



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

MESSIAS SIMÕES DOS SANTOS NETO

**UM ESTUDO RENAL DAS INTERAÇÕES ENTRE UROGUANILINA,
URODILATINA E BRADICININA NA PRESENÇA DOS
BLOQUEADORES DA GUANILATO CICLASE ISATIN E ODQ**

**FORTALEZA
2008**

MESSIAS SIMÕES DOS SANTOS NETO

**UM ESTUDO RENAL DAS INTERAÇÕES ENTRE UROGUANILINA,
URODILATINA E BRADICININA NA PRESENÇA DOS
BLOQUEADORES DA GUANILATO CICLASE ISATIN E ODQ**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção de
título de Doutor em Farmacologia.**

**Orientador: Prof Dr. Manassés
Claudino Fonteles**

**FORTALEZA
2008**

S236u Santos Neto, Messias Simões dos

Um estudo renal das interações entre uroguanilina,
urodilatina e bradicinina na presença dos bloqueadores da
guanilato ciclase isatin e ODQ/ Messias Simões dos Santos
Neto. 2008.

189 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

1. Guanilato Ciclase. 2. Oxido Nítrico. 3. Inibidores
Enzimáticos. 4. Bradicinina. 5. Perfusion. 6. Rim. 7. Isatina. I.
Fonteles, Manasses Claudino (Orient.). II. Título.

CDD 615.3

MESSIAS SIMÕES DOS SANTOS NETO

**UM ESTUDO RENAL DAS INTERAÇÕES ENTRE UROGUANILINA,
URODILATINA E BRADICININA NA PRESENÇA DOS
BLOQUEADORES DA GUANILATO CICLASE ISATIN E ODQ**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 28/04/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles (Orientador)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Co-orientadora)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC

Agradeço a Deus os caminhos que me
ofereceu para ser parte na natureza, na
biologia, na vida e em Matheus, Lucas e
Maria Clara

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Manassés C. Fonteles, por ter sido o idealizador e co-responsável pelos experimentos e orientação deste trabalho;

À Profa Dra Helena S. A. Monteiro, pela colaboração voluntaria na redação e revisão desta tese;

Ao Prof Dr Nilberto Nascimento, por sua amizade e singular contribuição na redação e revisão desta tese;

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

À Domingos Barreto de Oliveira, bioquímico, responsável pelas fases de elaboração de soluções e dosagens bioquímicas dos experimentos;

À Bento F. de Oliveira e Juciê A. da Silva, funcionários do biotério que forneceram a maioria dos animais de experimentação;

À Renata de Sousa Alves, Rene Duarte Martins, Isadora Maria de Sousa, Antonio Gomes da Silva Neto, Diego Germano Maia e todos os colegas de doutorado, mestrado ou iniciação científica que contribuíram na confecção da maioria dos experimentos realizados;

Ao Depto de Fisiologia e Farmacologia e à Unidade de Pesquisas Clínicas – UFC/HUWC, pelo suporte docente, físico e administrativo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo co-suporte financeiro.

RESUMO

Introdução: Guanilinas, peptídeos natriuréticos (ANP e urodilatina) e bradicinina estão implicados na fisiopatologia, com potencial terapêutico, do metabolismo do sal e da hipertensão. **Objetivo:** Estudar o mecanismo de ação e possíveis interações destes peptídeos, pelo emprego de inibidores da guanilato ciclase isatina e ODQ. **Método:** Foram realizadas experiências no rim isolado e perfundido de rato com ferramentas farmacológicas, isatina (IS; 0,3 ou 10 μ M) ou com ODQ (37 μ M), nos estudos com uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). Investigaram-se ainda possíveis interações entre os referidos peptídeos. **Resultados:** Isoladamente, IS (0,3 μ M), ODQ, UGN (0,3 μ M), BK (0,9 ou 0,3nM) não interferiram significativamente na pressão de perfusão, na diurese ou na reabsorção tubular fracionada renal de eletrólitos (sódio - %TNa⁺; potássio - %TK⁺; cloreto - %TCI⁻). Nas condições experimentais, ODQ mostrou-se eficaz ($p<0,05$) em inibir os efeitos de BK (1,8nM) sobre a pressão de perfusão (ODQ+BK_{120min}: 111 \pm 3mmHg; BK_{120min}: 139 \pm 5mmHg) e %TNa⁺ (ODQ+BK_{120min}: 80 \pm 1%; BK_{120min}: 76 \pm 2%). IS (3 μ M) mostrou-se parcialmente eficaz em inibir efeitos de UGN (0,6 μ M; IS+UGN_{90min}: 76 \pm 2%; UGN_{90min}: 72 \pm 2%) e de BK (1,8nM; IS+BK_{90min}: 81 \pm 2%; BK_{60min}: 0,76 \pm 2%) sobre %TNa⁺. UD (0,03nM_{90min}: 86 \pm 2%; UGN+UD_{90min}: 73 \pm 4%; $p<0,05$) potencializou a natriurese produzida por UGN (0,3 μ M_{90min}: 83 \pm 2%), cujos efeitos vasculares foram inibidos com BK (0,3nM_{90min}: 104 \pm 5mmHg; UGN_{0,6 μ M}; 90min: 135 \pm 4mmHg; UGN+BK_{90min}: 110 \pm 2mmHg). **Conclusões:** IS e ODQ comprovaram a participação da via de sinalização NO-GMP no mecanismo de ação dos peptídeos estudados. A perfusão simultânea com mais de um peptídio, comprovou que há interações em suas diferentes vias de sinalização.

Palavras chaves: Guanilinas, bradicinina, inibidores da guanilato ciclase, isatina, ODQ, via de sinalização NO-GMP, perfusão renal e transporte de eletrólitos.

ABSTRACT

Introduction: Guanylins, natriuretic peptides (ANP and urodilatina) and bradykinin are involved in the pathophysiology, with therapeutic potential, of salt metabolism and hypertension. **Objective:** To study the mechanism of action and possible interactions of these peptides, with the employment of guanylate cyclase inhibitors isatina and ODQ. **Method:** Experiments were performed on isolated perfused rat kidney with pharmacological tools, isatin (IS; 0.3 or 10 μ M) or with ODQ (37 μ M), in studies with uroguanylin (UGN, 0.3 or 0.6 μ M), bradykinin (BK, 0.3 or 0.9 or 1.8nM) or urodilatin (UD, 0.03nM). It was also investigated possible interactions between those peptides. **Results:** Alone, IS (0.3 μ M), ODQ, UGN (0.3 μ M), BK (0.9 or 0.3nM) did not interfere significantly in perfusion pressure (PP), in diuresis or in fractional renal tubular reabsorption of electrolytes (sodium - %TNa⁺; potassium - %TK⁺; chloride - %TCI⁻). In experimental conditions, ODQ proved to be effective ($p<0.05$) in inhibiting the effects of BK (1.8nM) on the PP (ODQ+BK_{120min}: 111 \pm 3mmHg; BK_{120min}: 139 \pm 5mm Hg) and %TNa⁺ (ODQ+BK_{120min}: 80 \pm 1%; BK_{120min}: 76 \pm 2%). IS (3 μ M) proved to be partially effective in inhibiting effects of UGN (0.6 μ M; IS+UGN_{90min}: 76 \pm 2%; UGN_{90min}: 72 \pm 2%) and BK (1.8nM; IS+BK_{90min}: 81 \pm 2%; BK_{60min}: 0.76 \pm 2%) on %TNa⁺. UD (0.03nM_{90min}: 86 \pm 2%; UGN+UD_{90min}: 73 \pm 4%, $p<0.05$) increased the natriuresis produced by UGN (0.3 μ M_{90min}: 83 \pm 2%), whose vascular effects were inhibited with BK (0.3nM_{90min}: 104 \pm 5mmHg; UGN_{0, 6 μ M; 90min}: 135 \pm 4mmHg; UGN+BK_{90min}: 110 \pm 2mmHg). **Conclusions:** IS and ODQ confirmed the participation of the NO-GMP signalling pathway in the mechanism of action of peptides studied. The infusion simultaneously over a peptide, proved that there are interactions in their different signalling pathway.

Key words: Guanylins, bradykinin, guanylate cyclase inhibitors, isatina, ODQ, NO-GMP signalling pathway, perfused kidney, electrolytes transport.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ilustração esquemática do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). Renina converte o angiotensinogênio, produzido no fígado, em angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA) transforma angiotensina I em angiotensina II. Angiotensina II estimula liberação de aldosterona nas adrenais..... 26
- Figura 2: Ilustração esquemática da estrutura microscópica do aparelho justaglomerular presente nos néfrons renais..... 27
- Figura 3: Lâmina histológica elaborada pelo método hematoxilina-eosina da região cortical do rim. Observam-se o glomérulo renal, separado pelo espaço capsular da cápsula de Bowmann, que constituem os corpúsculos renais; a mácula densa e o túbulo contorcido distal 28
- Figura 4: Esquema ilustrativo do sistema calicreína-cininas. A calicreína atua sobre a fração alfa-2 globulina (cininogênios) produzindo calidina, met-lys-bradicinina ou bradicinina. A ação da cininase I pode gerar produtos ativos para o receptor B1, assim como, cininase II para o receptor B2. 33
- Figura 5: (a) Desenho esquemático do néfron (unidade funcional do rim) e seus componentes: AE - arteriola aferente, AA - arteriola aferente, G – glomérulo, MD – mácula densa, PT – túbulos proximais, LH – alça de Henle, DCT – túbulo contorcido distal, CNT – túbulos conectores, CCD – túbulo coletor cortical. (b) Ilustração das células principais (produtoras de cininogênio), células intercares e células conectoras (produtoras de calicreína). 34
- Figura 6: UGN induz diurese e natriurese significante no camundongo normal (wyld-type) e knockout para GCC (GCC (---). Utilizando o modelo do “sealed-mouse”, UGN (0,5 unidades/g peso corporal) diluído em salina isotônica (excipiente) foi administrada em bolus endovenoso (50 µl) e os parâmetros

acompanhados por 60 minutos. O fluxo urinário (μl/min) e a excreção de sódio (μEq/min) foram mensurados.....	50
Figura 7: UGN induz diurese e natriurese significante no camundongo normal (wyld-type) e knockout para GCC (GCC (---). Utilizando o modelo do “sealed-mouse”, UGN (0,5 unidades/g peso corporal) diluído em salina isotônica (excipiente) foi administrada em bolus endovenoso (50 μl) e os parâmetros acompanhados por 60 minutos. A excreção fracionada de sódio (%) e a excreção urinária parametrizada de GMPC (GMPC/creatinina; nmol/mg) foram mensuradas.....	51
Figura 8: Ilustração esquemática da síntese e estrutura do isatin por Traugott Sandmeyer (1854-1922).....	61
Figura 9: Ilustração da estrutura do ODQ ou 1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinolaxina-1-ona	63
Figura 10: Ilustração esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.	65
Figura 11: Curva de regressão linear da correlação entre a Velocidade da Bomba de Perfusão Renal (eixo da abcissas – X; RPM x 10) e o Fluxo de Perfusão Renal (eixo das coordenadas – Y; ml/min) medido na ponta da cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 2,49 \cdot X + 8,31$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,99$).....	70
Figura 12: Curva de regressão linear da correlação entre a Velocidade da Bomba de Perfusão Renal (eixo da abcissas – X; RPM x 10) e a Pressão de Perfusão Renal (eixo das coordenadas – Y; mmHg) medido no manômetro de mercúrio conectado à cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 9,9 \cdot X - 6,2$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,99$).	71
Figura 13: Curva de regressão linear da correlação entre a Velocidade da Bomba de Perfusão Renal (eixo da abcissas – X; RPM x 10) e o Fluxo de Perfusão Renal (eixo das coordenadas – Y; ml/min)	

medido no fluxômetro, acoplado em série, no sistema de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 7,9 \cdot X - 0,6$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,99$). 72

Figura 14: Curva de regressão linear da correlação entre o Fluxo de Perfusion Renal (eixo da abscissas – X; ml/min) medido no fluxômetro, acoplado em série no sistema de perfusão, e o Fluxo de Perfusion Renal (eixo das coordenadas – Y; ml/min) medido na ponta da cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 0,9 \cdot X + 0,3$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,98$). 73

Figura 15: Curva de regressão linear da correlação entre o Fluxo de Perfusion Renal (eixo da abscissas – X; ml/min) medido no fluxômetro, acoplado em série no sistema de perfusão, e a Pressão de Perfusion Renal (eixo das coordenadas – Y; mmHg) medida no manômetro de mercúrio conectado à cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 1,2 \cdot X - 5,0$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,98$). 74

Figura 16: Ilustração esquemática do Protocolo Geral do tempo de duração dos experimentos. Observe que o período de adaptação não faz parte do período de Tempo Experimental. Os 120 minutos de tempo experimental têm dados coletados a cada 10 minutos e análise em 04 períodos (30min, 60min, 90min e 120min) de 30 minutos cada..... 80

Figura 17: Ilustração esquemática do protocolo experimental para o grupo controle. Observe que o período de perfusão renal do Grupo Controle é 120 minutos e corresponde a totalidade do período de Tempo Experimental. 81

Figura 18: Ilustração esquemática do protocolo experimental para os grupos experimentais em que são estudados os efeitos de somente uma

- substância (peptídeo ou fármaco). Decorrido 30 minutos de perfusão renal, sob as mesmas condições definidas para o Grupo Controle, o peptídeo ou o fármaco é adicionada à solução perfusora. Observe que o período de perfusão renal de 120 minutos, correspondente à totalidade do período de Tempo Experimental, é dividido em 30 minutos iniciais (Controle Interno) e 90 minutos finais (Tempo Tradado)..... 82
- Figura 19: Ilustração esquemática do protocolo experimental para os grupos em que são estudados os efeitos de duas substâncias (fármaco mais peptídeo ou dois peptídeos ou dois fármaco). No início do Tempo Experimental a Substância I é adicionada à solução perfusora. Decorridos 60 minutos, a Substância II é adicionada à solução perfusora. Os 120 minutos de perfusão renal são divididos em 60 minutos iniciais de Tratamento com Substância I e 60 minutos finais de Tratamento com Substância I mais Substância II..... 83
- Figura 20: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B)..... 93
- Figura 21: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B)..... 94
- Figura 22: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B)..... 95

- Figura 23: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B)..... 96
- Figura 24: Cálculo do rítmico de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B)..... 98
- Figura 25: Cálculo do rítmico de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). 99
- Figura 26: Cálculo do rítmico de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B)..... 100
- Figura 27: Cálculo do rítmico de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B)..... 101
- Figura 28: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi

administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). 103

Figura 29: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). 104

Figura 30: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B). 105

Figura 31: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B). 106

Figura 32: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). 108

Figura 33: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). 109

- Figura 34: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B)..... 110
- Figura 35: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B)..... 111
- Figura 36: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B)..... 113
- Figura 37: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B)..... 114
- Figura 38: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B)..... 115
- Figura 39: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também

- administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B)..... 116
- Figura 40: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B)..... 118
- Figura 41: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B)..... 119
- Figura 42: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B)..... 120
- Figura 43: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B)..... 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Parâmetros de Função Renal (símbolos, unidade de medidas, forma de cálculo empregando fórmulas, aparelhos ou método de dosagem ou inferência).....	85
Tabela 2:	Grupos experimentais, período de perfusão das substâncias (00-30 minutos - 30 min; 30-60 minutos - 60 min; 60-90 minutos - 90 min; 90-120 minutos - 120 min) e número de amostras para média e EPM (N).....	91

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AA	Arteriola aferente,
AE	Arteríola aferente
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
BK	Bradicinina
BNP	Peptídeo natriurético do cérebro
CCD	Túbulo coletor cortical
CFTR	Regulador de condutância do canal de cloreto
Cl	Cloreto
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
CNT	Túbulos conectores
DCT	Túbulo contorcido distal
DNP	Dendroaspis Natriuretic Peptide
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FNS	<i>Factor natriureticus similis</i>
FPR	Fluxo Plasmático Renal
FU	Fluxo Urinário
G	Glomérulo
GC	Guanilato ciclase

GCS	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GN	Guanilina
HCO ₃	Bicarbonato
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IS	Isatina
K	Potássio
LH	Alça de Henle
MD	Mácula densa
Na	Sódio
NO	Óxido nítrico
ODQ	H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinolaxina-1
PGI2	Prostaciclina
PLA2	Fosfolipase A2
PP	Pressão de Perfusão
PT	Túbulos proximais
RAA	Renina-angiotensina-aldosterona
RFG	Rítmo de Filtração Glomerular
SCC	Sistema Calicreína-Cinina
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
STa	Toxina termoestável

UD Urodilatina
UFC Universidade Federal do Ceará
UGN Uroguanilina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. DE ÁGUA E SAL SOMOS	23
1.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.....	24
1.3. SISTEMA CALICREÍNA-CININA	30
1.4. PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS	36
1.5. NATRIURESE PÓS-PRANDIAL	39
1.6. NATRIURESE DA ENTEROTOXINA TERMO-ESTÁVEL DA “ESCHERICHIA COLI”	40
1.7. NATRIURESE RELACIONADA À GUANILATO CICLASE C (GCC)	43
1.8. DA ÁGUA E ELETRÓLITOS À VIDA: QUANTOS CAMINHOS!.....	54
2. JUSTIFICATIVA	55
3. OBJETIVOS GERAIS	57
3.2. OBJETICOS ESPECÍFICOS	57
4. MATERIAL E MÉTODO.....	58
4.1. PEPTÍDEOS.....	58
4.2. FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS.....	59
4.3. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	63
4.4. SISTEMA E SOLUÇÃO PARA PERFUSÃO	64
4.5. SOLUÇÃO PERFUSORA	68
4.6. CALIBRAÇÃO DO SISTEMA	68
4.7. TÉCNICA DE ABORDAGEM CIRÚRGICA	75
4.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	76
4.9. PROTOCOLO EXPERIMENTAL GERAL	76
4.10. ANÁLISE BIOQUÍMICA	84

4.11. FÓRMULAS DOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL	84
4.12. ESTATÍSTICA DESCRIPTIVA E ANALÍTICA	87
5. RESULTADOS	89
5.1. VALIDAÇÃO DO GRUPO CONTROLE	89
5.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS PROTOCOLADOS.....	90
6. DISCUSSÃO.....	122
7. CONCLUSÕES.....	141
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
9. ANEXOS.....	183

1. INTRODUÇÃO

1.1. *De água e sal somos*

O sal é uma substância essencial ao homem e indispensável a todos os tipos de vida animal na forma como as conhecemos. Podemos constatar a importância do papel desempenhado pelo sal, através dos diversos registros da história da humanidade. A sua produção e utilização estão registradas em ilustrações e escritos que datam do início da civilização. A salga dos alimentos já era um costume bastante difundido no Egito Antigo, cerca de 4.000 anos antes da era Cristã, e gregos e romanos utilizavam o sal também como moeda para suas operações de troca de mercadorias. A palavra latina "salário" deriva do vocábulo sal, uma vez que em sal se pagava uma parte do soldo das legiões romanas. Ainda hoje um dos principais acessos a Roma se chama "Via Salaria" - caminho utilizado pelas caravanas que conduziam sal para a capital do Império (Carneiro *et al.*, 2003).

"A rough estimate is that the total amount of salt spent during these five seconds in each one of us was no more than a few grains. Only a fistful of salt to set a whole Concert Hall thinking!" (nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/presentation-speech.html). Em Estocolmo, aos 10 de dezembro de 2003, o Profesor Gunnar von Heijne sugeriu aos participantes do ato de entrega do prêmio Nobel realizar uma experiência simples: pensar durante cinco segundos. A seguir, refletindo sobre a ação, disse que desde a mais complexa atividade cerebral até a formação de urina pelos rins, tudo somente é possível graças a um dos compostos químicos mais simples imagináveis: sal, íons sódio, potássio e cloreto. Passando de um lado a outro das

membranas das células, este movimento de água e sais é o meio nobre que faz existir bactérias, plantas e mamíferos (Etcheverry, 2004).

Convém lembrar ainda que a fisiologia do sal e da água envolve um delicado equilíbrio entre fatores vasoconstritores, retentores sal, vasodilatadores e expoliadores sal. Está claro que no rim, em particular nos túbulos, os fatores vasodilatadores e expoliadores de sal são importantes na manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico, imprescindível para a regulação da pressão arterial normal. Sabemos que vários hormônios são implicados na regulação da homeostase da água e de eletrólitos, como, por exemplo: sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina, peptídeo natriurético atrial (ANP, do inglês atrial natriuretic peptide), peptídeo natriurético do cérebro (BNP, do inglês brain natriuretic peptide) e o peptídeo natriurético tipo C (CNP). Os diversos hábitos alimentares proporcionam extrema variabilidade de NaCl na dieta e exigem complexos mecanismos fisiológicos para conservação de sódio do corpo (Weinberger, 1990; De Bold *et al.*, 1981).

1.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O rim desempenha um papel crucial na homeostase do volume de fluidos, regulando os níveis de NaCl total dos organismos vivos (Weinberger, 1990). O sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido considerado como um sistema humorai clássico, cujo produto final, a angiotensina II (AII), formada na circulação, tem um papel fundamental na regulação da homeostase cardiovascular, atuando tanto sobre a regulação do volume sanguíneo como na regulação da resistência vascular. Essencialmente, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) funciona da seguinte forma: O substrato angiotensinogênio, uma glicoproteína secretada principalmente pelo fígado, é clivado pela renina, uma aspartil protease produzida pelo rim, liberando o decapeptídeo

angiotensina I (AI). A enzima conversora de angiotensina (ECA), uma metaloprotease produzida pelas células endoteliais, principalmente do pulmão, age sobre AI excluindo dois aminoácidos da porção carboxi terminal, liberando o octapeptídeo angiotensina II (AII), um potente vasoconstritor (Reudelhuber *et al.*, 1995). AII estimula a secreção de Aldosterona da córtex suprarrenal que promove o aumento da reabsorção distal de NaCl, e, como consequência, reduz a sua excreção, ao tempo que aumenta a excreção de potássio e magnésio.

As células justaglomerulares produzem renina a partir da pró-renina - um precursor inativo. Na mácula densa, dentro dos grânulos secretores, a pró-renina é convertida em renina ativa. A liberação na corrente sanguínea é estimulada por depleção do volume extracelular, diminuição da pressão arterial sistêmica, redução na pressão de perfusão arterial renal, redução na carga de sódio que chega à mácula densa, aumento da atividade do nervo simpático renal e vários hormônios incluindo AII, vasopressina e prostaglandinas. A síntese e a liberação de renina constituem a chave inicial de regulação da cascata enzimática que irá induzir a produção de AII (Neves *et al.*, 1996; Gomez, 1990).

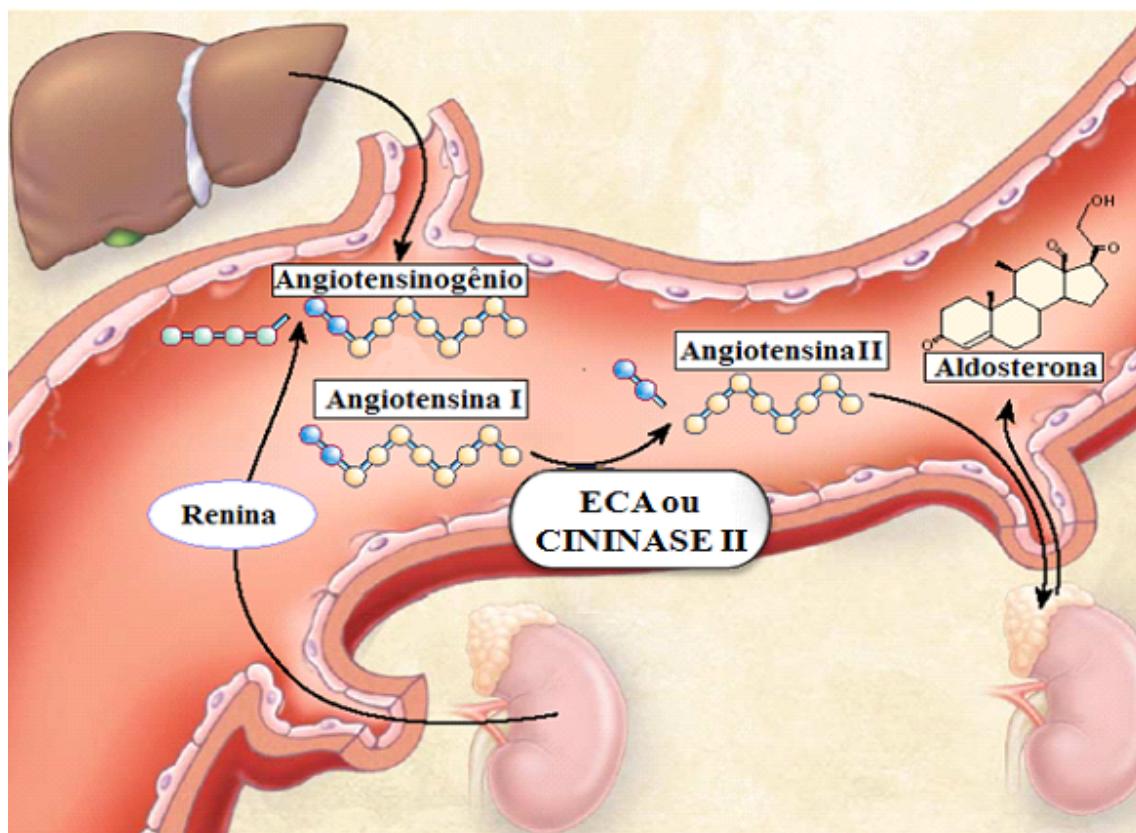


Figura 1: Ilustração esquemática do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). Renina converte o angiotensinogênio, produzido no fígado, em angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA) transforma angiotensina I em angiotensina II. Angiotensina II estimula liberação de aldosterona nas adrenais (PINTO, 2006).

