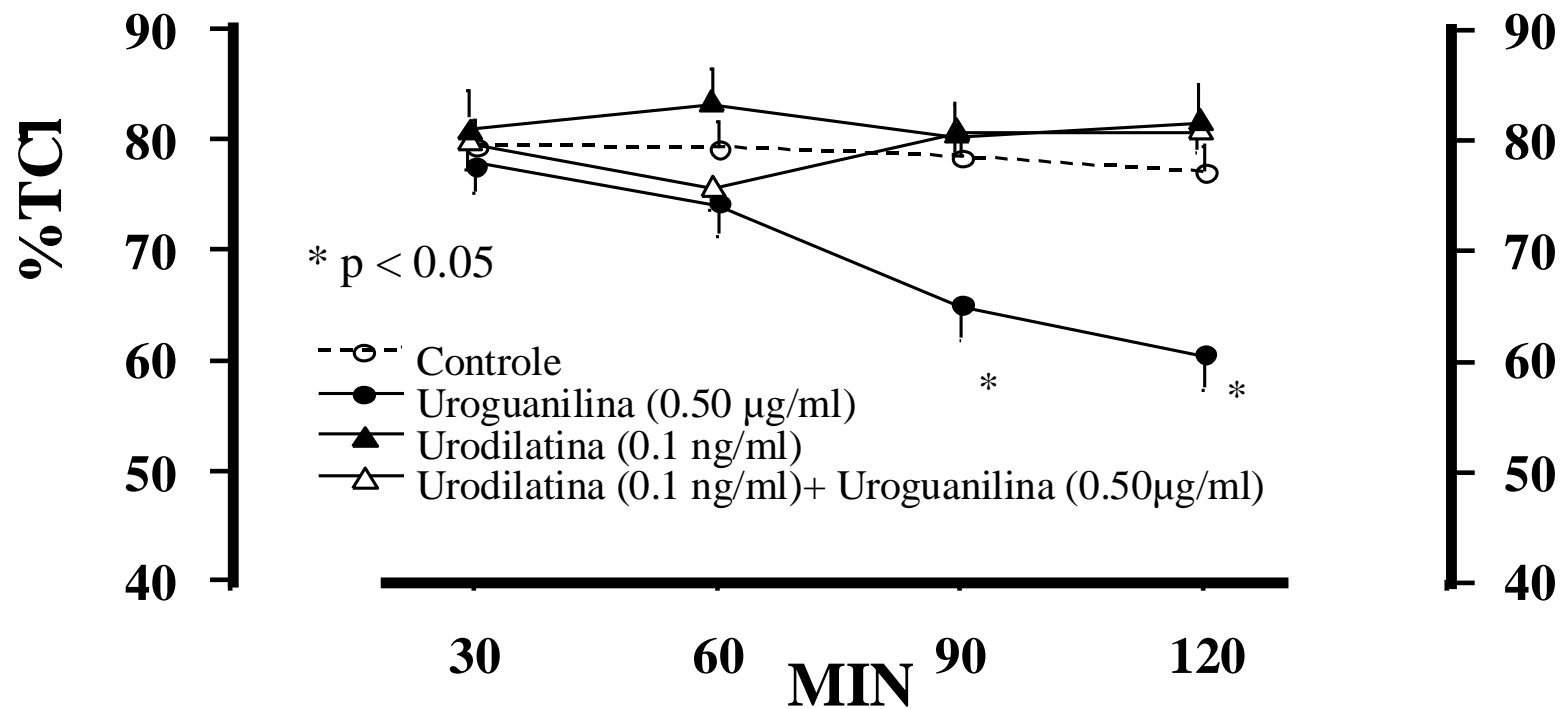
**Figura 10 :** Excreção Fractional de sódio de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com urodilatina mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



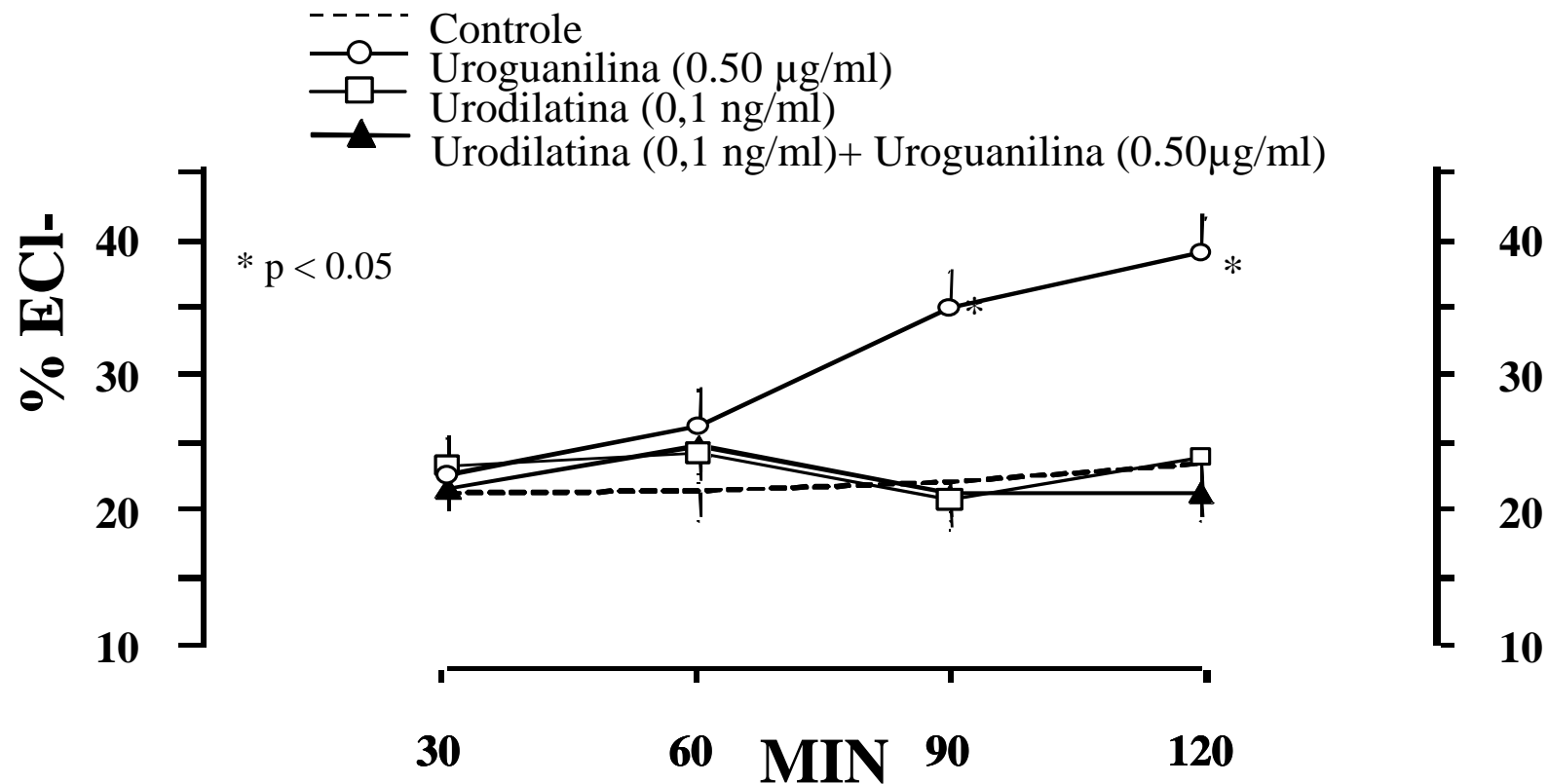
**Figura 11 :** Fração do transporte tubular de potássio (%TK+; %) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 12 :** Excreção Fractional de potássio de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com urodilatina mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 13 :** Fração do transporte tubular de cloreto (%TCl-; %) de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5 µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com Urodilatina mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.



**Figura 14 :** Excreção Fractional de cloreto de rins controle, perfundidos somente com uroguanilina (0,5µg/ml), perfundidos somente com Urodilatina (0,1 ng/ml) ou perfundidos com urodilatina mais uroguanilina segundo o protocolo experimental. Para cada grupo experimental os resultados foram expressos em média e erro padrão da média; n ≥ 04; \* p < 0,05 em relação ao controle interno.