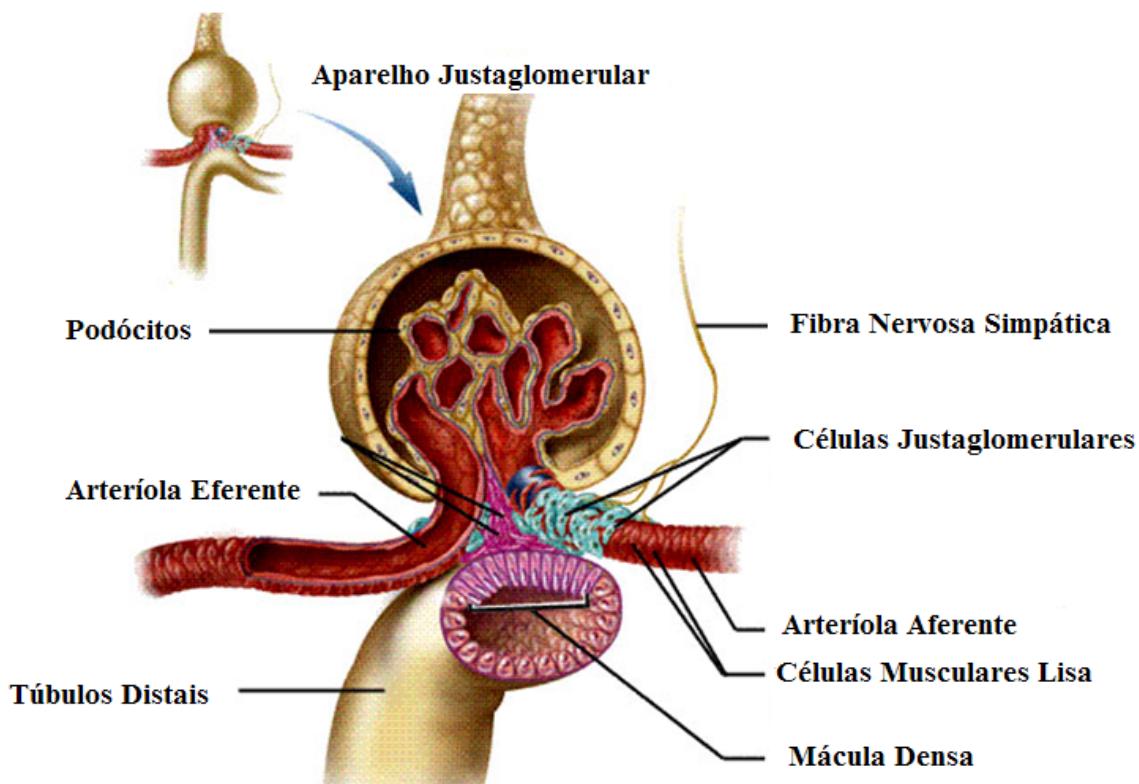


Figura 2: Ilustração esquemática da estrutura microscópica do aparelho justaglomerular presente nos néfrons renais. (PINTO, 2006)

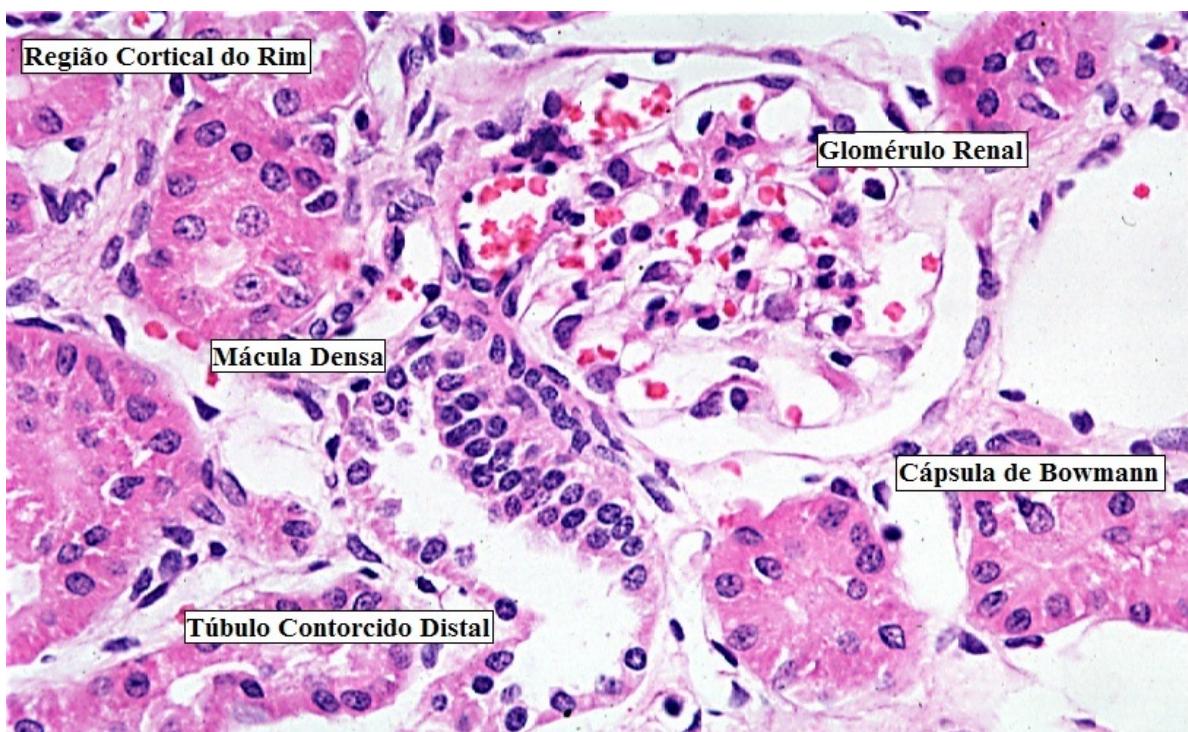


Figura 3: Lâmina histológica elaborada pelo método hematoxilina-eosina da região cortical do rim. Observam-se o glomérulo renal, separado pelo espaço capsular da cápsula de Bowmann, que constituem os corpúsculos renais; a mácula densa e o túbulo contorcido distal.

Fisiologicamente, o sistema RAA é um mecanismo que promove a conservação de NaCl reduzindo sua perda. AII atua não somente como um hormônio circulante, podendo, também, ser formada localmente em vários tecidos, atuando como um hormônio autócrino ou parácrino induzindo um amplo espectro de efeitos sobre o sistema cardiocirculatório. A maioria das ações conhecidas da Ang II é mediada pela ativação de receptores do tipo AT1.

Ang II apresenta outros efeitos que não hemodinâmicos ou renais. AII produz vasoconstrição, antinatriurese, secreção de aldosterona, ativação simpática, inibição da

síntese de renina, crescimento e proliferação celular e controle da formação de matriz extracelular (De Gasparo *et al.*, 2000)

Mesmo tendo sido isolada inicialmente do plasma, a localização mais proeminente da ECA é a porção luminar de células endoteliais de todos os vasos sanguíneos. Está localizada no parênquima do coração, rins, cérebro e adrenais. Está ancorada à membrana plasmática destas células, podendo ser considerada uma enzima tecidual.

O primeiro inibidor da ECA, isolado de uma fração peptídica do veneno da *Botropsis jararaca*, foi inicialmente descrito, há cerca de 40 anos, por Ferreira (Ferreira *et al.*, 1965), como um “fator potencializador da BK”. Captopril é derivado deste fator e, por sua vez, foi o primeiro inibidor da ECA efetivo por via oral (Ondetti *et al.*, 1977).

Patologicamente, AII, via receptor AT1, está implicada diretamente no remodelamento cardiovascular tecidual, alterando o prognóstico não somente de portadores de hipertensão arterial, mas, também, de inúmeras outras doenças cardiovasculares (ou a elas associadas) como: insuficiência cardíaca; infarto do miocárdio; diabetes tipo 2; falência renal e nefropatia diabética (Dzau *et al.*, 2002).

Bloqueio do SRA com inibidores da ECA resultam em significativa redução da mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca ou pós-infarto do miocárdio. Como os benefícios na sobrevida foram demonstrados com diferentes inibidores da ECA e todos têm mecanismo de ação comum, esse importante efeito é atribuído a todos os inibidores da ECA. (Pfeffer *et al* 1992; 1991; 1993; Torp-Pedersen & Kober 1999). Os inibidores da ECA com diferentes afinidades pela ECA tecidual apresentam o mesmo significado clínico.

Os primeiros estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o captopril inibia a atividade da ECA e seus efeitos hipotensores produzidos pela Ang I. Pensava-se que o efeito anti-hipertensivo dos inibidores da ECA era diretamente relacionado à inibição da produção de Ang II. Se assim fosse como explicar que:

- Captopril reduz pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos com atividade da renina e ECA plasmática normal, ou em pacientes hipertensos não-dependentes de renina;
- Tratamento crônico com captopril reduz pressão arterial, assim com a AII em níveis circulantes de pacientes hipertensos não tratados;
- Efeitos teciduais dos inibidores da ECA (fibrose, hipertrofia vascular e cardíaca, proliferação de capilares sanguíneos) não se relacionam com redução da pressão arterial.

Inibição da conversão de Ang I em Ang II não explica satisfatoriamente todos os efeitos anti-hipertensivos e teciduais dos inibidores da ECA. Por outro lado, o impedimento da ECA em degradar bradicinina poderia aumentar concentrações plasmáticas e/ou teciduais desse peptídeo. Cininas têm efeitos hipotensor, anti-hipertróficos (hipertrofia ou remodelamento cardíaca e vascular), antiisquêmicos, produzidos pelos inibidores da ECA (Dzau *et al.*, 2002).

1.3. Sistema Calicreína-Cinina

Veneno de jararaca misturado ao sangue de cachorro quando testado em ileum isolado de cobaias reduziram suas contrações. Os cientistas pretendiam testar a histamina, comum em venenos de cobras, e esperavam uma contração de musculatura

lisa. Em 1948, no Instituto Biológico, Rocha e Silva, Wilson Teixeira Beraldo (professor da faculdade de medicina da USP) e Gastão Rosenfeld (Instituto Butantã) descobriram a bradicinina (BK). A contração era mais lenta, intensa e desaparecia em poucos minutos, o que levou Rocha e Silva a atribuí-la a uma nova substância batizada de bradicinina (bradys = lento, kinesis = movimento) (Aguiar, 2001).

Sabemos hoje que o Sistema Calicreína-Cinina (SCC) Renal é composto por um complexo conjunto multi-enzimático, do qual os principais elementos são:

- Enzima calicreína,
- Substrato cininogênio
- Hormônios efetores ou cininas, dentre os quais se encontra a bradicinina (BK e lysyl-BK),
- Enzimas metabólicas (entre as mais relevantes encontram-se a cininase I, cininase II ou enzima conversora de angiotensina (ECA) e endopeptidase neutra NEP) e um número ainda desconhecido de ativadores e inibidores de calicreína e cininases.

Este sistema parece participar de inúmeros processos complexos, tais como controle do volume extracelular, regulação da pressão sanguínea, controle da excreção de sódio e água, resistência vascular renal e liberação de renina. Assim, o conhecimento morfo-fisiológico deste sistema constitui alvo de grande interesse, sobretudo em anormalidades que eventualmente estejam associadas como hipertensão e diabetes melito.

Podemos descrever de forma simplificada que, neste sistema, as procalicreínas dão origem às calicreínas que, agindo sobre cininogênios, liberam cininas; aminopeptidases

convertem precursores de bradicinina em bradicinina; cininases degradam tanto a bradicinina quanto seus precursores (Rocha e Silva *et al.*, 1949). A bradicinina liga-se a receptores específicos da membrana plasmática; há poucos anos foi descoberto que seu efeito é mediado por liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina, e é metabolizada principalmente pela ação da cininase II - enzima conversora de angiotensina – ECA (Regoli *et al.*, 1994; Hecker *et al.*, 1994). Bradicinina tem participação nos mecanismos de controle do tônus vascular. Contudo, os túbulos distais do rim expressam todos os componentes do sistema calicreína-cinina. Em situações de acúmulo de sal (p.ex.: ingestão elevada ou no hiperaldosteronismo) este sistema renal promove diurese e natriurese sem interveniência do sistema plasmático.

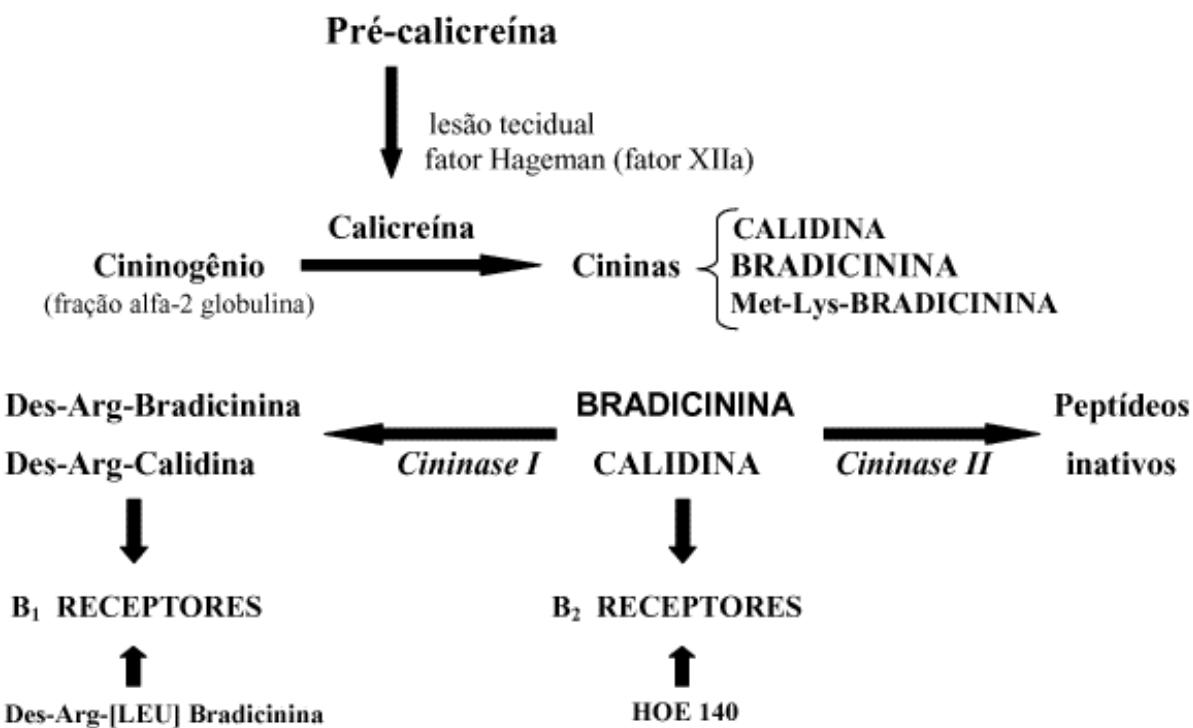


Figura 4: Esquema ilustrativo do sistema calicreína-cininas. A calicreína atua sobre a fração alfa-2 globulina (cininogênios) produzindo calidina, *met-lys-bradicinina* ou bradicinina. A ação da cininase I pode gerar produtos ativos para o receptor B1, assim como, cininase II para o receptor B2 (Ramalho, 2000).

O Sistema Calicreína-Cininas (SCC) está concentrado nos túbulos renais, que produzem calicreína e, também, são os mesmos que excretam potássio. Abaixo dos túbulos distais do nefron, há cininógeno, o substrato natural da calicreína que é o precursor de cininas, substâncias ativas. Coincidentemente, animais hipertensos e pacientes com hipertensão essencial sensível ao sal apresentam reduzida excreção de calicreína renal na urina (Katori *et al.*, 2003).

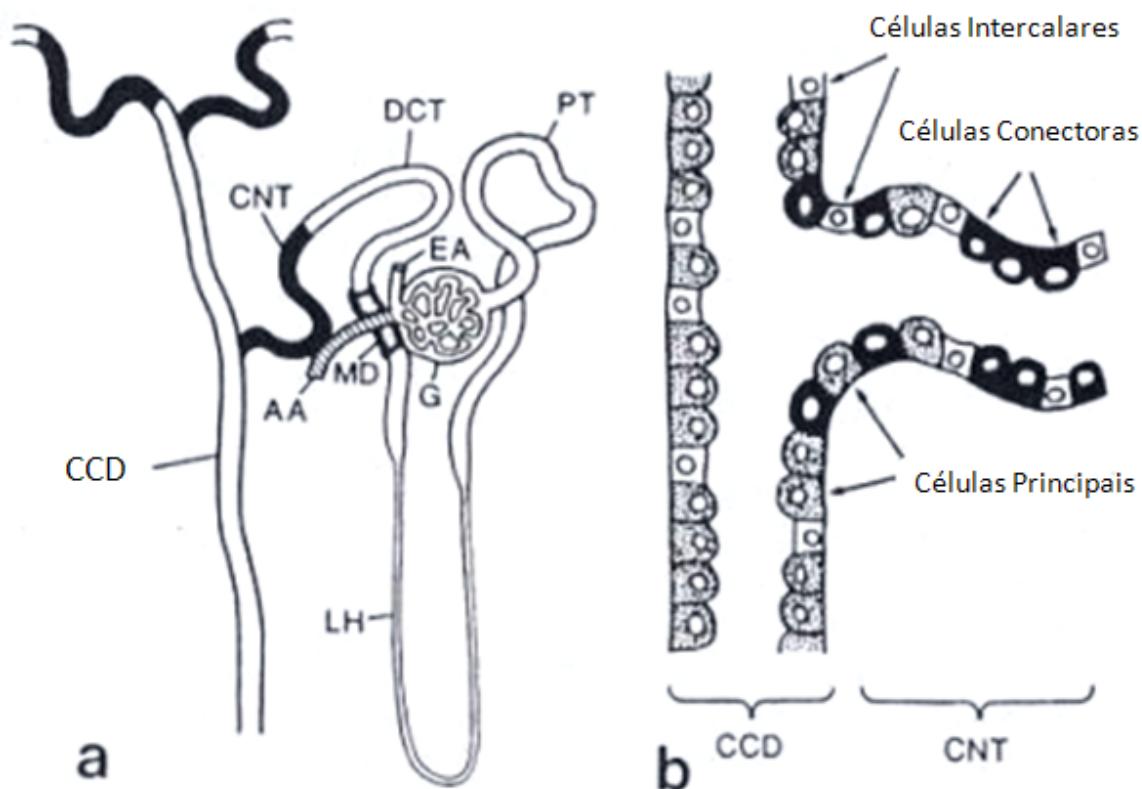


Figura 5: (a) Desenho esquemático do néfron (unidade funcional do rim) e seus componentes: AE - arteriola aferente, AA - arteriola eferente, G – glomérulo, MD – mácula densa, PT – túbulos proximais, LH – alça de Henle, DCT – tubulo contorcido distal, CNT – tubulos conectores, CCD – tubulo coletor cortical. (b) Ilustração das células principais (produtoras de cininogênio), células intercares e células conectoras (produtoras de calicreína) (Bhoola *et al.*, 1992).

A BK desencadeia seus efeitos biológicos por atuar em dois subtipos de receptores, B1 e B2. A estimulação dos receptores B2 nas células endoteliais leva à liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI2), os quais são capazes de produzir vasodilatação. Por sua vez, inibidores da ECA aumentam a liberação de NO e PGI2, efeito que tem sido relacionado à estimulação de receptores B2. Entretanto,

potencializações dos efeitos da BK, produzidos pelos inibidores da ECA, têm sido relatadas em condições experimentais nas quais não se observa um aumento nas concentrações desse peptídeo, sugerindo que os efeitos dessas drogas não estejam totalmente relacionados a um menor metabolismo da BK e, portanto, uma maior biodisponibilidade. Mais recentemente, vários estudos têm demonstrado a existência de uma interação entre o receptor de BK e ECA; a inibição da ECA levaria ao aumento da atividade espontânea do receptor B2 e estabilização/re-sensibilização desses receptores em um estado de alta afinidade, potencializando o efeito da BK (Erdos *et al.*, 1999). Outras ações que poderiam explicar os efeitos dos inibidores da ECA estão relacionadas ao metabolismo de AI por vias independentes da ECA, bem como a ações intracelulares mediadas por essa enzima. Assim, a inibição da ECA causa aumento nos níveis de AI tecidual que pode ser hidrolisada por outras enzimas, o que levaria à formação dos peptídeos A1-9 e A1-7, dentre outros fragmentos. Estes fragmentos de AI também são capazes de potencializar os efeitos da BK (Maia *et al.*, 2004). Os inibidores da ECA aumentam a fosforilação do resíduo de serina, presente na cadeia citoplasmática da ECA o que desencadeia uma série de reações intracelulares que resultam na fosforilação da proteína c-Jun (um dos componentes do complexo AP-1, importante regulador da expressão gênica) e sua posterior translocação para o núcleo da célula, sugerindo uma via de sinalização celular mediada pela própria ECA, a qual pode afetar a expressão gênica. Nesse sentido, os inibidores da ECA são capazes de causar aumento na expressão da ciclooxygenase-2 em células endoteliais, o qual é acompanhado de um incremento na síntese e liberação de PGI2 (Kohlstedt *et al.*, 2005). Esses resultados explicariam como o tratamento crônico com inibidores da ECA induz aumento na produção de PGI2 em humanos e sugere um mecanismo de ação adicional.

Uma vez que o rim possui todos os componentes de um sistema calicreína-cinina completamente funcional (Scicli *et al.*, 1986), os efeitos da bradicinina nos mecanismos de controle da pressão arterial renal são de considerável interesse. Por exemplo, alguns pacientes com hipertensão essencial têm níveis mais baixos de calicreína na urina do que controles normotensos (Scicli *et al.*, 1986; Margolius *et al.*, 1995). Cepas de ratos com níveis plasmáticos baixos de cininogênio (Majima *et al.*, 1993), níveis de calicreína urinários baixos (Mededdu *et al.*, 1997) e camundongos mutantes “knockout” para receptor B2 apresentam hipertensão sensível ao sal (Alfie *et al.*, 1997).

1.4. Peptídeos Natriuréticos

Os peptídeos natriuréticos (ANP's) têm significativa participação na regulação das funções renais, cardiovasculares e humorais (De Bold *et al.*, 1981; Kone, 2001; Vesely, 1999; Lisy & Burnett, 1999; Schirger *et al.*, 1999). O peptídeo natriurético atrial foi descrito por de Bold, em 1981. São secretados como um pré-hormônio que, em seguida, dão origem ao pró-ANP amino-terminal (t-N) e ao ANP ativo. Apresentam propriedades natriuréticas, vasodilatação, inibidores da renina e supressora de crescimento. São conhecidos os seguintes tipos de ANP:

- O tipo A é o ANP (do inglês “Atrial Natriuretic Peptide”). É um polipeptídeo de 28 aminoácidos que formam um anel de 17 aminoácidos unidos por uma ligação disulfídica entre dois resíduos de cisteína. Há uma extensão carboxilo-terminal que dá a atividade biológica;
- O tipo B é o BNP (do inglês “Brain Natriuretic Peptide”). Origina-se no miocárdio, embora fosse inicialmente encontrado no cérebro, é um polipeptídeo de 32 aminoácidos que formam um anel de 17 aminoácidos semelhantes ao ANP;

- O tipo C é o CNP (do inglês Natriuretic Peptide C). Produzido pelo endotélio, apresenta dois sub-tipos: C-53 e C-22 (de acordo com o número de aminoácidos de cada) que também formam um anel de 17 aminoácidos mas carecem do terminal carboxila. Estão presentes em quantidades muito reduzidas no coração.
- A Urodilatina, um quarto ANP, tem um ProANP formado no rim por aminoácidos 95-126. Consiste de 32 aminoácidos que formam o mesmo anel dos tipos anteriores e apresenta um terminal carboxila. Circula em baixos níveis no plasma (9-12 pg / ml).
- O DNP (do inglês “Dendroaspis Natriuretic Peptide”) foi originalmente isolado do veneno da serpente Green Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) em 1999. Apresenta 38 aminoácidos, é encontrado também em humanos (plasma e átrio) e possui efeito natriurético e vasodilatador em coronárias (Schirger *et al.*, 1999).

Os ANP exercem suas ações através do aumento do GMPc intracelular a partir de GTP. Ativam 2 receptores biologicamente ativos de guanilato ciclase (GC) particulada: A (GCA) e B (GCB).

Existe ainda um terceiro receptor com papel de “clearance” (depuração).

Os ANP's podem estar envolvidos na regulação e remodelamento vascular (Marumo *et al.*, 1995). Intervêm, em conjugação com NO e GMPc, nos efeitos promotores de crescimento produzidos pela noradrenalina sobre cardiomiócitos (Calderone *et al.*, 1998). Além disso, através da redução da pré-carga, melhoraram a função ventricular (Lainchbury *et al.*, 2000) e interferem no desenvolvimento de fibroblastos. São

vasodilatadores e inibem o crescimento de células vasculares. ANP e BNP são liberados pelo coração durante o estiramento miocárdico. CNP é liberado pelo endotélio e causa vasodilatação por relaxamento muscular (Stingo *et al.*, 1992; Münxel *et al.*, 2003).

A ação diurética dos ANP se deve a hemodinâmica renal e a ações tubulares diretas (Brenner, 2004). O ANP aumenta a taxa de filtração glomerular por vasodilatação da arteriola aferente (Melo & Ackerman, 2000) e inibe a reabsorção tubular de sódio e água nos túbulos distais e coletores do rim (Flynn *et al.*, 1983). Produz natriurese através da inibição da reabsorção de sódio na porção medular do duto coletor (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). O aumento de GMPc, induzido por ANP, nas células mesangiais causa relaxamento das mesmas. O ANP aumenta a excreção de sódio e água contribuindo para o balanço hidroeletrolítico. ANP inibe tanto o transporte de sódio e água no túbulo proximal induzido por AII quanto o transporte tubular de água no túbulo coletor por antagonismo da vasopresina. Inibe também as ações tubulares distais da aldosterona. Por outro lado, provoca aumento do aporte de sódio à mácula densa inibindo a secreção de renina e a produção de AII. CNP tem pouca ou quase nenhuma ação diurética (Stingo *et al.*, 1992).

Há elevação dos níveis de ANP circulante em até 10 vezes na insuficiência cardíaca congestiva quando ocorre excessiva distensão das paredes de ambos os átrios. Assim, aumento nas perdas renais de sal e água, previne sintomas extremos na insuficiência cardíaca congestiva (Globits *et al.*, 1998). Por outro lado, os efeitos renais do ANP somente se manifestam com pressão arterial normal ou alta. Se há baixos valores de pressão arterial, mesmo grandes quantidades de ANP não aumentam a natriurese ou a diurese (Kida *et al.*, 1986). Esta limitação sugere que o ANP não desempenha um papel significativo no dia-a-dia da homeostase do NaCl e este age, sobretudo, em momentos de expansão aguda de volume.

Urodilatina, análogo renal do ANP sintetizado no túbulo distal e duto coletor, age paracrinamente e inibe a reabsorção de NaCl e água nessa região (Drummer *et al.*, 1996).

1.5. Natriurese Pós-prandial

Desde a década de 1970, diversas pesquisas sugerem que sensores de sódio no sistema digestivo monitoram a ingestão de sal. Durante muito tempo postulou-se a liberação de uma substância do sangue que aumentaria a excreção urinária de sódio durante uma carga pós-prandial do sódio (Lennane *et al.*, 1975; Carey, 1978). O NaCl administrado por via oral é mais rapidamente excretado que o equivalente aplicado por via venosa (Carey *et al.*, 1976). Os dados destes pesquisadores suportam o conceito de que a ingestão e a absorção de NaCl resulta na geração de sinais celulares que chegam ao rim para que este órgão inicie o ajuste necessário da excreção de sódio, compensando o excesso de carga absorvida.

A regulação hormonal na excreção de sal e água pelos rins saldo tem sido muito estudada. Antes de 1961, acreditava-se que o ritmo de filtração glomerular e a aldosterona controlavam o balanço de sódio no organismo. Há quase 50 anos, em 1961, deWardener e col. mostrou que, quando estas duas variáveis eram controladas, ainda assim, o rim era capaz de aumentar a excreção de sódio em resposta a uma carga de sal. Evidências sugeriam a existência de um terceiro fator como modulador definitivo da excreção de sódio pelo rim. No entanto, a natureza do fator III, suspeito agente natriurético, permaneceu desconhecida (De Wandener *et al.*, 1961). Mais tarde, Carey demonstrou que a excreção urinária de sódio é significativamente mais elevada no período de quatro horas imediato a uma sobrecarga oral de NaCl na dieta (Carey *et al.*, 1976; Carey, 1978). Quando comparada em relação à via oral, a infusão de certa carga

de sódio, por via intravenosa, resulta em menor excreção urinária de cloreto de sódio dentro do mesmo período.

A expressão e ativação do ANP não são influenciadas diretamente por sobrecarga oral de sódio. Assim, acredita-se que um mediador putativo “fator natriurético intestinal” seria capaz de ligar o intestino aos rins, como meio de regular a excreção renal com capacidade de fazer face à ingestão de sal da dieta.

Os mecanismos fisiológicos que contribuem para natriurese pós-prandial são provavelmente numerosos e redundantes, dada a importância da homeostase do sódio.

1.6. Natriurese da Enterotoxina Termo-Estável da “*Escherichia coli*”

No início dos anos 80, os efeitos diuréticos, caliuréticos e natriuréticos da toxina termoestável (STa, do termo em inglês termo-stable) da *E.coli* foram descobertos pelo laboratório de Fisiologia Renal e Metabólica, fundado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC pelo Prof. Dr Manassés Fonteles. Esta descoberta constitui uma das primeiras dissertações de Mestrado do grupo de pesquisadores em Farmacologia e hoje é avaliada como uma contribuição seminal, uma vez que essa toxina era imputada apenas como simples agente causador de diarréia infantil e da chamada diarréia de turista (Field *et al.*, 2003). A propósito, foi através de isolados de fezes de crianças de Pacatuba – a partir de um projeto de extensão da UFC – que foi extraída, de uma das cepas de *E.coli*, uma toxina mais potente, tanto na indução de diarréia, quanto em suas ações renais. A primeira publicação adveio em 1983, no Congresso Brasileiro de Fisiologia (Lima *et al.*, 1983), quase 10 anos antes, portanto, do isolamento das guanilinas por Currie e colaboradores (Currie *et al.*, 1992), trabalhando, então, na empresa Monsanto.

Diversas pesquisas têm corroborado, progressivamente, nos últimos 20 anos, a existência de um novo eixo endócrino entre o intestino e o rim. A enterotoxina bacteriana termo-estável (ST, do inglês “thermo-stable”) da *E. coli* é uma causa mundial de diarréia secretória. Lima *et al* (1992) demonstram que a natriurese e a caliurese da enterotoxina de Escherichia Coli ST e do 8-bromo monofosfato cíclico de guanosina (GMPc, do inglês cyclic guanosine monophosphate) em rins perfundidos de rato são produzidos de forma dose-dependente. Estes efeitos sugerem a existência de um peptídeo endógeno, que se assemelha à enterotoxina ST e regula a função do transporte tubular do sódio renal (Lima *et al.*, 1992). ST estimula a guanilil ciclase e aumenta o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) o que também induz secreção de cloreto em epitélios tubulares renais e intestinais (Field *et al.*, 1978; Forte *et al.*, 1989; Carpick & Gariepy, 1993).

1.6.1. Identificação e Classificação do Receptor de Membrana

A elevada afinidade da ST da *E. coli* por uma região específica da membrana celular com repercussões na produção de GMPc sugeriu que se tratava de um receptor de membrana celular (particulado) relacionado com a guanilato ciclase. Sabe-se que a guanilato ciclase existe na forma particulada e na forma solúvel. A primeira encontra-se ligada à membrana citoplasmática e apresenta domínios intracelulares, extracelular e transmembranar. A guanilato ciclase solúvel no citoplasma pode ser ativada pelo óxido nítrico. Cada uma das formas é codificada por genes diferentes (Drewett *et al.*, 1994; Crane *et al.*, 1992; Currie *et al.*, 1992). Peptídeos natriuréticos atriais, STa e peptídeos da guanilina podem estimular a guanilato ciclase particulada (na membrana plasmática).

1.6.2. Subtipos de Guanilato Ciclase (GC) Particuladas

Existem alguns subtipos de receptores. Sabe-se que o ANP pode ativar os subtipos GCA e GCB. STa e guanilinas ativam o subtipo GCC (Drewett *et al.*, 1994; Fasano *et al.*, 1998).

A afinidade da ST da *E. coli* por uma região específica da membrana celular permitiu a identificação do seu receptor como sendo a guanilato ciclase C (GCC), receptor da membrana plasmática celular com maior densidade de expressão no intestino e presente em todos os tecidos onde se comprova a atividade da ST (Field *et al.*, 1978; Schulz *et al.*, 1990). A hiperestimulação da produção do GMPc pela ST de *Escherichia Coli* produz grande aumento na secreção intestinal de líquido e eletrólitos, causando sua característica diarréia aquosa. Esta toxina é também responsável pela diarréia de turista (Hughes *et al.*, 1980).

1.6.3. Estrutura da Guanilato Ciclase C (GCC)

O receptor da STa caracteriza-se por ser uma proteína de 240 kDa (GCC). Tendo sido identificado por clonagem molecular de cDNA's intestinais de ratos e humanos, o GCC apresenta-se como o receptor de superfície celular para STa, guanilina e uroguanilina. Embora apresente alguma 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; Forte *et al.*, 1996).

GCC 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 NH₂-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, uma sequência de aminoácidos muito bem conservada. Este domínio catalítico e a região hidrofóbica transmembranar são similares aos GCA e GCB. A sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico e a região transmembrana apresenta homologia com proteínas quinases. Em adição, GCC apresenta ~70 resíduos adicionais à região catalítica. Segundo Garbers (Garbers *et al.*, 1990; Garbers *et al.*, 1990;) esta seqüência é rica em glutamina e serina e parece estar envolvida com ancoragem de GCC ao citoesqueleto (Schulz *et al.*, 1990).

1.6.4. Sinalização da GCC

No trato gastrointestinal, a guanilato ciclase C (GCC) é um receptor apical de membrana que possui um domínio catalítico intrínseco. A ativação deste receptor aumenta a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que por sua vez estimula de modo eletrogênico a secreção de Cl^- e HCO_3^- através do regulador de condutância do canal de cloreto (CFTR; Forte *et al.*, 1993). Guanilina, uroguanilina e a toxina termo estável STa, secretada pela bactéria entérica *E.coli* e pelo vibrião da cólera, induzem a movimentação de íons para o lúmen entérico ou como descrito por Fonteles e col. em 1998, no rim perfundido, induzem natriurese e caliurese.

1.7. Natriurese relacionada à Guanilato Ciclase C (GCC)

1.7.1. RNAm de GCC em Tecidos Sensíveis à STa

A relação da STa com o controle epitelial de água e eleutrólitos pelo trato digestivo se confunde com a descoberta do GCC (Field *et al.*, 1978; Schulz *et al.*, 1990). Por outro lado, não somente no intestino é encontrado o GCC. O RNAm do GCC está expresso no

figado desde o período fetal do desenvolvimento, bem como está presente desde o período neonatal de ratos. Estes mesmos tecidos foram marcados por ST-I¹²⁵. Após o nascimento, os níveis de RNAm do GCC e os sítios marcados por ST-I¹²⁵ 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 GCC pelos hepatócitos. Receptores marcados por ST-I¹²⁵ foram encontrados em hepatócitos e células do revestimento do trato biliar de gambá. STa é capaz de estimular a guanilato ciclase hepática a produzir GMPc (Krause *et al.*, 1990; Laney-Jr *et al.*, 1994).

Tanto o RNAm do GCC quanto o aumento na produção de GMPc sensível a STa foram observados em ácinos 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 GCC. Há GCC's relacionados com as funções endócrina e exócrina do pâncreas (Forte & Currie, 1995).

A expressão máxima deste receptor dá-se no intestino, seguindo-se nos rins. Consistente com estas respostas funcionais, estudos prévios têm mostrado a ligação da ¹²⁵I-GN (Furuya *et al.*, 1997) e da toxina ¹²⁵I-STa (Forte *et al.*, 1989; London *et al.*, 1997) ao longo do néfron. Mais recentemente, utilizando técnicas semi-quantitativas de RT-PCR para verificar a distribuição do RNAm da GCC em segmentos específicos microdissecados do néfron de rato, foi demonstrado que a expressão do receptor para GN/UGN é relativamente alta nos túbulos coletores corticais e medulares, nos túbulos contorcidos proximais e no ramo ascendente espesso medular da alça de Henle (Carrithers *et al.*, 2000b).

O RNAm da guanilina foi encontrado no trato genital feminino. Receptores marcados por ST-I¹²⁵ foram observados em células de revestimento de túbulos seminíferos dos testículos de gambá. Estes órgãos incrementam, *in vitro*, os níveis de GMPc quando expostos à STa (Forte *et al.*, 1989; Laney-Jr *et al.*, 1994; Schultz *et al.*, 1992).

Sítios marcados por ST-I¹²⁵ foram autoradiografados nas células do revestimento epitelial e da submucosa de glândulas da traquéia. O RNAm do GCC foi detectado em células do epitélio de revestimento do trato respiratório humano e bovino. Nesta última espécie os níveis de detecção foram maiores (Schultz *et al.*, 1992; Krause *et al.*, 1990).

1.7.2. Ligantes Endógenos do receptor GCC

A busca pelo ligante endógeno do GCC prescindia de um método dotado de elevadas sensibilidade e especificidade. Currie e col. (1992) observaram que cultura de células T84 de carcinoma de cólon humano eram sensíveis a concentrações de ST tão baixas quanto 10 pM. Estas células apresentam grande amplitude de variação de resposta biológica, uma vez que aumentam em até 30 000 vezes a concentração de GMPc na presença de ST e ainda mantinham elevada especificidade para agonistas ST-símiles (Currie *et al.*, 1992). Extratos de tecidos de ratos foram aplicados à cultura das referidas células. Os rins e o intestinos apresentaram um material ácido-lábil com atividade geradora de GMPc. O peptídeo endógeno ligante da GCC apresentava alto grau de semelhança estrutural com a ST e foi isolado em células de jejuno. Após ser submetido à degradação sequencial de Edman e espectometria de massa, foi conclusivo que a guanilina compunha-se de 15 aminoácidos, parte integrante da seqüência N-terminal de um pré-pró-peptídeo de muito maior peso molecular. Estas observações puderam ser confirmadas após a clonagem do cDNA responsável pelo peptídeo precursor da

guanilina (Wiegand *et al.*, 1992-a; 1992-b). A analogia com a estrutura da STa foi então também demonstrada.

A guanilina, hormônio isolado do intestino de ratos, veio a apresentar efeitos em transportes epiteliais semelhantes ao da toxina STa, e, mais surpreendentemente, com uma seqüência de aminoácidos semelhante a da toxina original, sendo esta última mais potente que a própria guanilina.

Um ano antes da publicação de Currie, no Encontro Internacional de Cólera e Doenças Correlatas, em Charlottesville (VA), foram apresentados, pelo grupo de trabalho do Prof. Dr. Manassés Fonteles, dados com a toxina purificada, que confirmaram inicialmente os achados com a forma impura da preparação (Fonteles *et al.*, 1991). Ainda naquela conferência foi postulada a existência de um ligante endógeno semelhante a STa, para explicar os seus potentes efeitos renais. Mais tarde, juntamente com o grupo do Prof. Villar-Palasi (Fonteles *et al.*, 1993), foram realizadas diversas tentativas de isolar este fator do perfusato de rins hipóxicos denominado de *factor natriureticus similis* (FNS). Tudo indica se tratar de uma guanilina ou outro peptídio agonista da guanilato ciclase, já que aumenta a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc, do inglês cyclic guanosine monophosphate) em modelos experimentais, no rim perfundido do coelho e do rato.

Os efeitos biológicos e o mecanismo de ação da ST nos túbulos proximais do rim forneceram base racional para se investigar a presença de guanilina no ultrafiltrado tubular ou mesmo na urina de gambás. As “formas urinárias de guanilina” foram isoladas e seqüenciadas. O material ST-guanilina-símile dominante com estrutura primária um pouco diferente da guanilina foi denominado uroguanilina (Hamra *et al.*, 1993). O peptídio contém 53% de identidade com os aminoácidos da guanilina. Neste

mesmo trabalho os autores isolaram um segundo peptídio 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 sequência da uroguanilina é QEDCELCINVACTGC (Hamra *et al.*, 1993). Logo após, Kita *et al.* (1994) isolaram 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)

Além do rim, também foi encontrada uroguanilina no intestino, na urina do ser humano e do rato (Fan *et al.*, 1997; Kita *et al.*, 1994), na mucosa intestinal dos ratos e dos gambás (Hamra *et al.*, 1996, Li *et al.*, 1997) e no plasma obtido de gambás e de seres humanos (Fan *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 1995). Guanilina é indetectável ou ocorre em concentrações muito mais baixas na urina. Uroguanilina é o principal peptídeo da família da guanilina encontrado na urina. Os peptídeos guanilina e uroguanilina foram estudados no rim perfundido por Fonteles *et al.* (1998) e os resultados obtidos foram semelhantes àqueles produzidos pela STa.

Guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) apresentam homologia com a enterotoxina bacteriana termo-estável (ST) da *E. coli* e ligam-se ao mesmo receptor: GCC (Lorenz *et al.*, 2003). Estruturalmente, são similares à toxina termo estável STa, secretada pela bactéria entérica *E.coli*, bem como o vibrião da cólera, que induzem a movimentação de íons para o lúmen entérico ou como descrito por Fonteles e col. em 1998, no rim perfundido, induzem natriurese e caliurese (Fonteles *et al.*, 1998).

Inicialmente isolada, conforme referido, no jejuno do rato, em 1992, pelo grupo de Mark Currie, (Companhia Monsanto, Estados Unidos), o peptídeo guanilina também foi encontrado em outros tecidos de mamíferos. 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 ^{125}I -STa e guanilina foram detectados 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, 1992-a; 1992-b), enquanto que no esôfago e estômago, os sinais da presença de guanilina eram praticamente indetectáveis.

Schultz e col. detectaram a presença de guanilina na glândula suprarenal, rins, útero e trompas da rata (Schultz *et al.*, 1992).

No trato gastrointestinal está definido que os STa, guanilina e uroguanilina ligam-se à guanilato ciclase C (GCC), um receptor apical de membrana que possui um domínio catalítico intrínseco. Do ponto de vista da sinalização, a ativação deste receptor aumenta a produção de GMPc, que, por sua vez, estimula de modo eletrogênico a secreção de Cl^- e HCO_3^- através do regulador de condutância do canal de cloreto (CFTR, do termo em inglês cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) conforme descrito por Forte *et al* (1993).

Consistente com estas observações, respostas funcionais foram obtidas anteriormente por outros pesquisadores (Fonteles *et al.*, 1996; 1998; Santos-Neto *et al.*, 1999). Estudos prévios têm mostrado a ligação da ^{125}I -GN ao longo do néfron (Furuya *et*

al., 1997). Outros estudos têm demonstrado a ligação da toxina ^{125}I -STa (Forte *et al.*, 1989; London *et al.*, 1999) ao longo do néfron. Em outros estudos mais recentes, utilizando novas técnicas semi-quantitativas de RT-PCR para acessar a distribuição do RNA m da GCC em segmentos específicos microdissecados do néfron de rato, foi demonstrado que a expressão do receptor para GN/UGN é relativamente alta nos túbulos coletores corticais e medulares, nos túbulos contorcidos proximais e no ramo ascendente espesso medular da alça de Henle (Carrithers *et al.*, 2000; Figuras 6 e 7).

No entanto, apesar de ter sido assumido até hoje que os efeitos renais da GN/UGN são mediados pela ligação destes peptídeos a GCC, alguns estudos recentes suportam outras hipóteses. Carrithers *et al.* (2004), por exemplo, verificaram que a resposta renal à administração endovenosa de GN, UGN e STa em camundongos knockout para GCC são semelhantes àquelas obtidas nos animais normais (wyld-type).

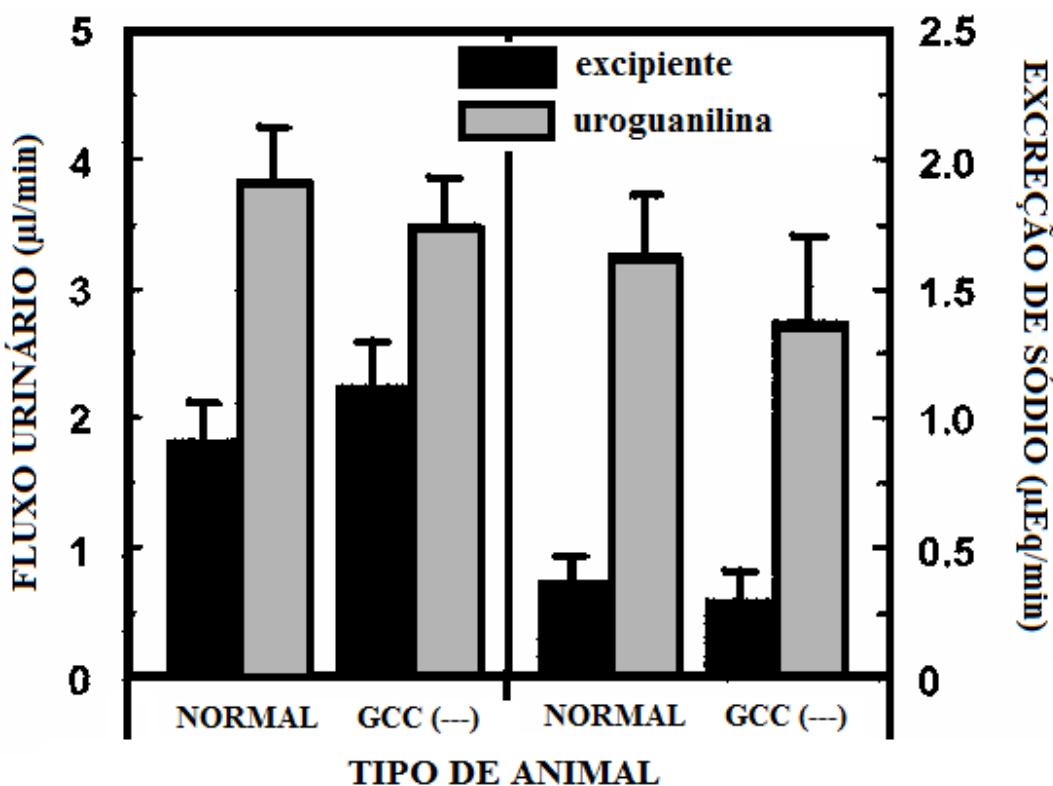


Figura 6: UGN induz diurese e natriurese significante no camundongo normal (wyld-type) e knockout para GCC (GCC (---)). Utilizando o modelo do “sealed-mouse”, UGN (0,5 unidades/g peso corporal) diluído em salina isotônica (excipiente) foi administrada em bolus endovenoso (50 μl) e os parâmetros acompanhados por 60 minutos. O fluxo urinário (μl/min) e a excreção de sódio (μEq/min) foram mensurados. Os dados representam média ± EPM de pelo menos 05 camundongos (Carrithers *et al.*, 2004).

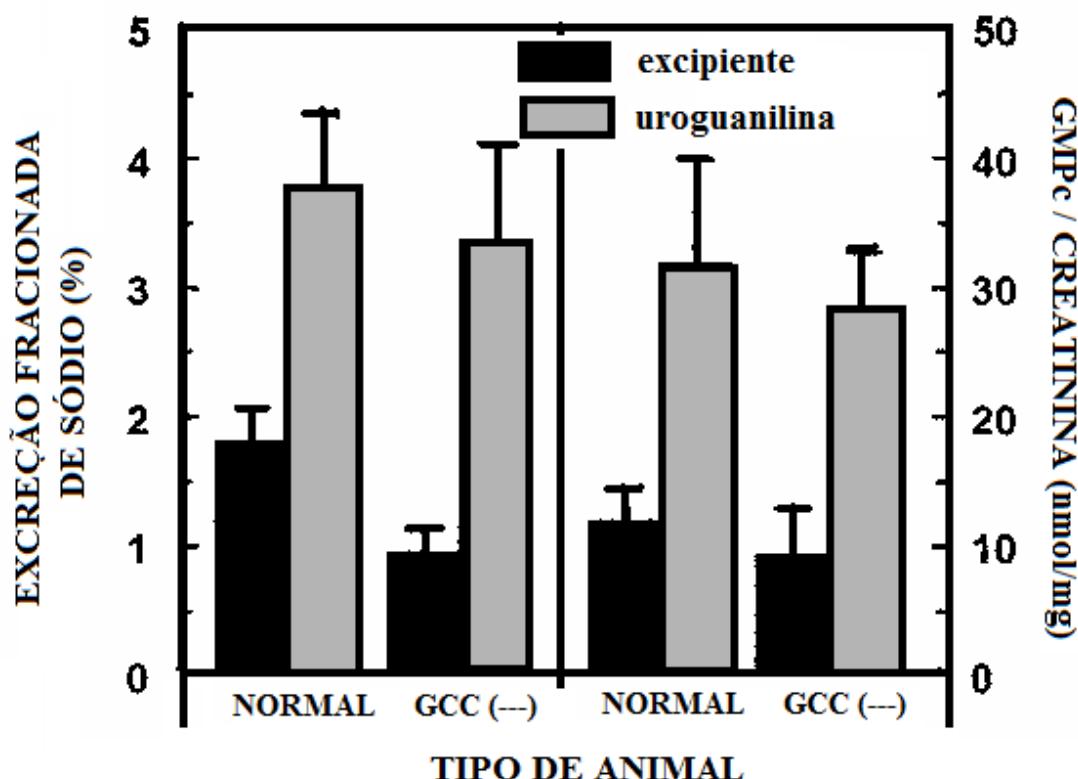


Figura 7: UGN induz diurese e natriurese significante no camundongo normal (wyld-type) e knockout para GCC (GCC (---)). Utilizando o modelo do “sealed-mouse”, UGN (0,5 unidades/g peso corporal) diluído em salina isotônica (excipiente) foi administrada em bolus endovenoso (50 µl) e os parâmetros acompanhados por 60 minutos. A excreção fracionada de sódio (%) e a excreção urinária parametrizada de GMPc (GMPc/creatininina; nmol/mg) foram mensuradas. Os dados representam média ± EPM de pelo menos 05 camundongos (Carrithers *et al.*, 2004).

Uma inabilidade sensória do intestino para ingestão de sódio ou uma sinalização deficiente para o rim excretar sódio irá levar à sua retenção e, portanto, contribuir para mecanismos que desencadeiam a hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva ou formação de edema. GN/UGN se projetam com relevantes implicações na regulação da excreção de sódio proveniente da dieta. Em adição, mudanças agudas na dieta salina

afetam a expressão intestinal de GN/UGN e excreção dos mesmos na corrente sanguínea de uma maneira cineticamente consistente com a natriurese induzida pela sobrecarga de sal por via oral. Ademais, a administração endovenosa de GN/UGN *in vivo* induz significante natriurese; já animais knockouts para UGN apresentam pressão arterial aumentada (Carrithers *et al.*, 2004).

No sangue, empregando anti-corpo específico, Kuhn e col. comprovaram que guanilina é encontrada em uma forma circulante de 10.3 KDa de peso molecular correspondente a pró-guanilina humana (Kuhn *et al.*, 1993). Mediante este ensaio observou-se que pacientes sadios apresentavam as concentrações desta forma imunoreativa em 42 ± 3 fmol/ml. No grupo de pacientes com insuficiência renal crônica as concentrações aumentaram para 1074 ± 24 fmol/ml. Em pacientes portadores de diarréia secretória produzidos por doença de Crohn e colite ulcerativa, os níveis do peptídeo apresentaram-se em 44 ± 3 fmol/ml, semelhantes, portanto, aos indivíduos normais.

Até o presente momento não se conseguiu demonstrar que os pró-hormônios interajam diretamente com seus receptores. Eles são liberados apicalmente, no lúmen intestinal e basolateralmente em confluência com os vasos sanguíneos (Forte & Currie 1995; Rduolf *et al.*, 2002). Os mecanismos específicos de como os pró-hormônios são clivados em fragmentos menores que dão origem à guanilina e uroguanilina ainda não foram elucidados (Beltowski *et al.*, 2001). Recentemente, os grupos de trabalho de Fonteneles e Forte, confirmam a existência de proteases no intestino e no néfron, capazes de liberarem e ativarem GN e UGN (Forte *et al.*, 1996 e Santos-Neto *et al.*, 2003).

Considera-se então que os peptídeos da família da guanilina estabelecem um eixo endócrino ligando os sistemas digestivo, circulatório e urinário. Conforme já posto antes, guanilina e uroguanilina foram descobertas no intestino de mamíferose e igualmente observadas no rim. Desta maneira, tem se tornado plausível considerar que estes dois peptídeos são elementos criticamente envolvidos no monitoramento intestinal de sal, na excreção de sódio após carga oral e na manutenção da pressão arterial em níveis normais. Torna-se patente que GN e UGN exercem papéis centrais na homeostase hidrossalina e são componentes importantes em um eixo de comunicação entérico-renal de natureza regulatória.

Está bem documentado que as guanilinas são os primeiros peptídeos que agem nos canais de potásio sem afetar diretamente os canais de sódio. As guanilinas ativam pelo menos duas vias de sinalização. Uma é dependente de GCC e de GMPc. Esta via reduz a reabsorção sódio por inibição de canais de potássio e por inibição da troca de sódio por hidrogênio, ou por potássio. Outra via de sinalização envolve a ativação da proteína G sensível a toxina pertussis. Em tubos coletores corticais, a inibição da secreção de potássio resulta em natriurese e consequente diurese. Além disso, a ação das guanilinas, por um mecanismo independente de GMPc ou ativação da GCC, através da fosfolipase A2 (PLA2) que leva à produção de ácido araquidônico e inibição de canais luminais de potássio (ROMK) foi recentemente proposta (Sindic & Schlatter, 2005). Há também evidências do envolvimento de ácidos epoxieicosatetraenóicos (que são natriuréticos) na natriurese por dieta hipersalina (Liclican *et al.*, 2005).

GN também poderia aumentar a diurese por translocação de aquaporin 2 a partir da membrana luminal das células principais de tubos coletores situados na medula renal. Tem sido relatado que GN diminui o volume celular e aumenta o espaço luminal de maneira relacionada à concentração e ao tempo, o que sugere reduzida reabsorção ou

secreção de água e, consequentemente, diurese (Furuya *et al.* 1997). Certamente, o mecanismo de sinalização das guanilinas na medula renal necessita de uma investigação mais aprofundada. As possíveis ação e interação das guanilinas com estas vias podem também ser relevantes.

A elucidação deste importante mecanismo endócrino irá aumentar nosso conhecimento acerca de condições fisiopatológicas tão prevalentes como a hipertensão, levando, consequentemente, a importantes descobertas na regulação hidro-eletrolítica em seres humanos e animais. Como a hipertensão, dieta e natriurese são preocupações clínicas relevantes, os resultados deste estudo conduzirão, em futuro bem próximo, a importantes pesquisas de caracterização fisiopatológica e terapêutica em humanos.

1.8. Da Água e Eletrólitos à Vida: Quantos caminhos!...

Uma toxina bacteriana encontra receptores em tecidos de mamíferos. Quantos e quais seus ligantes endógenos? Em que ambiente fisiopatológico este receptor pode estar envolvido? A presença de guanilina e uroguanilina na fisiologia de mamíferos torna-se mais marcante a cada dia, seja por seus efeitos parácrinos, autócrinos (Guba *et al.*, 1996) e/ou endócrinos. Estes peptídeos apresentam potencial terapêutico na homeostase hidrossalina, na hipertensão e na insuficiência cardíaca. Os efeitos renais mediados pelas guanilato-ciclases ou suas vias de sinalização intracelulares certamente se constituem em pontos fundamentais que medeiam a presente pesquisa.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a existência destes peptídeos tem obtido destaque no entendimento da fisiologia do metabolismo do sal. Embora possuam afinidades por regiões distintas da membrana celular, suas vias de sinalização intracelulares concorrem na geração de alguns mensageiros e convergem na produção de diurese e natriurese. A hipótese de inadequada produção ou de não funcionamento de seus mecanismos de ação pode estar implicada na hipertensão arterial sistêmica essencial, sensível e relacionada ao sal.

Guanilina e uroguanilina estimulam a secreção de cloreto pelas células intestinais, sendo responsáveis pelo mecanismo de secreção de sal e água (Schultz *et al.*, 1990; Hamra *et al.*, 1993 e Kita *et al.*, 1994). STa da *E. coli* age como uma molécula similar aos hormônios guanilina e uroguanilina. Atualmente está claro que guanilina e uroguanilina são hormônios que controlam a secreção de sal e água via GMPc.

As cininas (bradicinina, calidina e *Met-Lys-bradicinina*) agem através de receptores (B1 e B2) localizados na superfície das células-alvo. A grande maioria das ações das cininas é mediada pelo receptor B2 que tem elevada afinidade pela bradicinina. Tem sido demonstrado que efeitos benéficos produzidos pelos inibidores da ECA se devem à redução na síntese de angiotensina II e também a menor degradação endógena da bradicinina, o que potencia seus efeitos biológicos.

ANP e urodilatina ativam a guanilato-ciclase A (GCA) e, assim como as guanilinas, provocam aumento da secreção de sal e água via GMPc (Hirayama *et al.*, 1993; Vaandrager *et al.*, 1993-a, 1993-b e 1994; Parkinson *et al.*, 1994, Forte & Currie, 1995). Por outro lado, urodilatina resiste melhor à ação de proteases renais (Gagelmann *et al.*, 1988; Sonnenberg *et at.*, 1988), é produzida no rim, excretada na urina, não parece ser

produzida em outros tecidos e nem é encontrada no sangue. (Schulz-Knappe *et al.*, 1988).

O mecanismo endócrino em que estes peptídeos estão envolvidos, sob condições fisiológicas ou patológicas, requer ainda muitos estudos experimentais. Na hipertensão, dieta e natriurese são preocupações chave, do ponto de vista clínico e os resultados deste estudo, reiterando, conduzirão, em futuro bem próximo, a importantes descobertas de caracterização fisiopatológica e terapêutica em humanos.

3. OBJETIVOS GERAIS

3.1.1. Estudar os mecanismos de ação intra-renais da Uroguanilina, Bradicinina e Urodilatina;

3.1.2. Estudar o papel destes peptídeos no metabolismo renal do sal.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Estudar, individualmente, em doses farmacológicas e *ex-vivo*, os efeitos vasculares e tubulares intra-renais da uroguanilina, da urodilatina e da bradicinina;

3.2.2. Avaliar interações na administração combinada destes peptídeos;

3.2.3. Estudar, individualmente, em doses farmacológicas e *ex-vivo*, os efeitos vasculares e tubulares intra-renais de isatina e ODQ.

3.2.4. Investigar os mecanismos de ação da uroguanilina e da bradicinina pelo emprego das ferramentas farmacológicas, inibidoras da via de sinalização da guanilato ciclase, isatina e ODQ.

4. 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.

4.1. Peptídeos

4.1.1. Urodilatina

Adquirida da Sigma ® (St. Louis, *et al* MO), apresenta pureza mínima de 97% determinada pelo emprego de HPLC (cromatografia líquida de alta pressão), fórmula molecular $C_{145}H_{234}N_{52}O_{44}S_3$ e peso molecular 3505,93 (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/U5754>).

4.1.2. Bradicinina

Adquirida da Sigma® (St. Louis, *et al* MO), apresenta fórmula molecular: $C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$ e peso molecular 1060,2. É um produto sintético. Foi preparada pelo método de fase sólida para síntese peptídica. Armazenada em baixa umidade sob temperatura inferior a 0° C, sustenta a atividade biológica durante o prazo de, pelo menos, dois anos. A Sigma®, rotineiramente, realiza e avalia testes com amostras do produto pelo emprego de HPLC. Aliquotas de soluções (01 mg/ml) mantidas a 20° C suportam armazenamento durante, pelo menos, dois meses e à temperatura ambiente durante 06 dias.

(<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/b3259pis.pdf>).

4.1.3. Uroguanilina

A síntese da uroguanilina foi realizada pelo método de fase sólida e purificada de acordo com Currie (Currie *et al.*, 1992) e Hamra (Hamra *et al.*, 1993). A síntese foi realizada num sintetizador peptídico fabricado pela Applied Biosystems 431A. A purificação dos peptídos foi realizada por HPLC em colunas de fase reversa e as estruturas confirmadas por espectroscopia e análise de sequência. Para teste de atividade biológica usou-se a capacidade destes peptídos em estimularem a produção de GMPC em células T84 em cultura conforme descrito por Fonteles em 1993 (Fonteles *et al.*, 1993).

4.2. Ferramentas Farmacológicas

4.2.1. Isatina

Isatina ou 1H-indol-2,3-diona (Denominação Internacional - IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry; Sigma ®, St. Louis, MO) é um derivado indol. Composto cristalino vermelho-alaranjado, obtido por oxidação do índigo ou de indol oxigenado, ou por várias sínteses. É usado como intermédio de corantes indigóides (<http://www.workpedia.com.br/6077/isatina.html>). Apresenta as seguintes características (<http://en.wikipedia.org/wiki/Isatin>):

Fórmula molecular: C₈H₅NO₂;

Massa molar: 147.1308 g/mol e;

Ponto de fusão: 200 °C, 473 K ou 392 °F

O composto foi obtido, pela primeira vez, por Erdman (Erdmann *et al.*, 1840) e Laurent, em 1840 (Laurent *et al.*, 1840) como um produto a partir da oxidação do corante índigo por ácido nítrico e ácido crômico (Dasilva *et al.*, 2001).

Foi observado que isatina forma um corante azul se for misturado com ácido sulfúrico e benzeno. Acreditou-se durante muito tempo que a formação do azul de indofenina era uma reação com benzeno. A indofenina é um corante que resulta da reação entre tifeno e a isatina em presença do ácido sulfúrico e Victor Meyer foi capaz de isolar a substância responsável por esta reação: tiofeno (Gil-Turners *et al.*, 1989).

Na natureza, isatina é encontrada em plantas do gênero *Isatis* (Guo *et al.*, 1986). Isatin é um produto químico biologicamente ativo produzido por *Altermones SP*. Protege embriões do camarão *Palaemon macrodectylus* do fungo patogênico *Lagenidium callinectes* (Gil-Turners *et al.*, 1989). Foram relatadas atividades anti-HIV, anticonvulsivantes, antibacterianos, anti-protozoários, antifúngicos, antivirais e anti-helmínticos (Jarrahpour & Khalili, 2005). Maiores detalhes de suas reações são apresentados na figura 8.

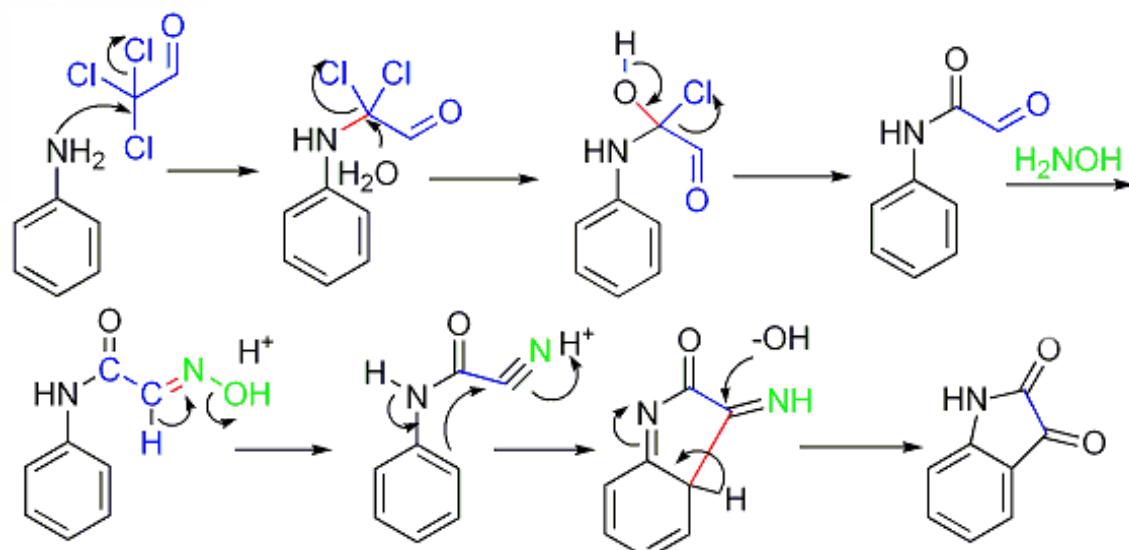


Figura 8: Ilustração esquemática da síntese e estrutura do isatin por Traugott Sandmeyer (1854-1922). (Sandmeyer *et al.*, 1919).

4.2.2. ODQ

O ODQ ou 1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinolaxina-1-ona (Denominação Internacional - IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry; Sigma ®, St. Louis, MO) é um inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCS). Este composto é altamente seletivo e irreversível. Sua ligação é competitiva com o NO (Gartwaite *et al.*, 1995). O ODQ não tem efeito sobre a guanilato ciclase particulada ou sobre a adenilato ciclase. Também não parece interferir com a síntese de NO. A inibição da guanilato ciclase solúvel é tempo-dependente com completa inativação em 10 minutos, a 0,3 µM de ODQ.

Apresenta-se como um pó branco de tonalidade amarela dotado das seguintes características:

Fórmula molecular: C₉H₅N₃O₂;

Peso molecular: 187.2

ODQ pode atuar também como um inibidor de doadores de NO que necessitam de biotransformação. Trinitrato de glicerol e nitroprussiato de sódio sofrem interferência do ODQ, provavelmente por seu efeito inibitório sobre proteínas P-450-like (Feelisch *et al.*, 1999). Por outro lado, ODQ pode se ligar à mioglobina e, em tecidos com elevada quantidade de mioglobina como o miocárdio, os seus efeitos podem ser mascarados (Wegener *et al.*, 1999). ODQ inibe a GCS por oxidação do grupo heme da enzima e, assim, pode oxidar tanto hemoglobina como outras proteínas similares. (Zhao *et al.*, 2000). Sua estrutura molecular está ilustrada na figura 9.

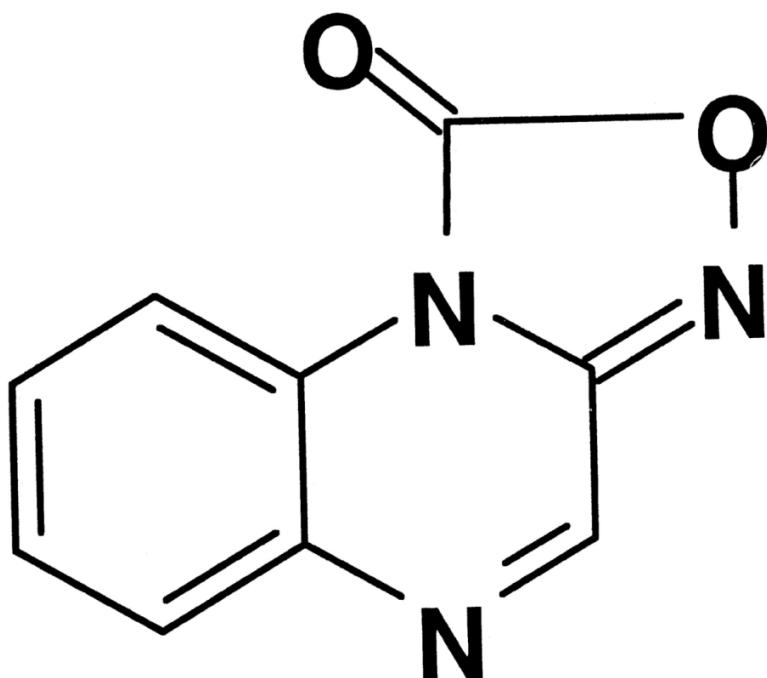


Figura 9: Ilustração da estrutura do ODQ ou 1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinolaxina-1-ona (Feelisch et al., 1999; <http://molpharm.aspetjournals.org/content/vol56/issue2/images/large/mo0890162001.jpeg>; <http://www.axxora.com/files/formula/ALX-270-034.gif>)

4.3. *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 250 e 280 g foram mantidos em jejum com água *ad libitum* por 24 horas antes de serem utilizados nos experimentos.

4.4. Sistema e Solução para Perfusion

Uma vez isolado, o rim foi perfundido no sistema com recirculação. Originalmente desenvolvido por Bowman e Maack (Bowman & Maack, 1974), o modelo de perfusão que utilizamos apresenta algumas melhorias implementadas por Fonteles (Fonteles *et al.*, 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 37°C.

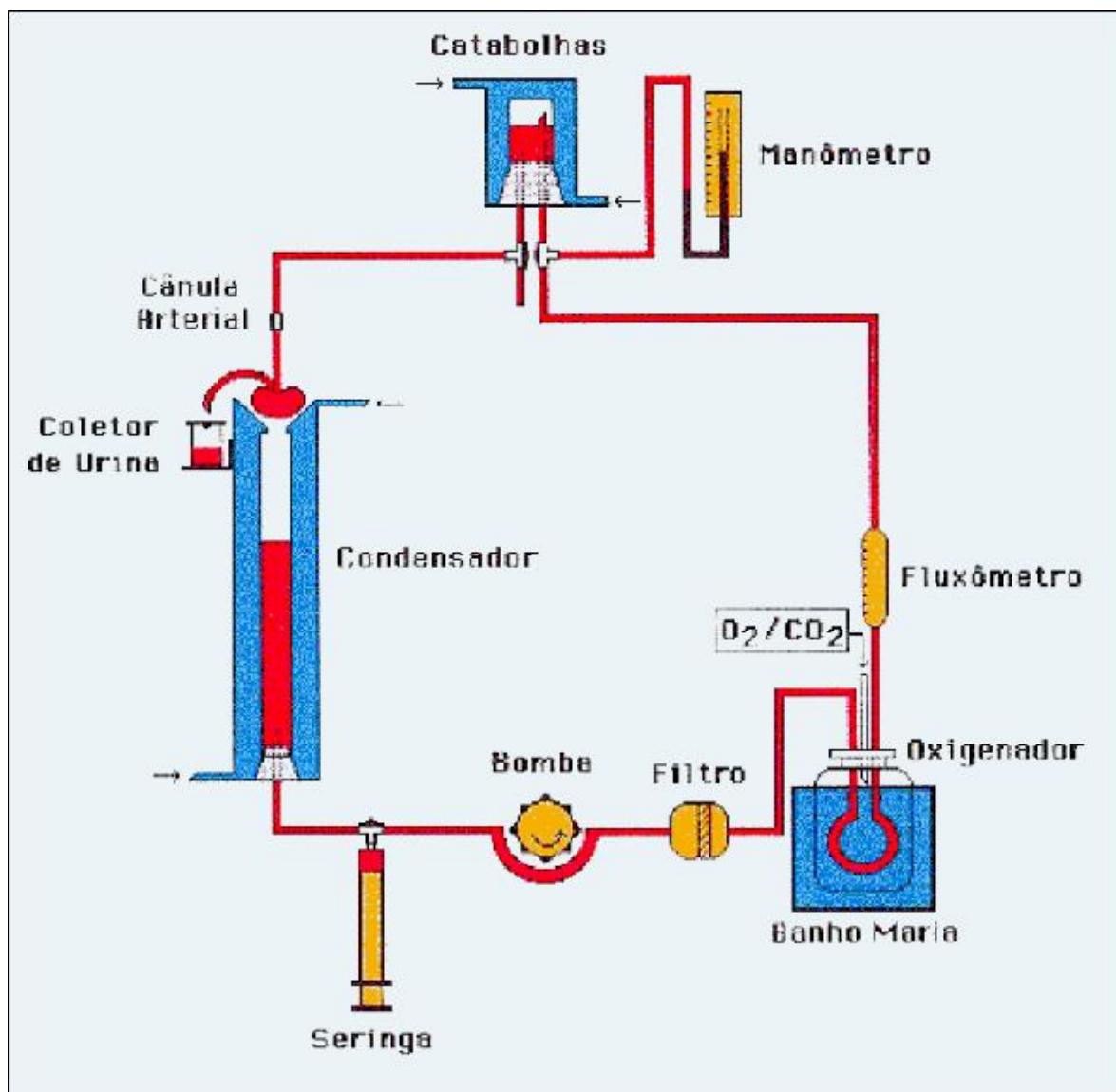


Figura 10: Ilustração esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.

Na ilustração do sistema de perfusão de rim isolado podemos observar, em sentido anti-horário:

4.4.1. Condensador

É composto de dois cilindros coaxiais de vidro. O espaço entre os dois cilindros é fechado, formando uma câmara selada. São manutidas duas vias de acesso ao interior da câmara selada por onde se promove o fluxo contínuo de água (38°C). Trata-se de um reservatório para aquecimento da solução perfusora. É importante mencionar que em momento algum a água aquecida se mistura à solução perfusora.

4.4.2. Seringa graduada

Viabiliza, nos intervalos de tempo estabelecidos no protocolo experimental, a coleta de amostras da solução perfusora para dosagens bioquímicas.

4.4.3. Bomba de perfusão

Deve ser calibrada antes do início de cada experimento. Permite controle gradual e preciso do fluxo de perfusão renal. Atualmente utilizamos a marca Watson-Malow ®.

4.4.4. Filtro

(USA-Millipore-5µm) - filtração constante, remoção de restos celulares e melhor qualidade da solução perfusora.

4.4.5. Oxigenador

Funciona como um pulmão artificial. A solução perfusora percorre um segmento de tubo silástico serpentinado que se encontra em uma câmara de gás (95% de O₂ e 5 % de CO₂). A condição semi-permeável do material do tubo permite trocas gasosas.

4.4.6. Banho Maria

Mantém imerso, no seu interior, sob água aquecida (37°C) o Oxigenador (UtiFanem - modelo 100).

4.4.7. Fluxômetro

Quando da calibração do sistema de perfusão, bombas inclusive, faz a correlação entre sua leitura do fluxo de perfusão e o fluxo real de solução colhido no cateter de perfusão. A elaboração de uma regressão linear com os dados da calibração referida permite a leitura e inferência instantânea do fluxo de perfusão durante o experimento.

4.4.8. Catabolhas

É uma câmara com estrutura similar ao condensador. É aquecida e não têm papel de reservatório, menor que é. A solução perfusora entra na câmara por um introdutor posicionada acima do ponto onde se insere a cânula conectada à artéria renal. Assim, a câmara apresenta capacidade de reter bolhas, evitando o embolismo gasoso do órgão.

4.4.9. Manômetro de mercúrio

Conectado ao Catabolhas pela região onde se acumula o ar retido, permite fazer, com precisão e praticidade, a leitura direta da Pressão de perfusão na artéria renal durante a perfusão.

4.4.10. Bomba aquecedora com termostato

Um sistema hidráulico com temperatura ajustável matém aquecidos o Condensador e o Catabolhas. É fundamental para manter todo sistema de perfusão em 37°C .

4.5. Solução Perfusora

Utizamos a solução de Krebs-Henseleit modificada na seguinte composição em mM: Na⁺ 147; K⁺ 5; Ca⁺⁺ 2.5; Mg⁺⁺ 2.0; Cl⁻ 110; HC0₃⁻ 25; SO₄⁻⁻ 1 e PO₄⁻⁻ 1. Adiciona-se inulina à solução de Krebs-Henseleit modificada. Seis gramas de albumina bovina sérica, fração V, são também adicionadas a esta solução que é submetida à diálise por 48 horas a 04 °C.

A diálise é importante passo no processo de elaboração da solução perfusora contendo albumina. A diálise se impõe pela necessidade da eliminar substâncias contaminantes tais como: citrato, piruvato e lactato. (Fonteles & Lima, 1982; Fonteles *et al.*, 1983).

O volume total de solução perfusora em cada experimento era de 100ml. Imediatamente antes do início da perfusão, glicose (100mg), uréia (50mg) e inulina (50mg) são adicionadas. O pH é ajustado para 7.4 e coloca-se a solução no sistema de perfusão. A solução é 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 existem: 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).

4.6. Calibração do sistema

Antes das experiências, o sistema é lavado com detergente e água bidestilada aquecida e, logo após, é montado e calibrado. A “calibração do sistema” consiste em, utilizando apenas a solução de perfusão sem rim acoplado ao sistema, estabelecer correlações entre:

05 (cinco) diferentes velocidades da bomba de perfusão (RPM);

Leituras no fluxômetro ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) do sistema de perfusão;

Leituras no manômetro de mercúrio (mmHg) do sistema de perfusão;

Medida direta do fluxo de perfusão renal ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), pela coleta de solução de perfusão, na ponta da cânula.

Gráficos de calibração estão apresentados nas figuras 11-15. A limpeza e antisepsia exigem a desmontagem do sistema. A remontagem do mesmo, com trocas de novos tubos, produz variações nas leituras do manômetro de mercúrio e do fluxômetro. Como os valores de fluxo de perfusato para o rim e de pressão de perfusão renal, utilizados no cálculo de alguns parâmetros de função renal, são inferidos pelos componentes do sistema, a “calibração” do mesmo antes de cada experimento é mandatória. Grafamos alguns pontos de calibração do sistema de perfusão com respectivas curvas de regressão linear. Utilizamos o Coeficiente de Correlação de Pearson para medir o grau e a direção da correlação (positiva ou negativa) entre as variáveis de escala métrica distintas.

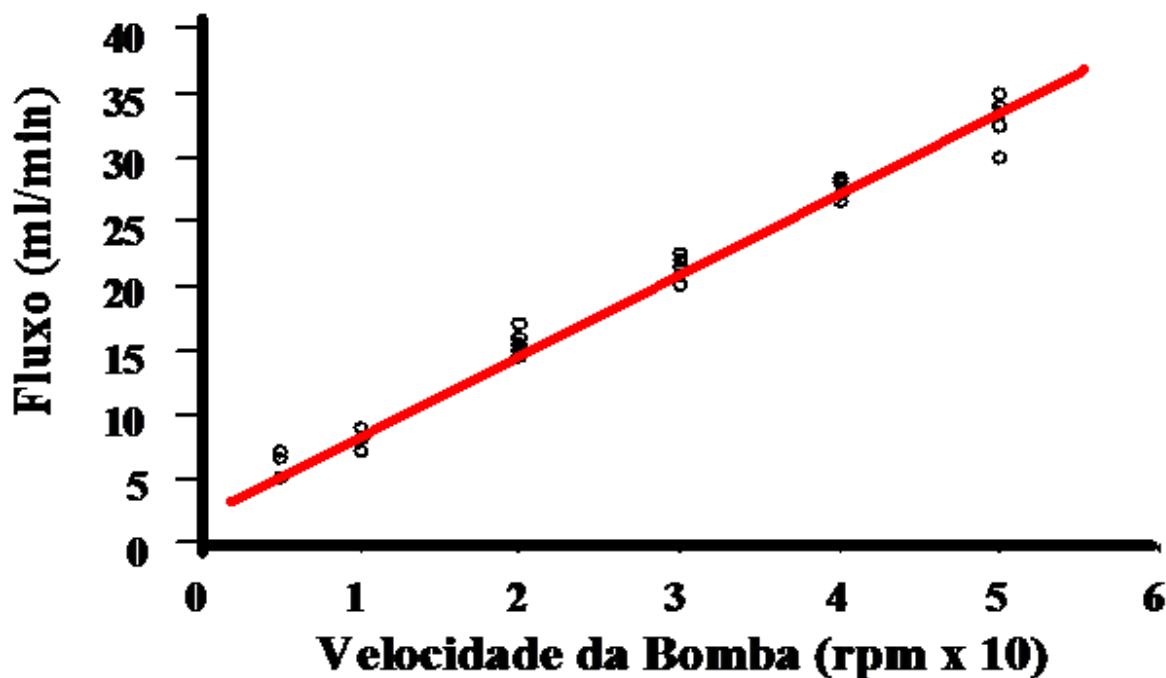


Figura 11: Curva de regressão linear da correlação entre a Velocidade da Bomba de Perfusionamento Renal (eixo das abscissas – X ; RPM x 10) e o Fluxo de Perfusionamento Renal (eixo das coordenadas – Y ; ml/min) medido na ponta da cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 2,49 \cdot X + 8,31$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,99$).

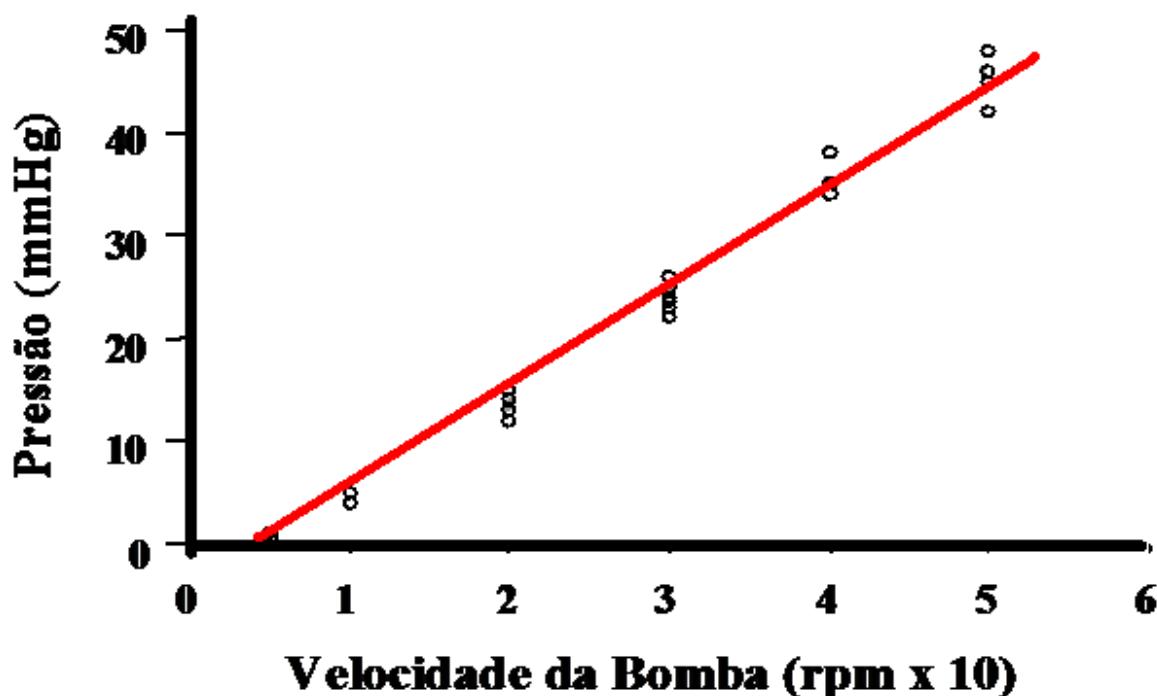


Figura 12: Curva de regressão linear da correlação entre a Velocidade da Bomba de Perfusão Renal (eixo da abscissas – X; RPM x 10) e a Pressão de Perfusão Renal (eixo das coordenadas – Y; mmHg) medido no manômetro de mercúrio conectado à cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 9,9 \cdot X - 6,2$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,99$).

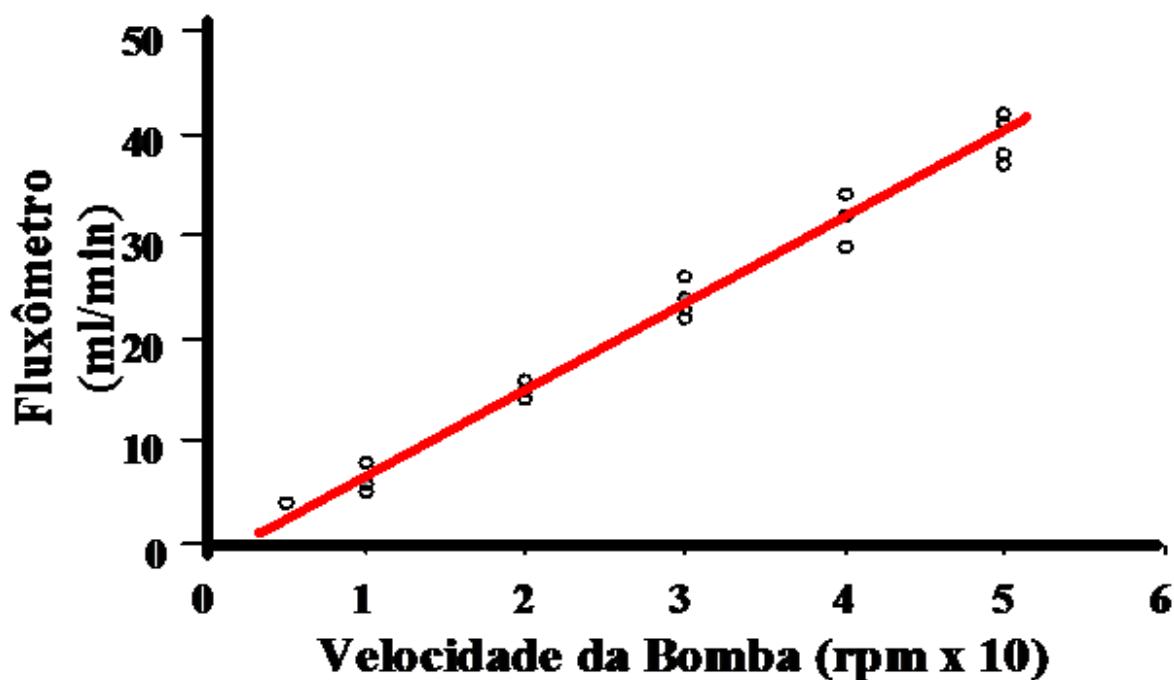


Figura 13: Curva de regressão linear da correlação entre a Velocidade da Bomba de Perfusionamento Renal (eixo das abscissas – X; RPM x 10) e o Fluxo de Perfusionamento Renal (eixo das coordenadas – Y; ml/min) medido no fluxômetro, acoplado em série, no sistema de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 7,9 \cdot X - 0,6$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,99$).

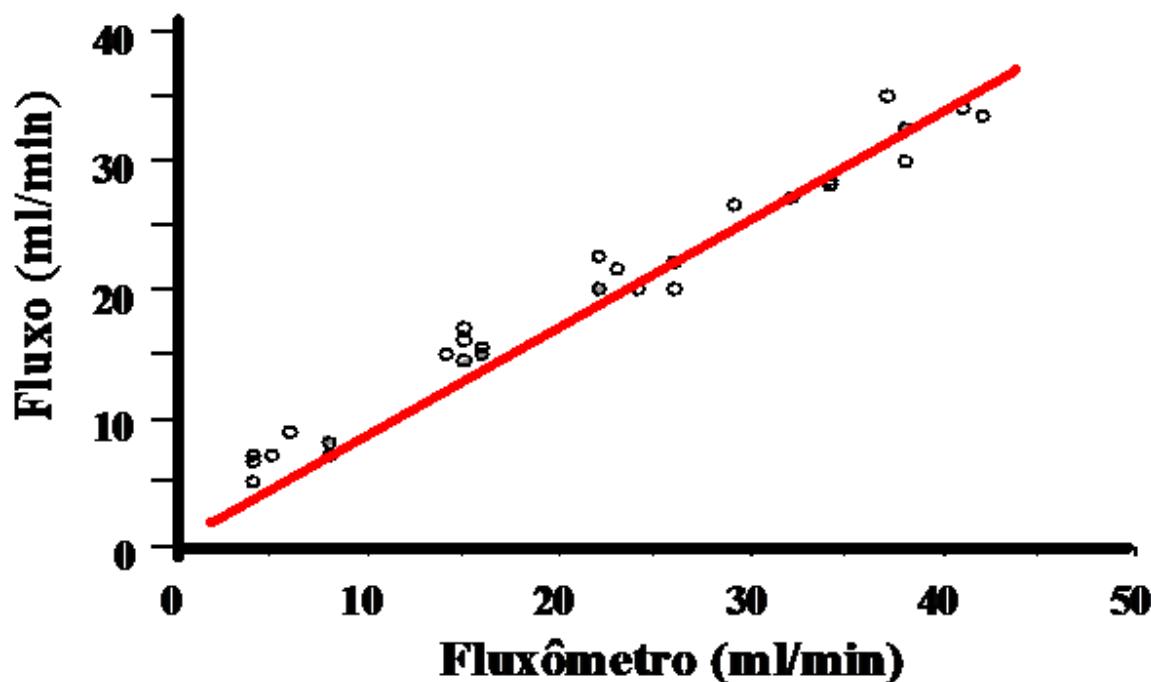


Figura 14: Curva de regressão linear da correlação entre o Fluxo de Perfusionamento Renal (eixo das abscissas – X; ml/min) medido no fluxômetro, acoplado em série no sistema de perfusão, e o Fluxo de Perfusionamento Renal (eixo das coordenadas – Y; ml/min) medido na ponta da cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 0,9 \cdot X + 0,3$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,98$).

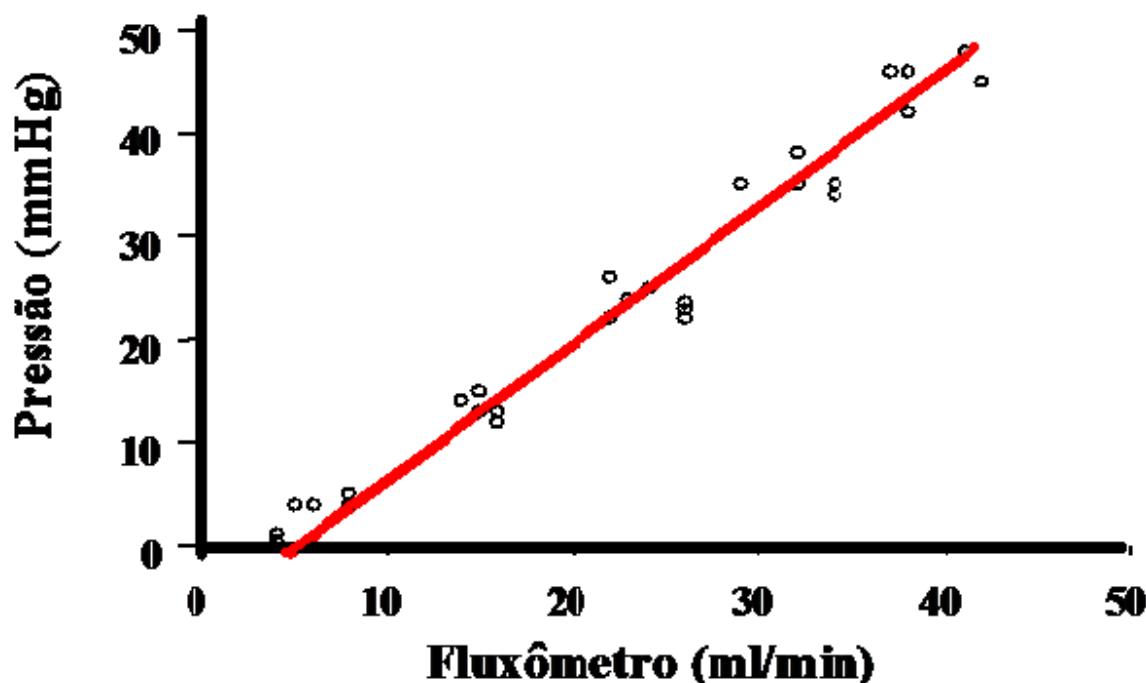


Figura 15: Curva de regressão linear da correlação entre o Fluxo de Perfusionamento Renal (eixo das abscissas – X ; ml/min) medido no fluxômetro, acoplado em série no sistema de perfusão, e a Pressão de Perfusionamento Renal (eixo das coordenadas – Y ; mmHg) medida no manômetro de mercúrio conectado à cânula de perfusão. Foi traçada a Regressão Linear dos pontos graficados a partir da equação linear do primeiro grau (tipo: $Y = a \cdot X + b$): $Y = 1,2 \cdot X - 5,0$ (Coeficiente de Correlação de Pearson - $R^2 = 0,98$).

Com o sistema calibrado, a pressão de perfusão, medida no terminal da cânula de aço inoxidável, era ajustada próxima aos 120 mmHg para o início do período de adaptação cuja duração é de 20 minutos. Após a adaptação, inicia-se o período experimental de 120 minutos, podendo a pressão de perfusão flutuar durante a perfusão de acordo com as condições experimentais.

4.7. Técnica de abordagem cirúrgica

Os animais anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso corporal; via intraperitoneal) recebem manitol (20%; 03 ml) pela veia femoral esquerda. Após abertura da cavidade abdominal visualiza-se o rim direito mediante deslocamento das alças intestinais. A perda de líquido, pela laparotomia mais exposição do mesentério, pode desidratar o animal. Assim, o risco deste evento é reduzido pelo contínuo envolvimento das alças intestinais em solução salina aquecida. O ureter direito clampeado engurgita-se levemente. É facilitada sua dissecção para posteriormente ser canulado. A manipulação da loja renal estimula a adrenal e libera catecolaminas cuja interferência na fisiologia renal é indesejável em nossos experimentos. Por isso, o rim direito é descapsulado somente após ser realizada adrenalectomia à direita com ligadura da respectiva artéria.

O tempo cirúrgico seguinte é a canulação o ureter direito. Em seguida, após cuidadosa dissecção, a artéria renal direita é 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 esquerdo é retirado e pesado para correção do fluxo urinário e do ritmo de filtração glomerular por grama de massa tecidual. Quando aplicável, 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).

4.8. Análise histológica

Embora não seja objetivo deste trabalho avaliar alterações histológicas, as mesmas devem ser realizadas. A ocorrência de alterações histológicas ou histopatológicas em um grupo específico proporciona um viés que não pode ser desconsiderado.

Os fragmentos obtidos do tecido foram submetidos a tratamento por formol a 10%, à desidratação e diafanização, para confecção dos cortes histológicos, os quais mediram 5 μ m de espessura. Após coloração de hematoxilina-eosina foram estudados em lâminas através de um microscópio óptico.

4.9. 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. Foram perfundidos rins controles e rins tratados pela adição de fármacos à solução perfusora.

A cada intervalo de 10 minutos amostras de perfusato e urina eram coletadas para medidas das funções renais. Todos os experimentos têm dados coletados a cada 10 minutos e análise em 04 períodos (30min, 60min, 90min e 120min) de 30 minutos cada.

4.9.1. Protocolo Controle

No protocolo experimental para o grupo controle o período de perfusão renal dura 120 minutos. Corresponde a totalidade do período de Tempo Experimental. Conforme estabelecido no Protocole Geral, os 120 minutos de tempo experimental têm dados coletados a cada 10 minutos e análise em 04 períodos (30min, 60min, 90min e 120min) de 30 minutos cada. Não há adição de fármacos, peptídeos ou substâncias em qualquer dos intervalos de análise.

4.9.2. Protocolo Experimental para uma Substância

No protocolo experimental para os grupos em que são estudados os efeitos de somente uma substância (peptídeo ou fármaco), decorrido 30 minutos de perfusão renal, um peptídeo ou um fármaco é adicionada à solução perfusora. Os referidos 30 minutos iniciais se passam sob as mesmas condições definidas para o Grupo Controle. Eis que são denominados de Controle Interno.

De outra forma, neste grupo, o período de perfusão renal:

- Corresponde à totalidade do período de Tempo Experimental;
- Dura 120 minutos, sendo:
 - 30 minutos iniciais (Controle Interno) e
 - 90 minutos finais (Tempo Tratado).

Após 30 minutos iniciais (Controle Interno), foram realizadas perfusões de rim isolado durante os 90 minutos finais (Tempo Tratado) com as seguintes substâncias e

concentrações: uroguanilina (UGN; 0,3 μM ; 0,6 μM); isatina (IS; 3 μM ; 10 μM); bradicinina (BK; 1,8 nM; 0,9 nM e 0,3 nM); ODQ (37 μM) e urodilatina (0,03 nM; UD).

4.9.3. Protocolo Experimental para duas Substâncias

No protocolo experimental para os grupos em que são estudados os efeitos de duas substâncias (fármaco mais peptídeo ou dois peptídeos ou dois fármaco), no início do Tempo Experimental a Substância I é adicionada à solução perfusora. Decorridos 60 minutos, a Substância II é adicionada à solução perfusora. Os 120 minutos de perfusão renal são divididos em 60 minutos iniciais de Tratamento com Substância I e 60 minutos finais de Tratamento com Substância I mais Substância II.

De outra forma, neste grupo, o período de perfusão renal:

- Corresponde à totalidade do período de Tempo Experimental;
- Dura 120 minutos:
- 60 minutos iniciais (Tratamento com Substância I) e
- 60 minutos finais (Tratamento com Substância I mais Substância II).

Durante os 60 minutos iniciais (Tratamento com Substância I) foi administrado:

- Isatin (3 μM);
- ODQ (37 μM);
- Uroguanilina (0,3 μM);
- Uroguanilina (0,6 μM).

Durante os 60 minutos finais:

- No Tratamento com Substância I - Isatin (3 μM) foram adionadas como Substância II:
 - Uroguanilina (0,3 μM) ou;
 - Bradicinina (1,8 μM).

No Tratamento com Substância I - ODQ (7 $\mu\text{g/ml}$) foi adionada como Substância II:

- Bradicinina (1,8 nM).
- No Tratamento com Substância I - Uroguanilina (0,3 μM) foram adionadas como Substância II:
 - Urodilatina (0,03 μM).
 - No Tratamento com Substância I - Uroguanilina (0,6 μM) foram adionadas como Substância II:
 - Urodilatina (0,03 μM) ou;
 - Bradicinina (0,9 nM)

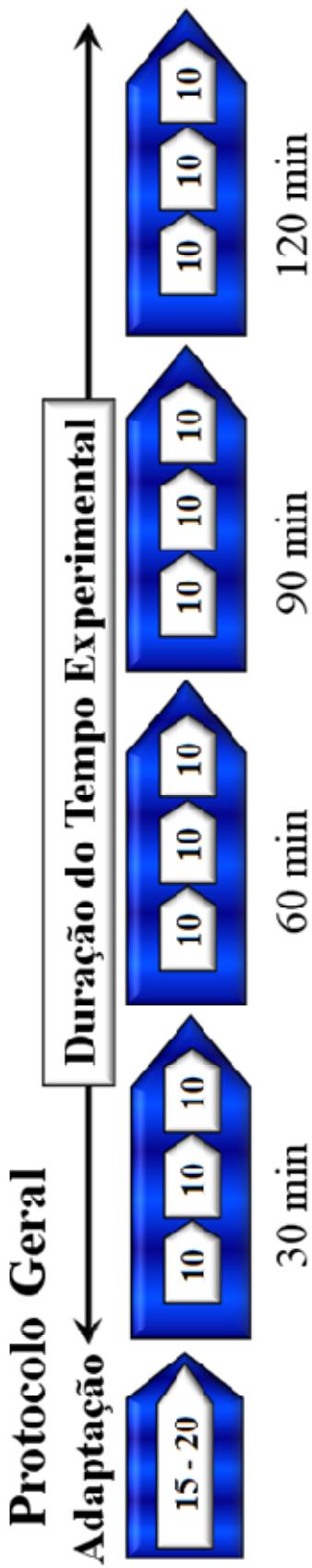


Figura 16: Ilustração esquemática do Protocolo Geral do tempo de duração dos experimentos. Observe que o período de adaptação não faz parte do período de Tempo Experimental. Os 120 minutos de tempo experimental têm dados coletados a cada 10 minutos e análise em 04 períodos (30min, 60min, 90min e 120min) de 30 minutos cada.

Protocolo Experimental para o Grupo Controle

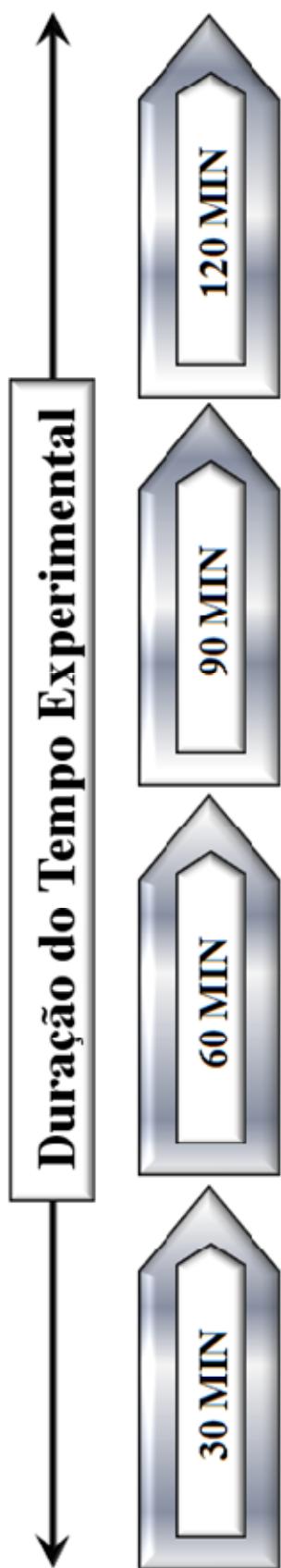


Figura 17: Ilustração esquemática do protocolo experimental para o grupo controle. Observe que o período de perfusão renal do Grupo Controle é 120 minutos e corresponde a totalidade do período de Tempo Experimental. Conforme estabelecido no Protocolo Geral, os 120 minutos de tempo experimental têm dados coletados a cada 10 minutos e análise em 04 períodos (30min, 60min, 90min e 120min) de 30 minutos cada.

Protocolo Experimental para Um Peptídeo ou Fármaco

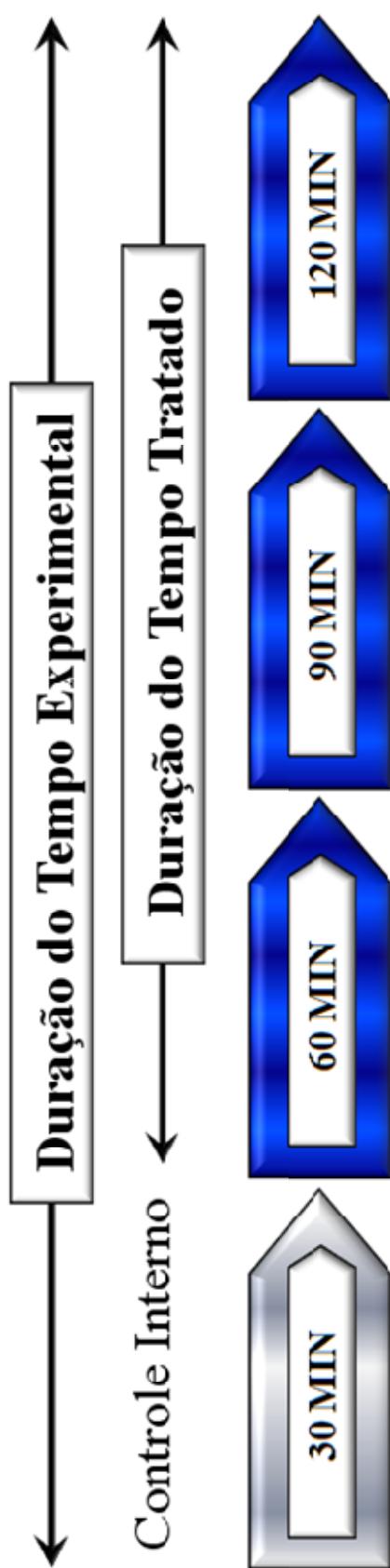


Figura 18: Ilustração esquemática do protocolo experimental para os grupos experimentais em que são estudados os efeitos de somente uma substância (peptídeo ou fármaco). Decorrido 30 minutos de perfusão renal, sob as mesmas condições definidas para o Grupo Controle, o peptídeo ou o fármaco é adicionada à solução perfusora. Observe que o período de perfusão renal de 120 minutos, correspondente à totalidade do período de Tempo Experimental, é dividido em 30 minutos iniciais (Controle Interno) e 90 minutos finais (Tempo Tratado). Conforme estabelecido no protocolo geral, os 120 minutos de tempo experimental têm dados coletados a cada 10 minutos e análise em 04 períodos (30min, 60min, 90min e 120min) de 30 minutos cada.

Protocolo Experimental para Duas Substâncias

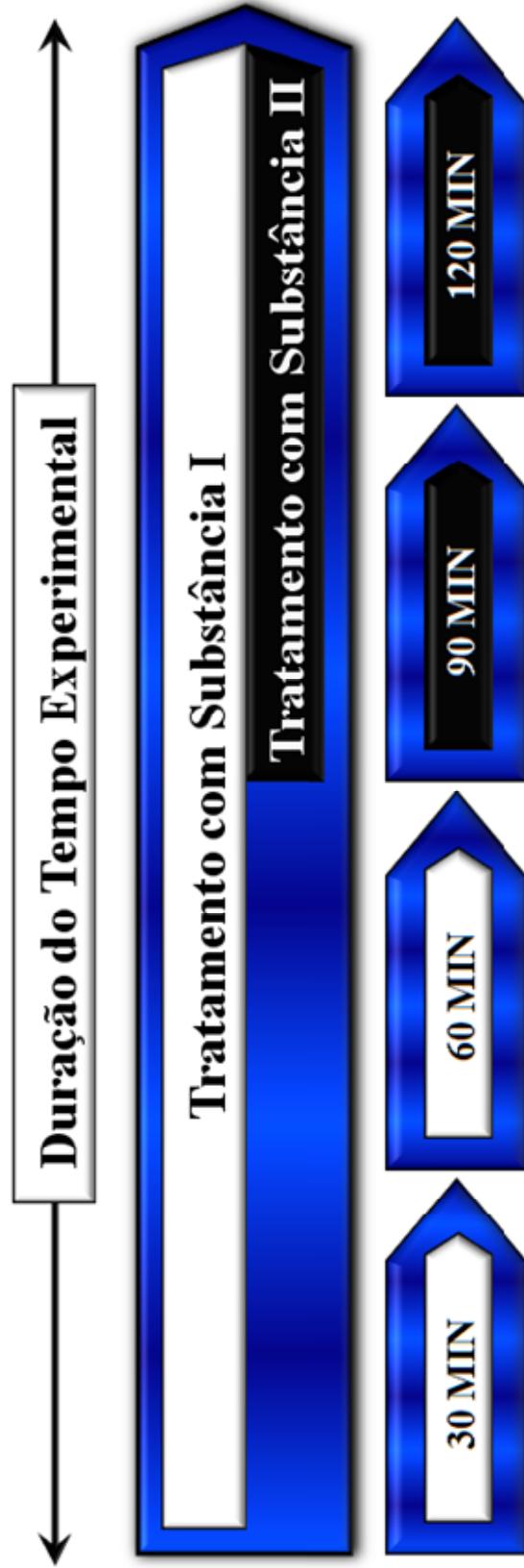


Figura 19: Ilustração esquemática do protocolo experimental para os grupos em que são estudados os efeitos de duas substâncias (fármaco mais peptídeo ou dois peptídeos ou dois fármaco). No início do Tempor Experimental a Substância I é adicionada à solução perfusora. Decorridos 60 minutos, a Substância II é adicionada à solução perfusora. Os 120 minutos de perfusão renal são divididos em 60 minutos iniciais de Tratamento com Substância I e 60 minutos finais de Tratamento com Substância II. Conforme estabelecido no protocolo geral, os 120 minutos de tempo experimental têm dados coletados a cada 10 minutos e análise em 04 períodos (30min, 60min, 90min e 120min) de 30 minutos cada..

4.10. Análise Bioquímica

Os testes bioquímicos foram realizados na Unidade de Pesquisas Clínicas – UPC ou no Instituto de Biomedicina - IBIMED. 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).

4.11. 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 1: Parâmetros de Função Renal (símbolos, unidade de medidas, forma de cálculo empregando fórmulas, aparelhos ou método de dosagem ou inferência)

Símbolo	Unidade	Função Renal	Forma de Cálculo / Medida
FU	(ml/g/min)	Fluxo Urinário	Volume Urinário / Peso Seco do Rim (g) / 10 min
RFG	(ml/g/min)	Rítmo de Firtração 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 ⁺	(μEq)	Na ⁺ do Perfusato	Medida do Espectrofotômetro de Chama
UNa ⁺	(μEq)	Na ⁺ Urinário	Medida do Espectrofotômetro de Chama
FNa ⁺	(μEq/g/min)	Na ⁺ Filtrado	RFG * PNa ⁺
ENa ⁺	(μEq/g/min)	Na ⁺ Excretado	FU * UNa ⁺
TNa ⁺	(μEq/g/min)	Na ⁺ Trasnportado	FNa ⁺ - ENa ⁺
%TNa ⁺	%	% TNa ⁺ Transportado	TNa ⁺ * 100 % / FNa ⁺
%ENa ⁺	%	% ENa ⁺ Excretado	ENa ⁺ * 100 % / FNa ⁺
PK ⁺	(μEq)	K ⁺ do Perfusato	Medida do Espectrofotômetro de Chama
UK ⁺	(μEq)	K ⁺ Urinário	Medida do Espectrofotômetro de Chama
FK ⁺	(μEq/g/min)	K ⁺ Filtrado	RFG * PK ⁺
EK ⁺	(μEq/g/min)	K ⁺ Excretado	FU * UK ⁺
TK ⁺	(μEq/g/min)	K ⁺ Trasnportado	FK ⁺ - EK ⁺
%TK ⁺	%	% TK ⁺ Transportado	TK ⁺ * 100 % / FK ⁺
%EK ⁺	%	% EK ⁺ Excretado	EK ⁺ * 100 % / FNa ⁺
PCI ⁻	(μEq)	Cl ⁻ do Perfusato	Método Colorimétrico

UCl ⁻	(μEq)	Cl ⁻ Urinário	Método Colorimétrico
FCl ⁻	(μEq/g/min)	Cl ⁻ Filtrado	RFG * PCl ⁻
ECl ⁻	(μEq/g/min)	Cl ⁻ Excretado	FU * UCl ⁻
TCl ⁻	(μEq/g/min)	Cl ⁻ Transportado	FCl ⁻ - ECl ⁻
%TCl ⁻	%	% TCl ⁻ Transportado	TCl ⁻ * 100 % / FCl ⁻
%ECl ⁻	%	% ECl ⁻ Excretado	ECl ⁻ * 100 % / FN ⁺
Uosm	(ml/g/min)	Concentração de Osmóis da Urina	Medida em Osmômetro de Pressão à Vapor
Posm	(ml/g/min)	Concentração de Osmóis do Perfusato	Medida em Osmômetro de Pressão à Vapor
Cosm	(ml/g/min)	Clearance Osmolar	(Uosm / Posm) * FU
CH ₂ O	(ml/g/min)	Clearance de Água Livre	FU – Cosm
DTNa ⁺	(μEq/g/min)	Transporte Distal de Na ⁺	CH ₂ O * PN ⁺
AdNa ⁺	(μEq/g/min)	Aporte Distal de Na ⁺	dTN ⁺ + EN ⁺
%dTNa ⁺ da AdNa ⁺	%	Transporte % Distal de Na ⁺	dTN ⁺ * 100 % / AdNa ⁺
PTNa ⁺	(μEq/g/min)	Transporte Proximal de Na ⁺	FN ⁺ - AdNa ⁺
%pTN ⁺	%	Transporte % Proximal de Na ⁺	pTN ⁺ * 100/ FN ⁺
DTNa ⁺	(μEq/g/min)	Transporte Distal de Na ⁺	CH ₂ O * PN ⁺
AdNa ⁺	(μEq/g/min)	Aporte Distal de Na ⁺	dTN ⁺ + EN ⁺
%dTNa ⁺ do AdNa ⁺	%	Transporte % Distal de Na ⁺	dTN ⁺ * 100 % / AdNa ⁺
PTNa ⁺	(μEq/g/min)	Transporte Proximal de Na ⁺	FN ⁺ - AdNa ⁺
%pTN ⁺	%	Transporte % Proximal de Na ⁺	pTN ⁺ * 100/ FN ⁺
DTK ⁺	(μEq/g/min)	Transporte Distal de K ⁺	CH ₂ O * PK ⁺

AdK^+	(μ Eq/g/min)	Apporte Distal de K^+	$dTK^+ + EK^+$
% dTK^+ do AdK^+	%	Transporte % Distal de K^+	$dTK^+ * 100 \% / AdK^+$
PTK^+	(μ Eq/g/min)	Transporte Proximal de K^+	$FK^+ - AdK^+$
% pTK^+	%	Transporte % Proximal de K^+	$pTK^+.100/ FK^+$
$DTCl^-$	(μ Eq/g/min)	Transporte Distal de Cl^-	$CH_2O * PCl^-$
$AdCl^-$	(μ Eq/g/min)	Apporte Distal de Cl^-	$dTCI^- * ECl^-$
% $dTCI^-$ do $AdCl^-$	%	Transporte % Distal de Cl^-	$dTCI^- * 100 \% / AdCl^-$
$PTCl^-$	(μ Eq/g/min)	Transporte Proximal de Cl^-	$FCl^- - AdCl^-$
% $pTCI^-$	%	Transporte % Proximal de Cl^-	$pTCI^- * 100/ FCl^-$

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^+), 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 Office Excel versão 2007 (Microsoft Corporation, USA, *et al* 2007) para sistema operacional Windows Versão 6.0 Vista (Microsoft Corporation, USA, 2006) para computadores PC compatíveis.

4.12. Estatística Descritiva e Analítica

Outros software como Pirsm 5 for Windows versão 5.0, 2007 (GraphPad Software Inc. USA, 1992-2007), Office Word 2007 (Microsoft Corporation, USA,

2007) ou Office Power Point 2007 (Microsoft Corporation, USA, 2007) 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 04 animais diferentes foram necessários para determinação de cada ponto. Os dados foram submetidos à anova (análise de variância). Quando indicada, foi aplicado o teste de *Fischer* para comparação entre os períodos de tempos de 30 minutos de um mesmo tratamento ou entre os diferentes grupos experimentais analisados. Nível de significância com $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente diferente.

5. RESULTADOS

5.1. Validação do grupo controle

A análise estatística dos dados obtidos através do Protocolo Controle pode validar os dados obtidos nos demais protocolos para o modelo experimental empregado. 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 em apêndice no final desta tese.

As diferenças entre os valores de média para cada tempo de perfusão não foram grandes o suficiente 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 significante.

Para as funções renais indicadas abaixo, 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), Rítmico 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 funções renais elencada aqui, 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⁺; %; $P = 0.996$; Tabela 13-4) para teste de normalidade ($P = 0.2025$) e da variância ($P = 0.8859$); Reabsorção tubular fracionada de potássio (%TK⁺; %; $P = 1.000$; Tabela 13-5) para teste de normalidade ($P = 0.1573$) e da variância ($P = 0.9766$); Reabsorção tubular fracionada de cloreto (%TCl⁻; %; $P = 0.$

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 (($P = 0.6510$).

5.2. Grupos experimentais protocolados

Na tabela 2 encontram-se tabulados os resultados dos grupos experimentais conforme citados nos protocolos de acordo com os objetivos.

Tabela 2: Grupos experimentais, período de perfusão das substâncias (00-30 minutos - 30 min; 30-60 minutos - 60 min; 60-90 minutos - 90 min; 90-120 minutos - 120 min) e número de amostras para média e EPM (N).

PROTOCOLO					
Grupo Experimental	30 min	60 min	90 min	120 min	N
CONTROLE (solução perfusora pura 30 min, 60 min, 90 min e 120 min)					
Controle		-			15
UMA SUBSTÂNCIA (solução perfusora pura 30 min – controle interno - CI)					
Uroguanilina (0,6 μM; UGN)	CI	UGN (0,6 μM)			12
UGN (0,3 μM)	CI	UGN (0,3 μM)			12
Bradicinina (1,8 nM; BK)	CI	BK (1,8 nM)			09
BK (0,9 nM)	CI	BK (0,9 nM)			09
BK (0,3 nM)	CI	BK (0,3 nM)			09
Urodilatina (0,03 nM; UD)	CI	UD (0,03 nM)			09
Isatina (10 μM; IS)	CI	IS (10 μM)			09
IS (3 μM)	CI	IS (3 μM)			09
ODQ (37 μM)	CI	ODQ (37 μM)			09
DUAS SUBSTÂNCIAS (Substância I = 00-60 min; Substância II = 60-120 min)					
IS (3 μM) + UGN (0,6 μM)	IS (3 μM)	UGN (0,6 μM)			09
IS (3 μM) + UGN (0,3 μM)	IS (3 μM)	UGN (0,3 μM)			09
IS (3 μM) + BK (2 μg/ml)	IS (3 μM)	BK (2 μg/ml)			09
ODQ (37 μM) + BK (2 μg/ml)	ODQ (37 μM)	BK (2 μg/ml)			09
UGN (0,6 μM) + BK (0,3 μg/ml)	UGN (0,6 μM)	BK (1 μg/ml)			12
UGN (0,6 μM) + UD (0,03 nM)	UGN (0,6 μM)	UD (0,03 nM)			12
UGN (0,3 μM) + UD (0,03 nM)	UGN (0,3 μM)	UD (0,03 nM)			12

5.2.1. Pressão de perfusão

Conforme observado nos gráficos das figuras 20 a 23, os resultados relativos à pressão de perfusão do grupo controle não apresentam qualquer variação significativa nos períodos 30, 60, 90 e 120 minutos. Na figura 20, observamos que uroguanilina (UGN), em ambas as doses, produziu aumento da pressão de perfusão de modo mais pronunciado no período de 120 minutos (painel a) e bradicinina não produziu alterações na pressão de perfusão de modo significativo nas doses de 0,3 e de 0,9 nM (painel b). Urodilatina (0,03 nM) produziu redução na pressão de perfusão, porém atingiu transiente significância estatística aos 90 min (figura 21, painel b). Na presença de urodilatina (0,03 nM; figura 21 painel b) ou de BK (0,3 nM; figura 21 painel a), UGN, respectivamente nas dose de 0,3 ou 0,6 μ M, não aumentou a pressão de perfusão. Isatina (03 μ M ou 10 μ M) produziu aumento significativo da pressão de perfusão de modo mais pronunciado no período de 120 minutos (figura 22, painel a) e potencializou os efeitos de UGN (0,6 μ M; figura 22, painelb). Assim como BK (1,8 nM), ODQ (37 μ M), no período de 90 minutos, foi capaz de produzir discreto aumento na pressão de perfusão, mas, por outro lado, aboliu completamente os efeitos de BK (1,8 nM) quando administrados no mesmo experimento (figura 23, painel a). O pré-tratamento com Isatina (3 μ M) fez com que bradicinina (1,8 nM) produzisse aumento mais discreto da pressão de perfusão (figura 23, painel b), enquanto ODQ, aboliu completamente as alterações de bradicinina (1,8 nM) na pressão de perfusão.

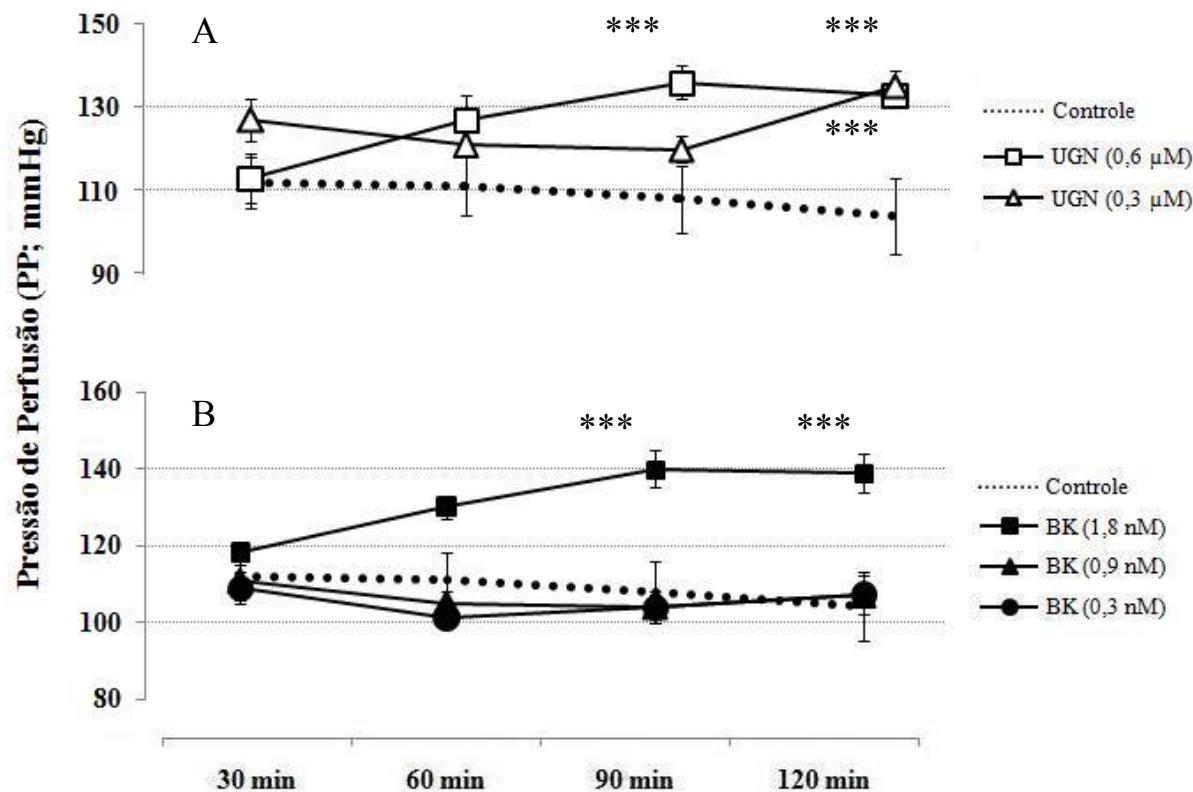


Figura 20: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

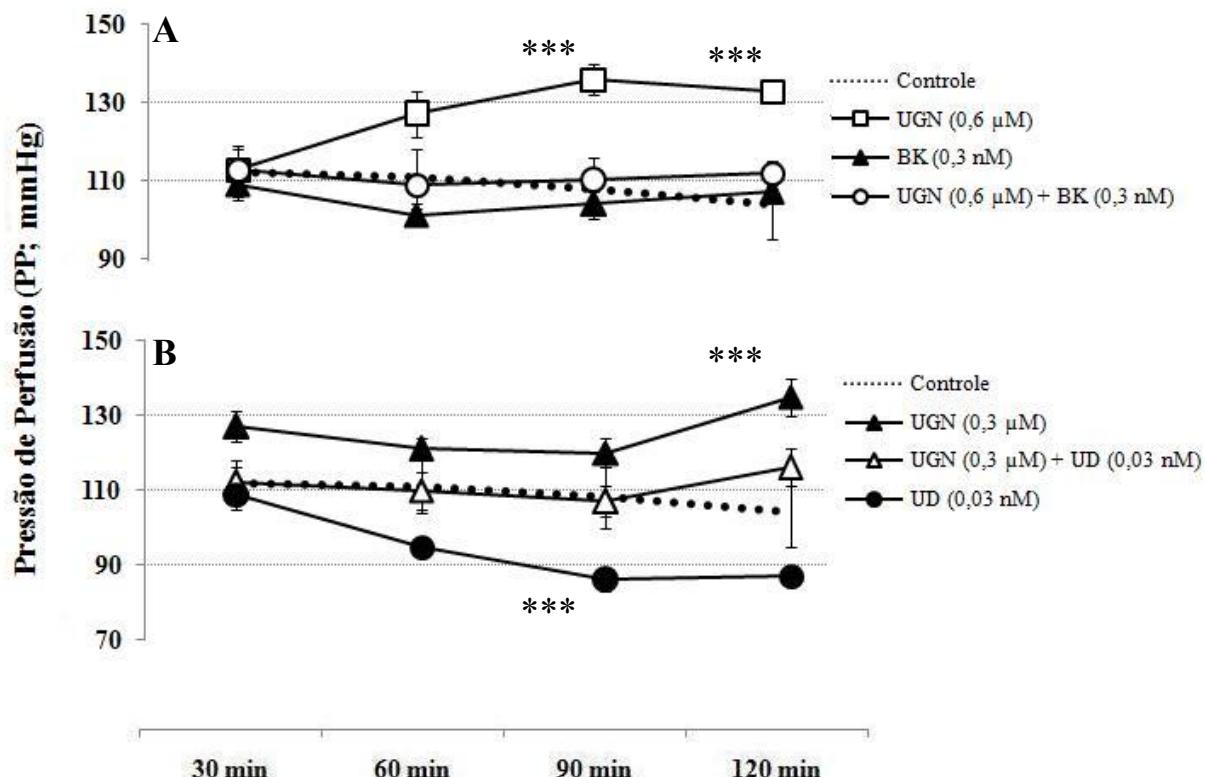


Figura 21: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

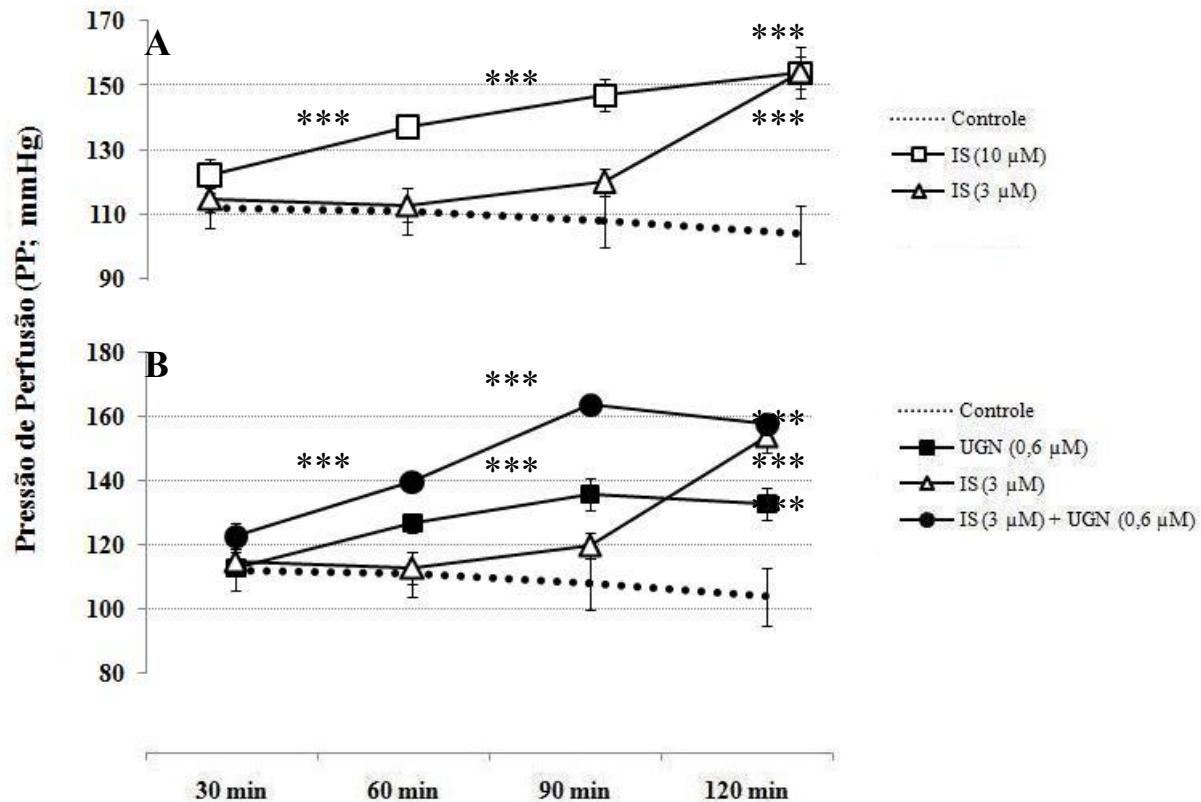


Figura 22: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

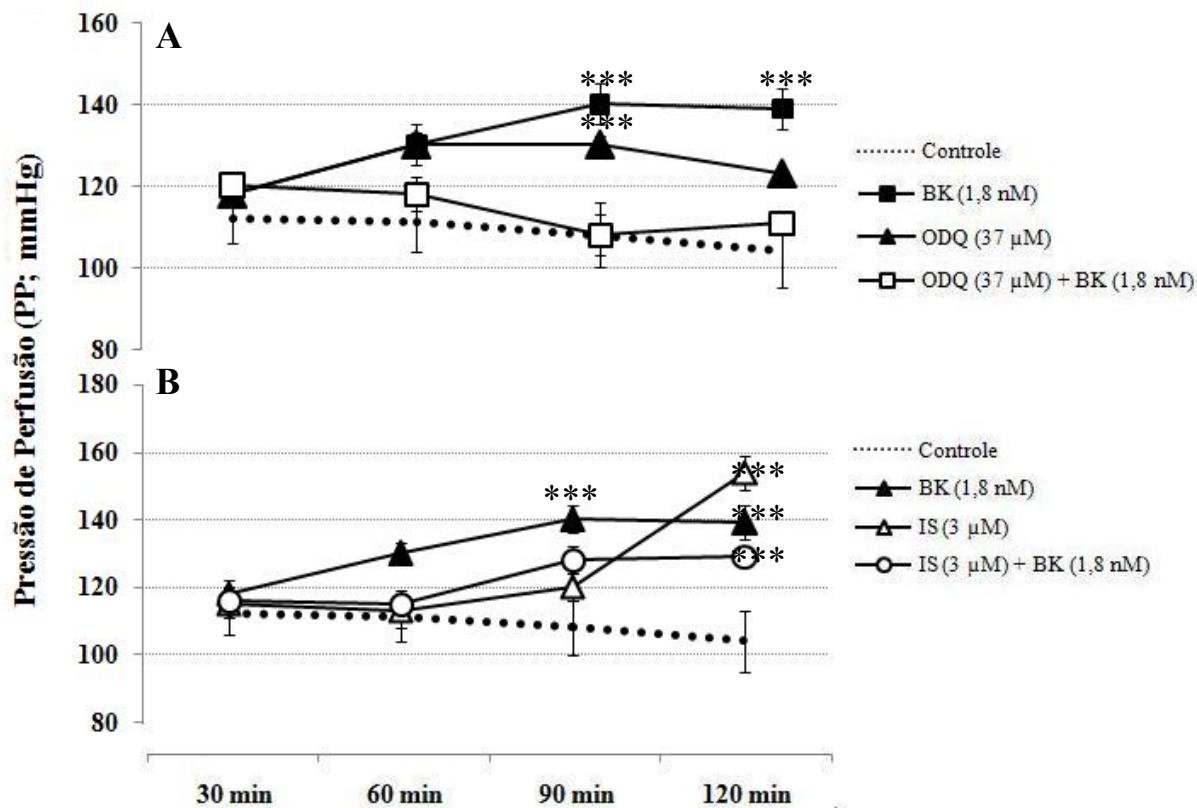


Figura 23: Pressão aferida na cânula de perfusão da artéria renal (PP; mmHg). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

5.2.1. Rítmo de filtração glomerular

Conforme observado nos gráficos das figuras 24 a 27, os resultados relativos ao ritmo de filtração glomerular (RFG; mL/g/min) do grupo controle não apresentam variação significativa nos períodos 30, 60, 90 e 120 minutos. Na figura 24, observamos que uroguanilina (UGN; 0,6 μ M; painel a) e bradicinina (BK; 0,9 e 1,8 nM; painel b) produziram aumento do RFG de modo mais pronunciado no período de 120 minutos. Urodilatina (0,03 nM) não produziu efeitos significativos na filtração glomerular, porém aboliu o aumento do RFG aos 120 min produzido por UGN (0,3 μ M; figura 25, painel b). Isatina (03 μ M) produziu significativa redução do RFG de modo mais pronunciado no período de 120 minutos (figura 26, painel a) e aboliu os efeitos de UGN (0,6 μ M; figura 26, painel b). ODQ (37 μ M) foi incapaz de produzir alterações significativas no RFG, mas, por outro lado, aboliu completamente os efeitos de BK (1,8 nM) quando administrados no mesmo experimento (figura 27, painel a). O pré-tratamento com Isatina (3 μ M) nos experimentos com BK (1,8 nM) fez com que prevalecesse a redução do RFG daquela ao aumento produzido por esta (figura 27, painel b).

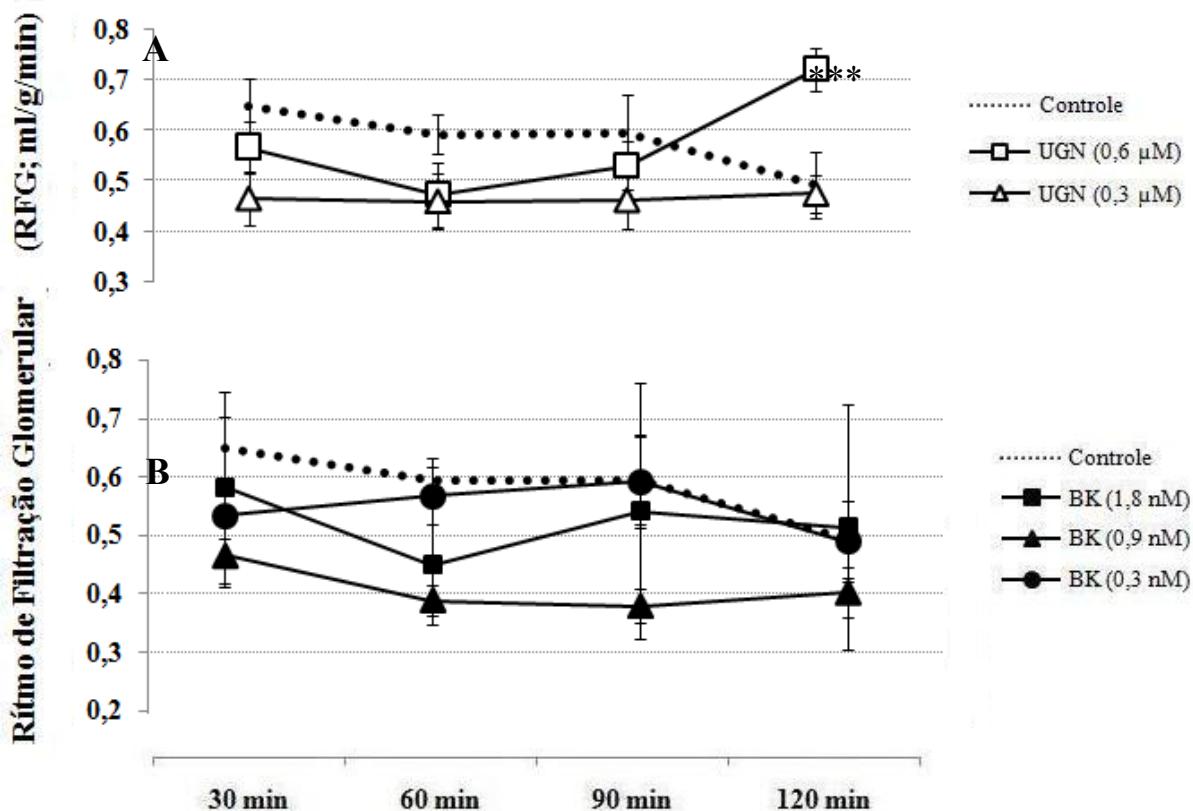


Figura 24: Cálculo do rítmico de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μM; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

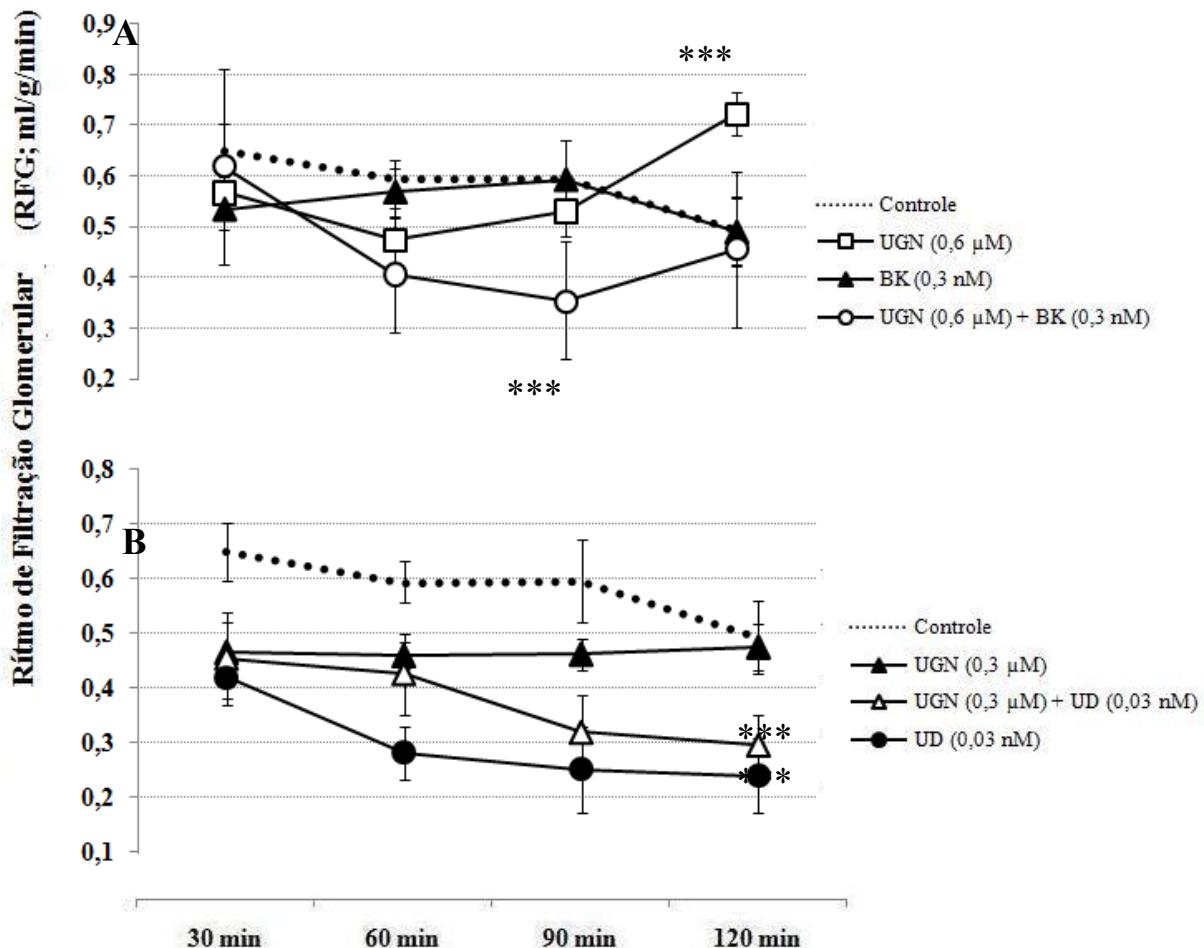


Figura 25: Cálculo do rítimo de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μM), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6μM; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3μM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

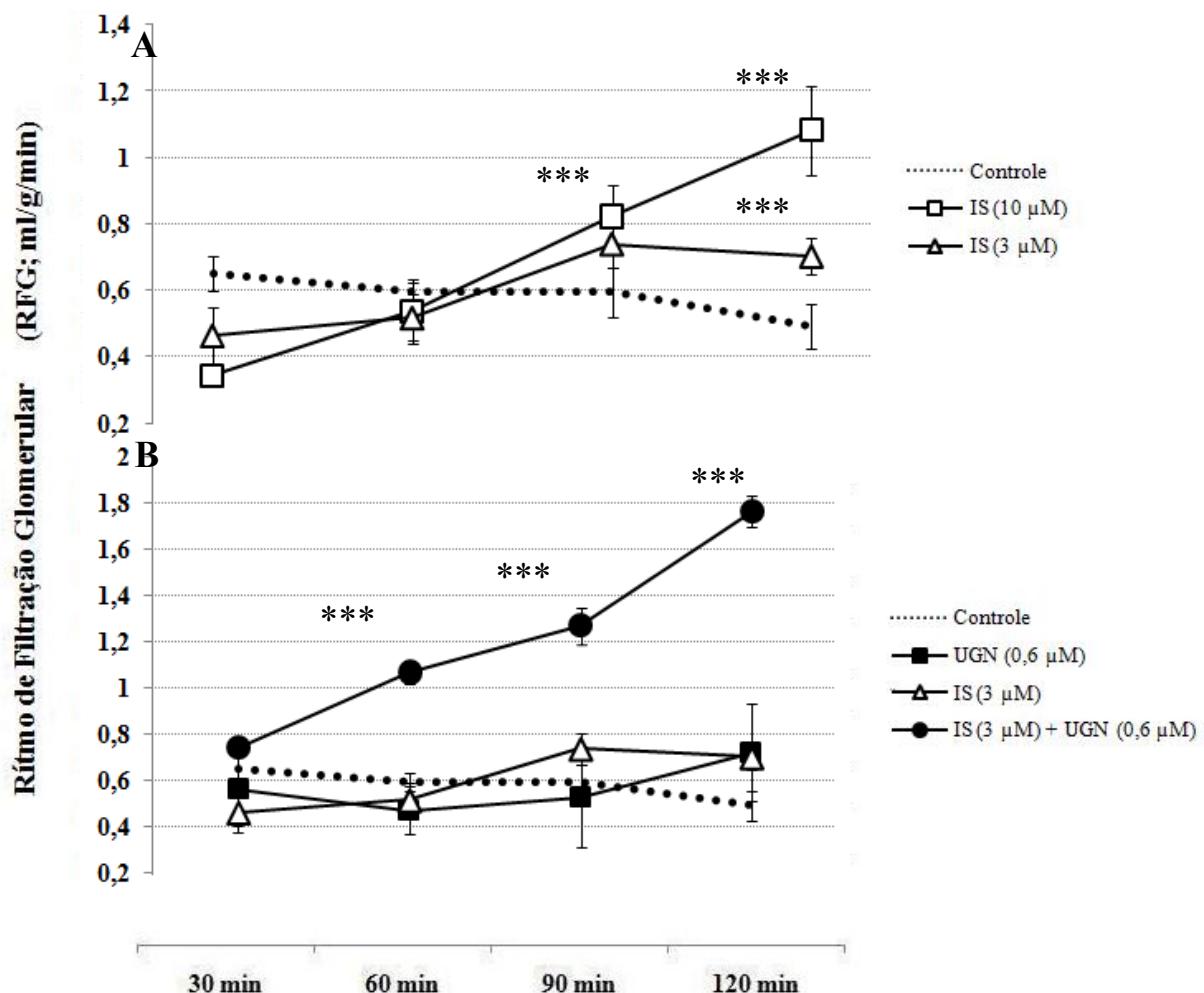


Figura 26: Cálculo do rítmico de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

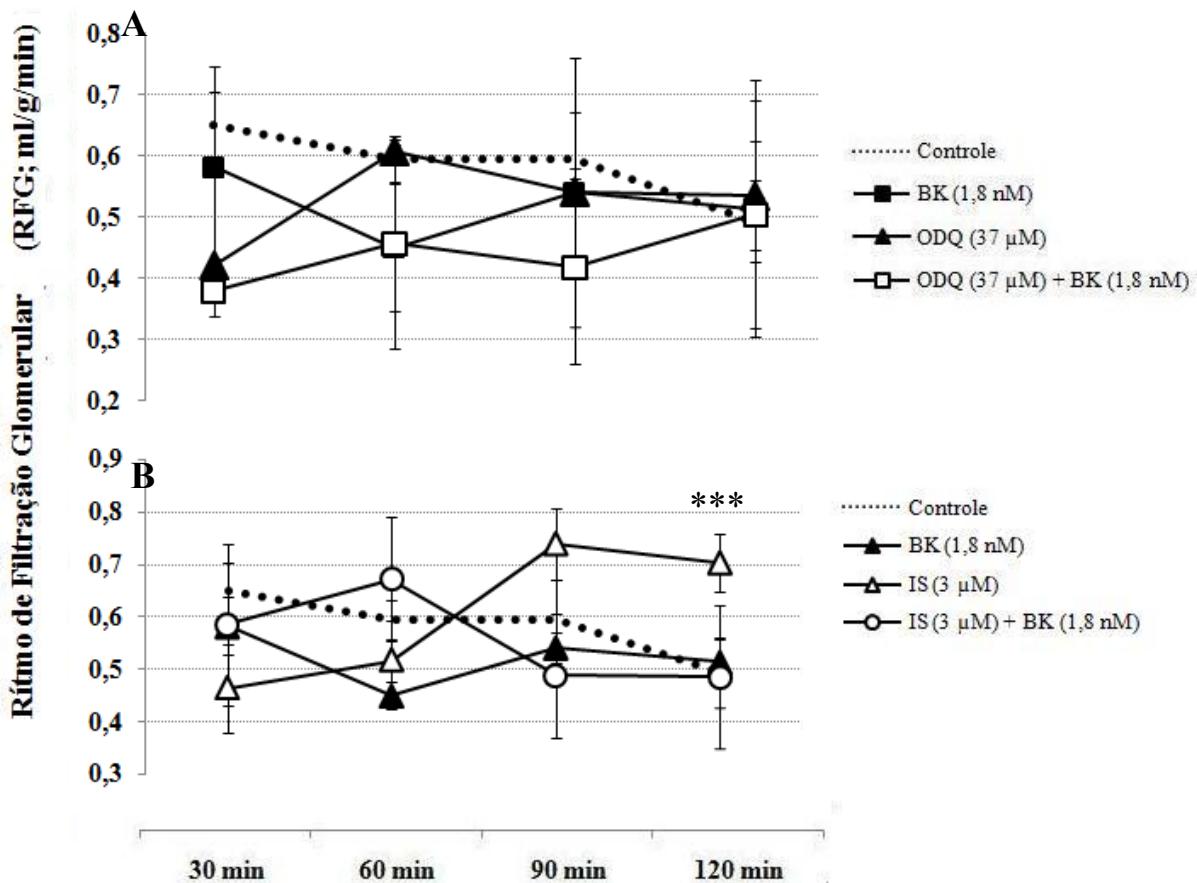


Figura 27: Cálculo do rítmico de filtração glomerular pelo clearance de inulina (RFG; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37μM; painel A) ou isatina (IS; 3 μM; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37μM; painel A) ou IS (3 μM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

5.2.2. Fluxo urinário

Os resultados relativos ao fluxo urinário (FU; mL/g/min; figuras 28 a 31) do grupo controle não apresentam variação significativa nos períodos 30, 60, 90 e 120 minutos. Na figura 28, observamos que uroguanilina (UGN; 0,6 μ M; painel a) produziu aumento do FU de modo mais pronunciado no período de 120 minutos. Nem bradicinina (BK; 0,3 nM; 0,9 nM ou 1,8 nM; figura 29 painel b) e nem urodilatina (0,03 nM; figura 29 painel b) produziu efeitos significativos na filtração glomerular, porém BK (0,3 nM; figura 29 painel b) aboliu o aumento do FU aos 90 e 120 min produzido por UGN (0,6 μ M). Isatina (03 μ M e 10 μ M) produziu significativo aumento do FU de modo mais pronunciado no período de 120 minutos (figura 30, painel a) e potencializou os efeitos de UGN (0,6 μ M; figura 26, painel b). ODQ (37 μ M) foi incapaz de produzir alterações significativas no FU e não interferiu no efeito de BK (1,8 nM) quando administrados no mesmo experimento (figura 31, painel a). Isatina (3 μ M) não produziu aumento do FU nos experimentos com BK (1,8 nM), o que fez com que abolisse o aumento do FU produzido por aquela (figura 31, painel b).

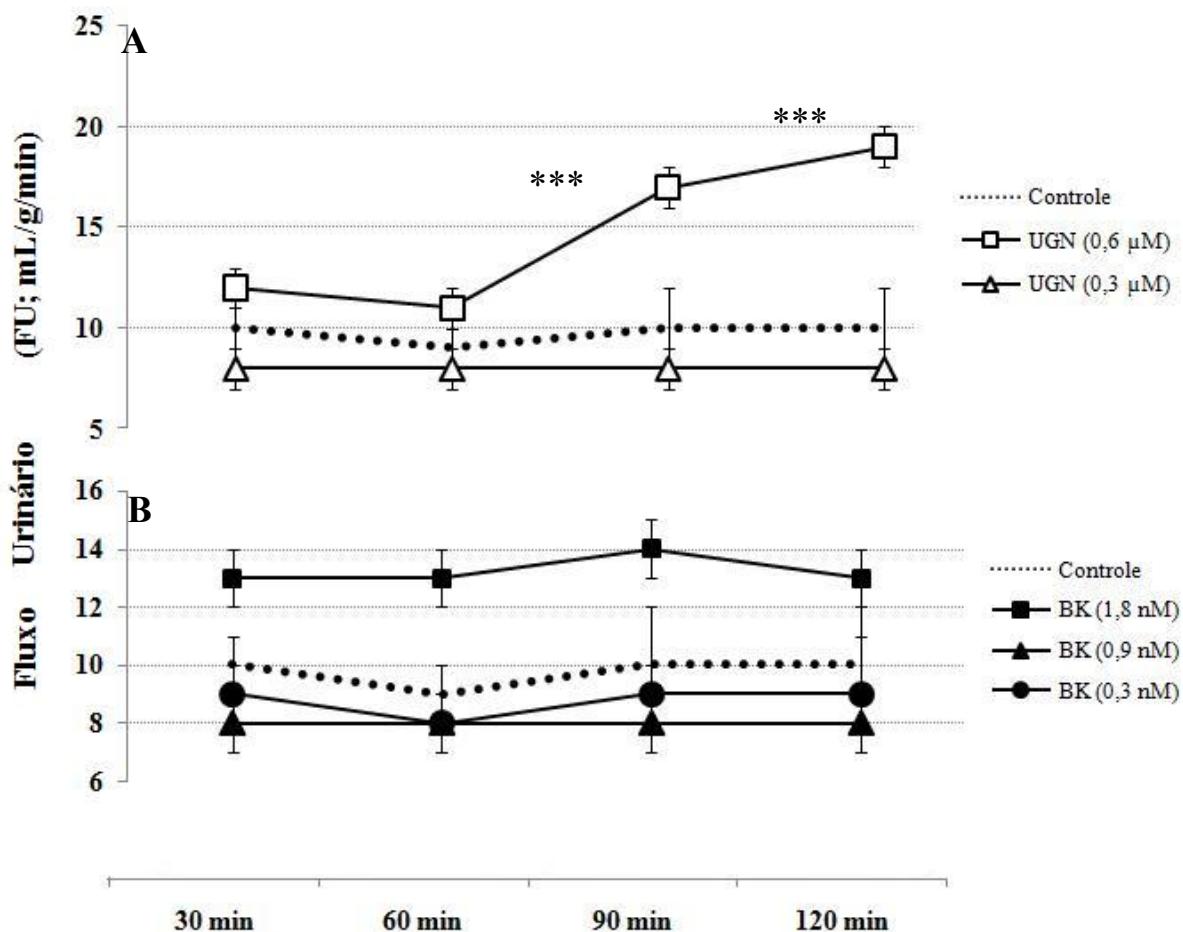


Figura 28: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

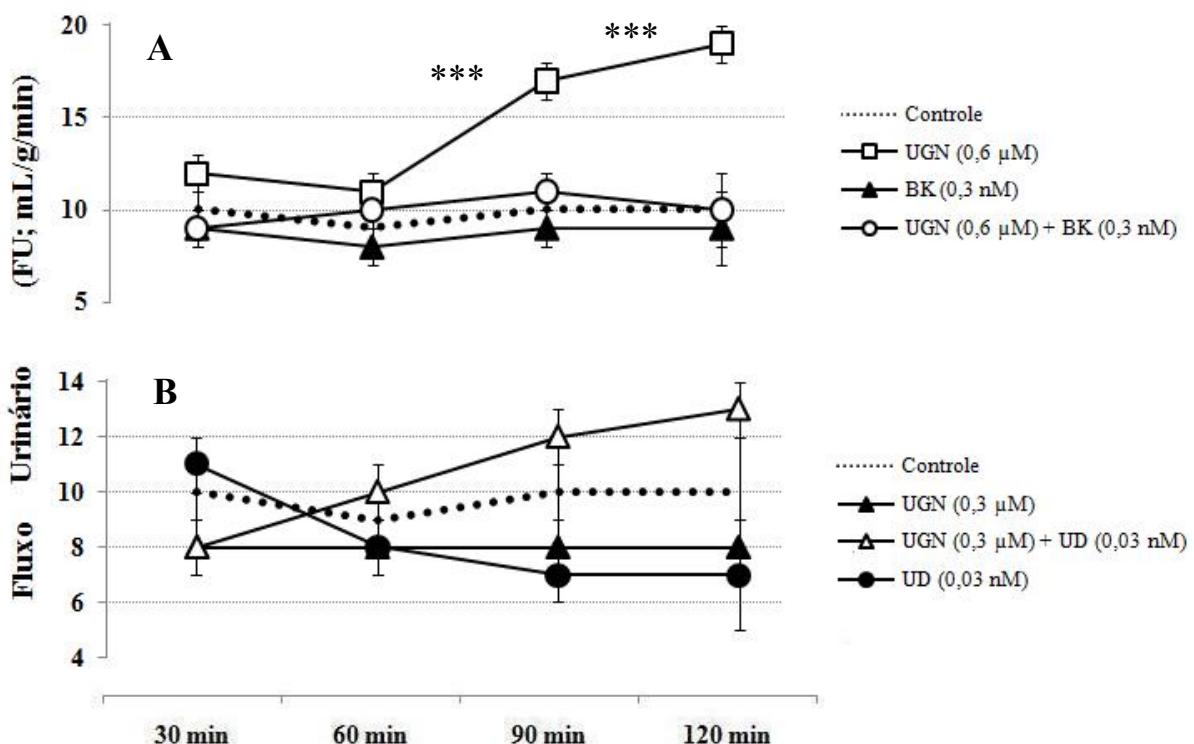


Figura 29: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

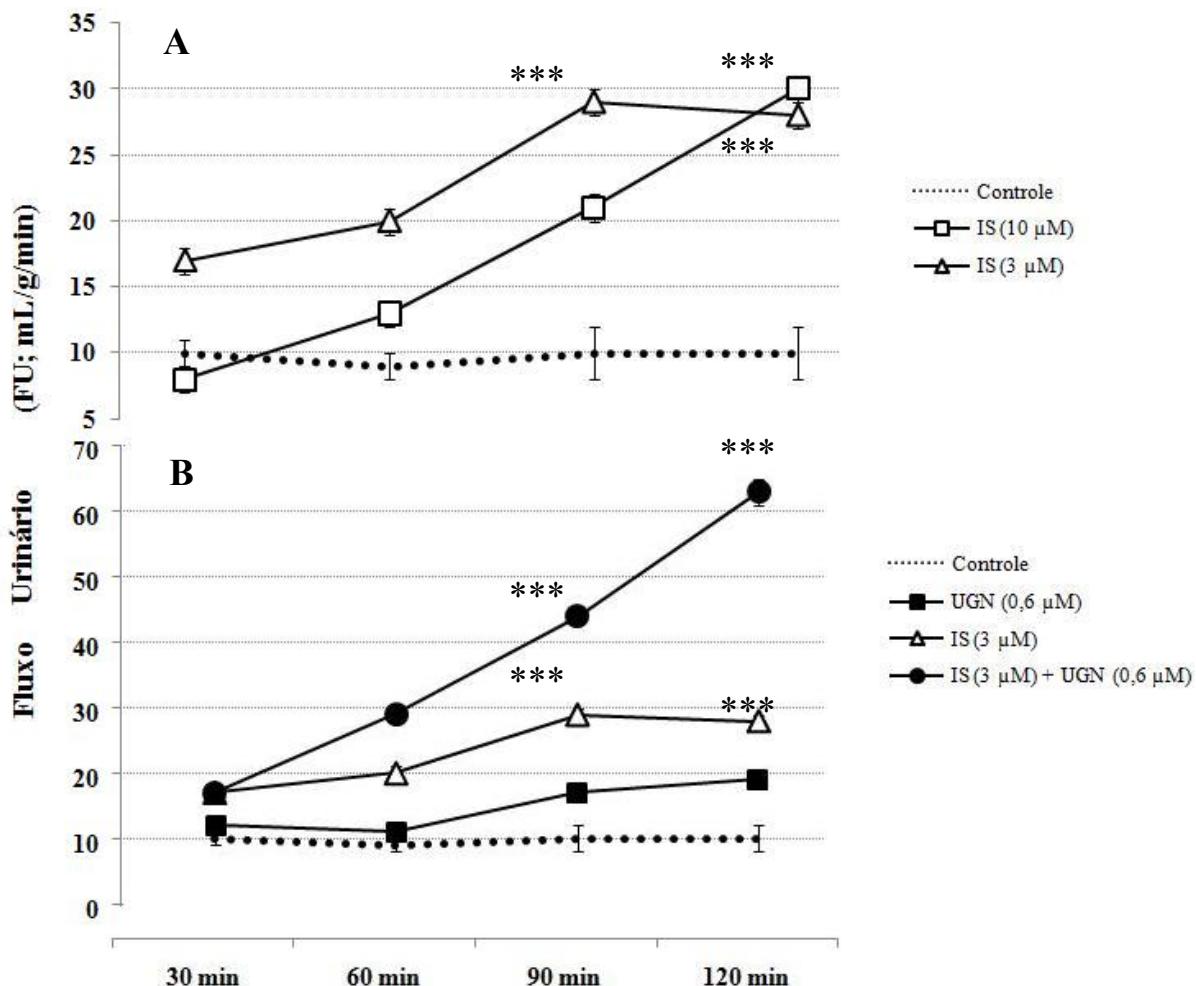


Figura 30: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

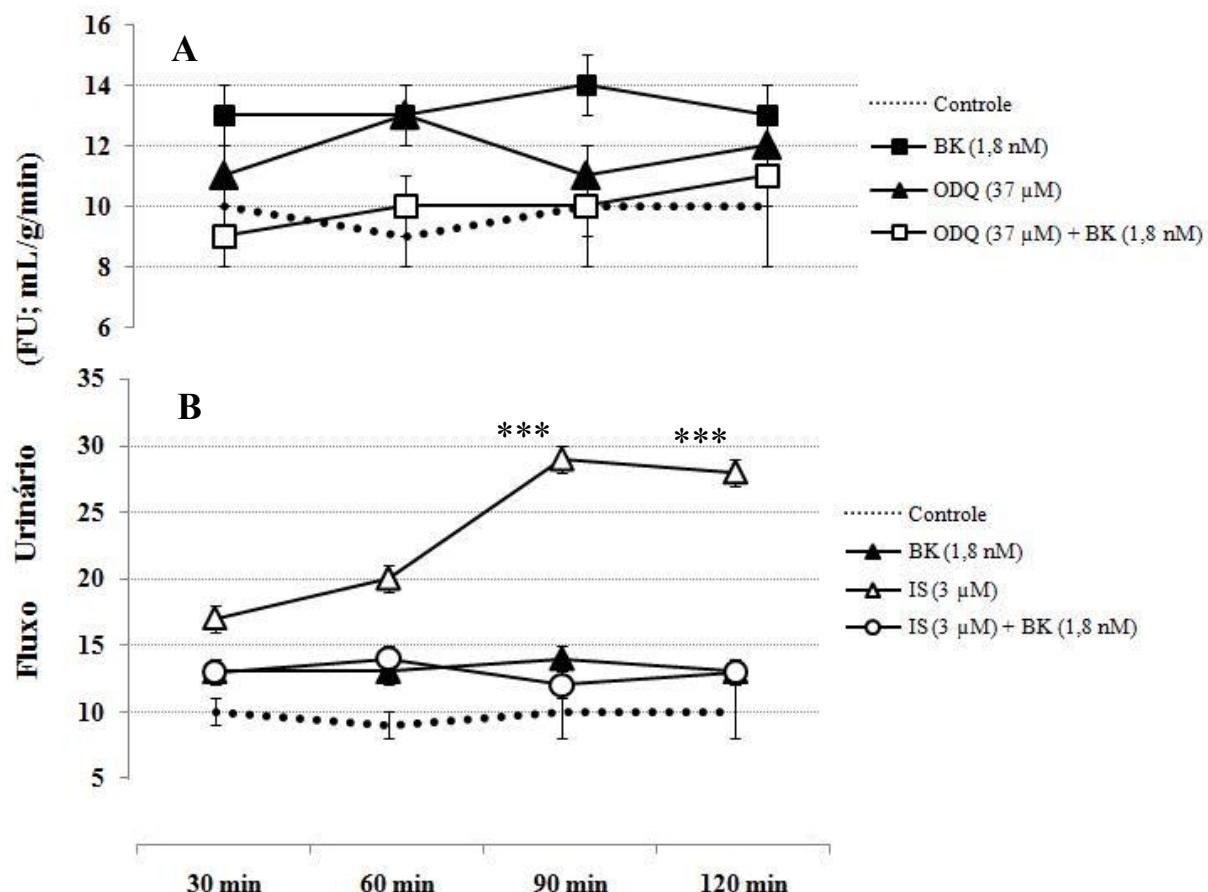


Figura 31: Medida do fluxo urinário colhido no ureter do rim (FU; mL/g/min). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

5.2.1. Transporte fracionado tubular de sódio

Conforme observado nas figuras 32 a 35, nos resultados relativos ao transporte tubular fracionado de sódio (%TNa), o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa nos períodos 30, 60, 90 e 120 minutos. Uroguanilina (UGN; 0,6 μ M; figura 32 painel a) produziu significativa redução no %TNa aos 90 e 120 min. Bradicinina (BK; 1,8 nM; figura 32 painel b) produziu transiente redução no %TNa de modo significativo aos 60 min, mas não foi capaz de interferir nos efeitos de UGN quando associadas nos mesmos experimentos (figura 33, painel a). Urodilatina (UD; 0,03 nM; figura 33 painel b) não produziu redução no %TNa em 90 e 120 min, efeito que se verificou nos experimentos em que UD esteve associada com UGN (0,3 μ M; figura 33 painel b). Na figura 34, isatina (IS; 10 μ M; painel a) produziu redução no %TNa aos 90 min e de maneira mais pronunciada no período de 120 minutos, IS (3 μ M; painel b) não interfere de forma significativa no %TNa e, quando associada a UGN (0,6 μ M; painel b) se mostra praticamente inerte com prevalecimento dos efeitos da última. ODQ (37 μ M; figura 35 painel a) não repercutiu significativamente no %TNa, mas foi capaz de interferir nos efeitos natriuréticos de BK (1,8 nM; figura 35 painel b).

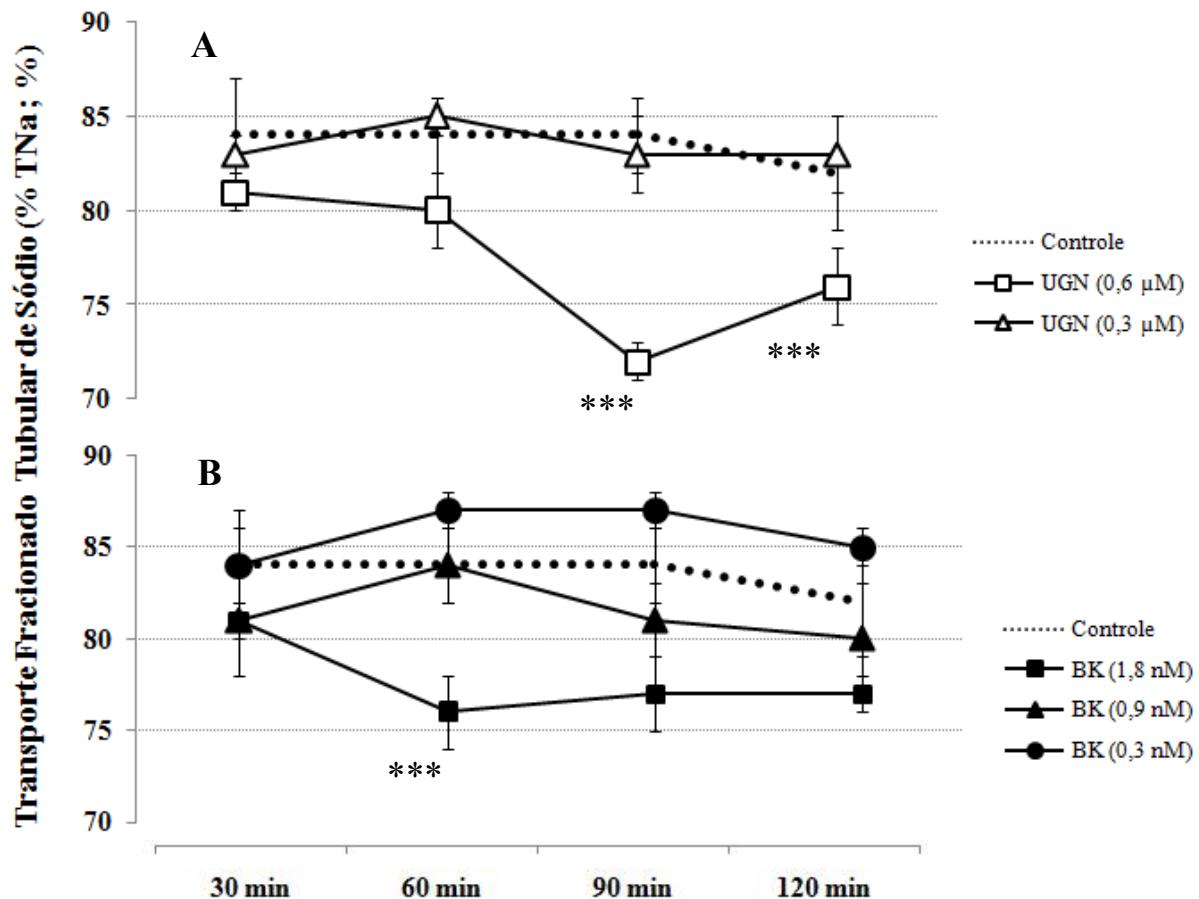


Figura 32: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** $P < 0,05$ em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

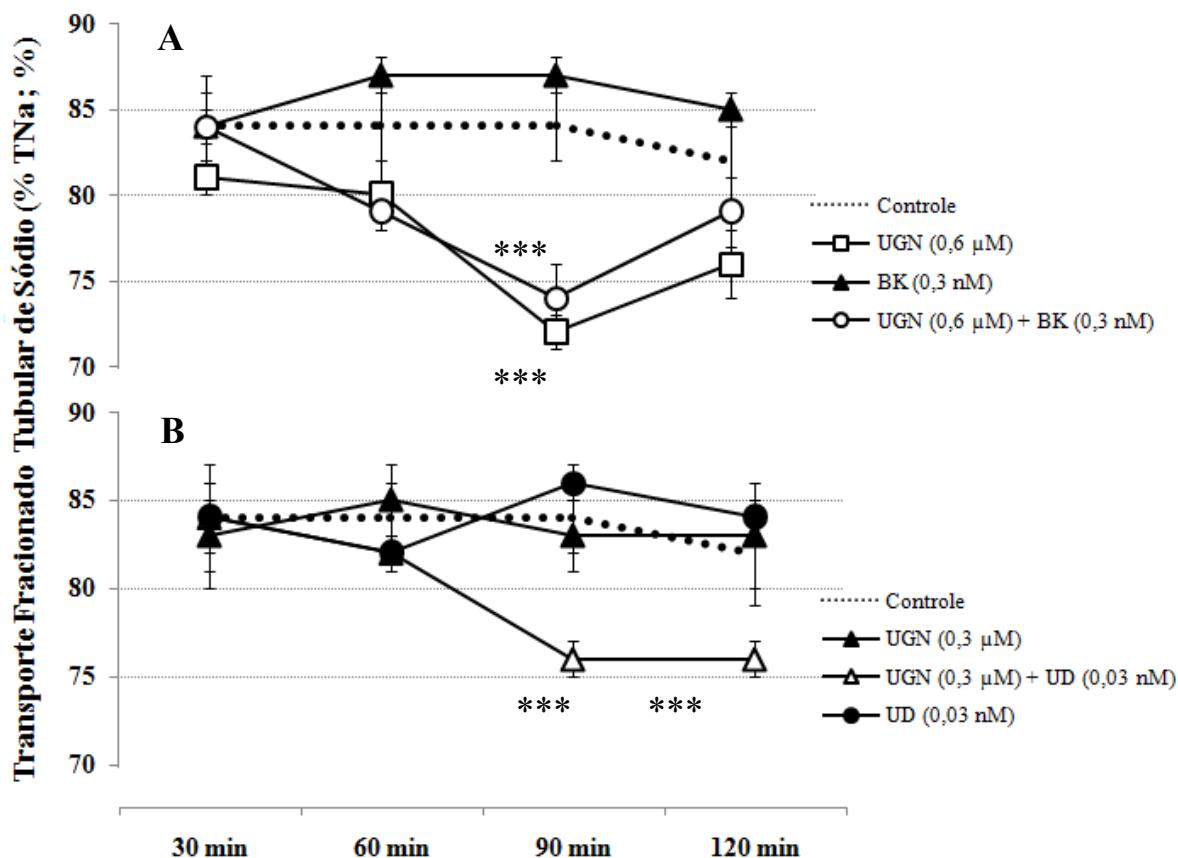


Figura 33: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

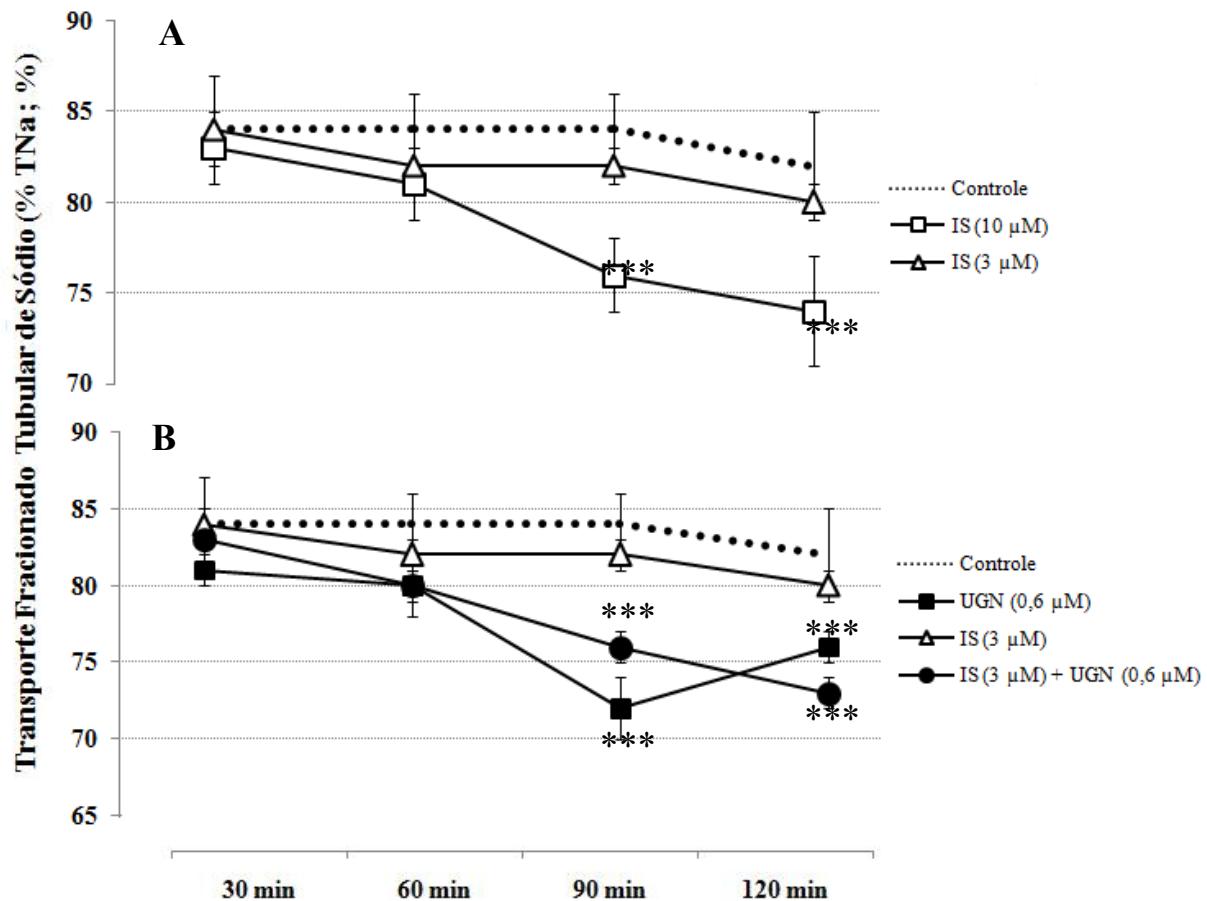


Figura 34: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

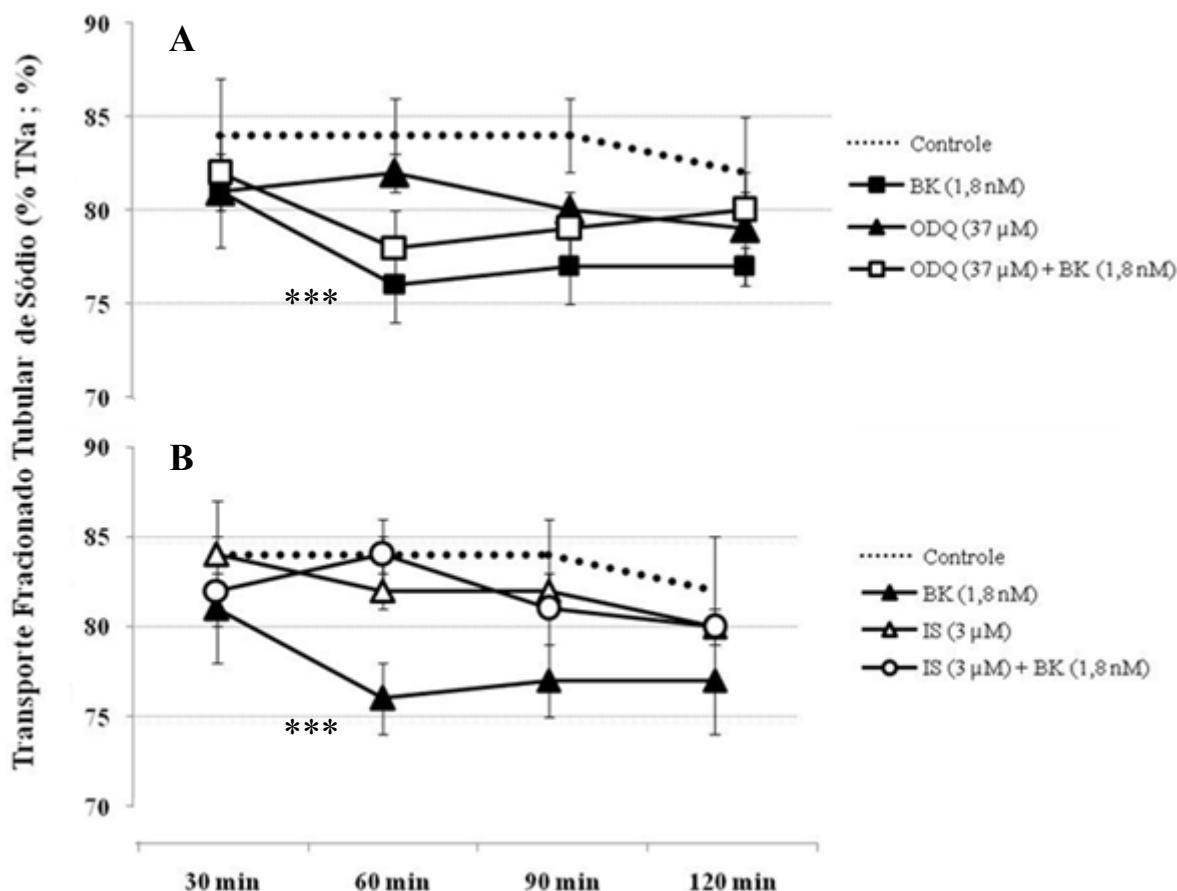


Figura 35: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Sódio (%TNa; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

5.2.1. Transporte fracionado tubular de potássio

Conforme observado nas figuras 36 a 39, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa nos períodos 30, 60, 90 e 120 minutos nos resultados relativos ao transporte tubular fracionado de potássio (%TK). Uroguanilina (UGN; 0,6 μ M; figura 36 painel a) produziu significativa redução no %TK aos 90 min. Bradicinina (BK; figura 36 painel b), somente na dose de 1,8 nM, produziu sólida redução no %TK de modo significativo entre 60 e 120 min, mas não foi capaz de interferir nos efeitos de UGN quando associadas nos mesmos experimentos (figura 37, painel a). Urodilatina (UD; 0,03 nM; figura 37 painel b) não produziu alterações no %TK em 90 e 120 min, mas caliurese se verificou nos experimentos em que UD esteve associada com UGN (0,3 μ M; figura 33 painel b). Na figura 38, isatina (IS; 10 μ M; painel a) incrementou caliurese aos 90 min e de maneira mais pronunciada no período de 120 minutos, IS (3 μ M; painel b) não interfere de forma significativa no %TK e, quando associada com UGN (0,6 μ M; painel b) ou com BK (1,8 nM; figura 39 painel b) se mostra praticamente inerte com prevalecimento dos efeitos caliuréticos das últimas. ODQ (37 μ M; figura 39 painel a) rediziu significativamente o %TK aos 120 min e foi capaz de abolir os efeitos caliuréticos de BK (1,8 nM; figura 35 painel b).

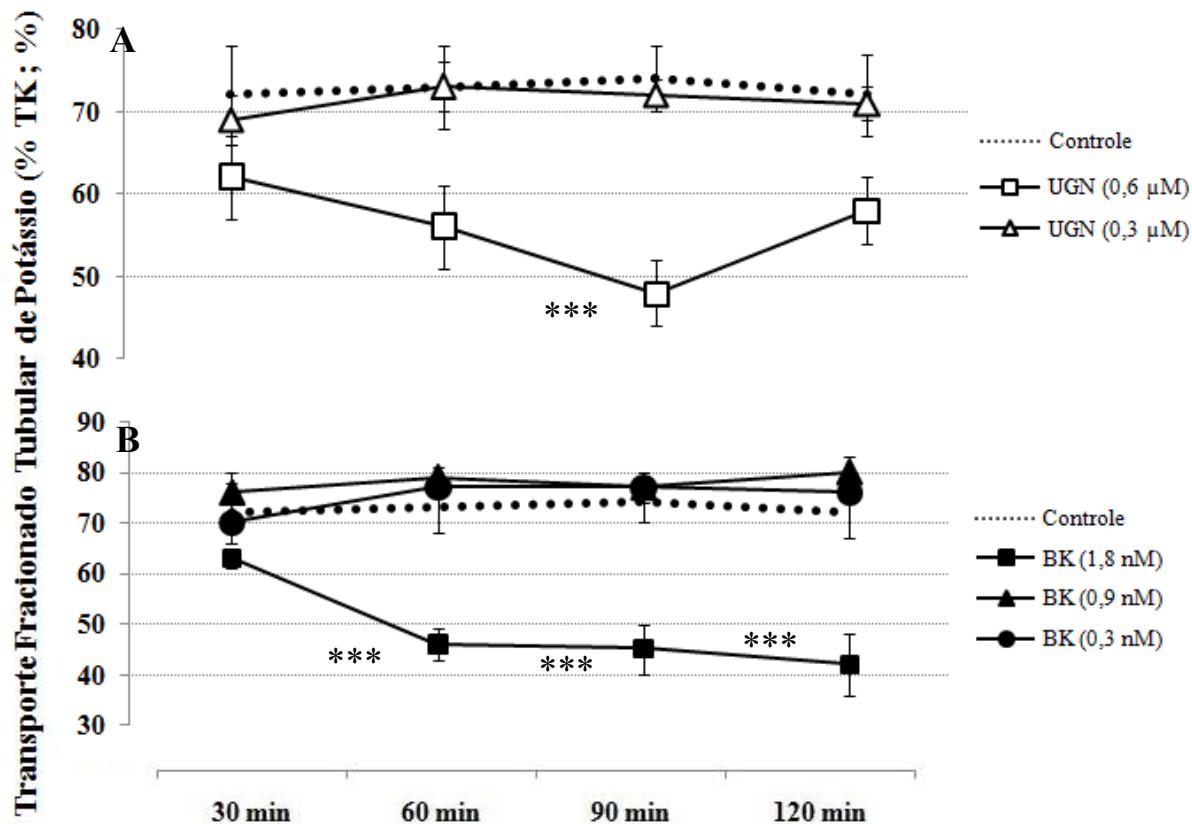


Figura 36: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

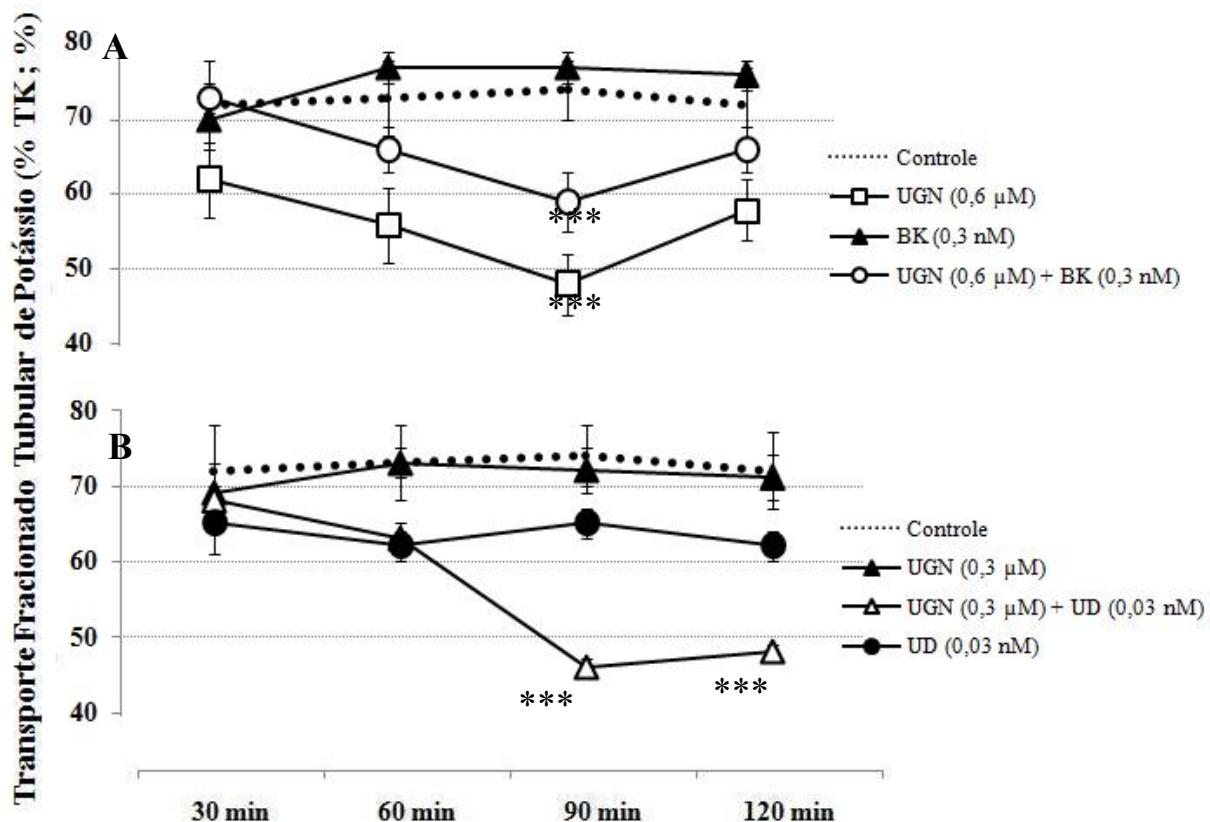


Figura 37: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

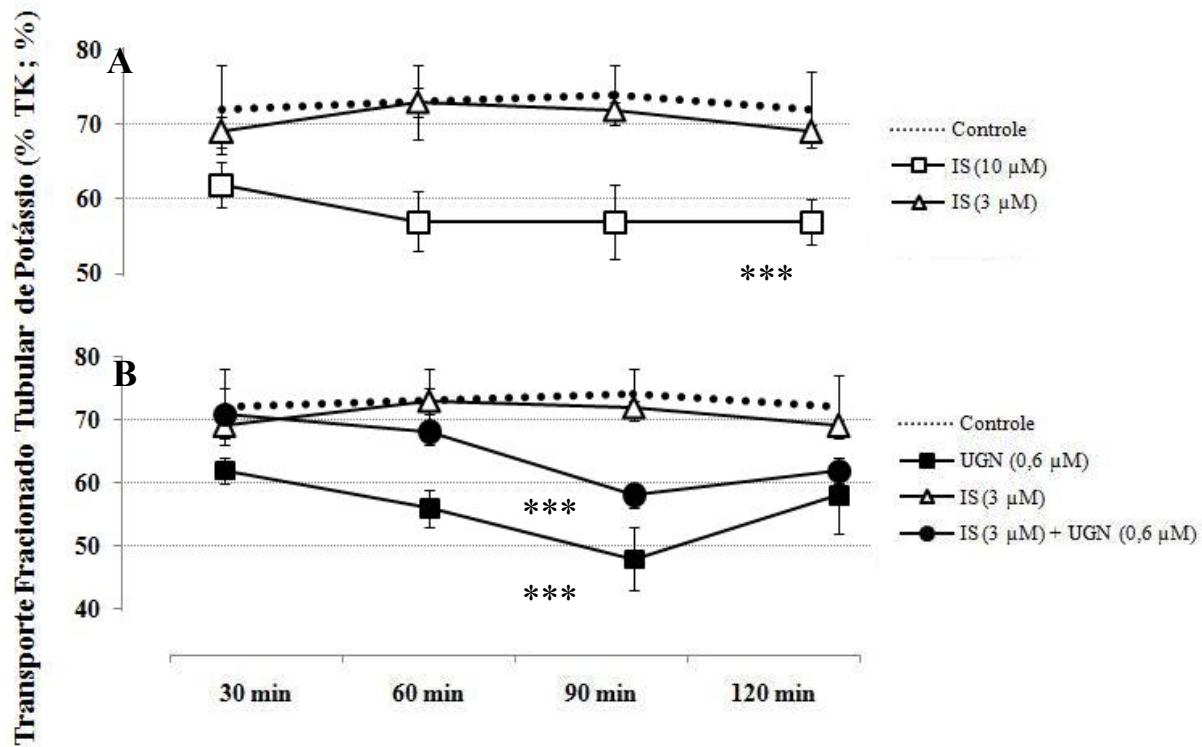


Figura 38: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

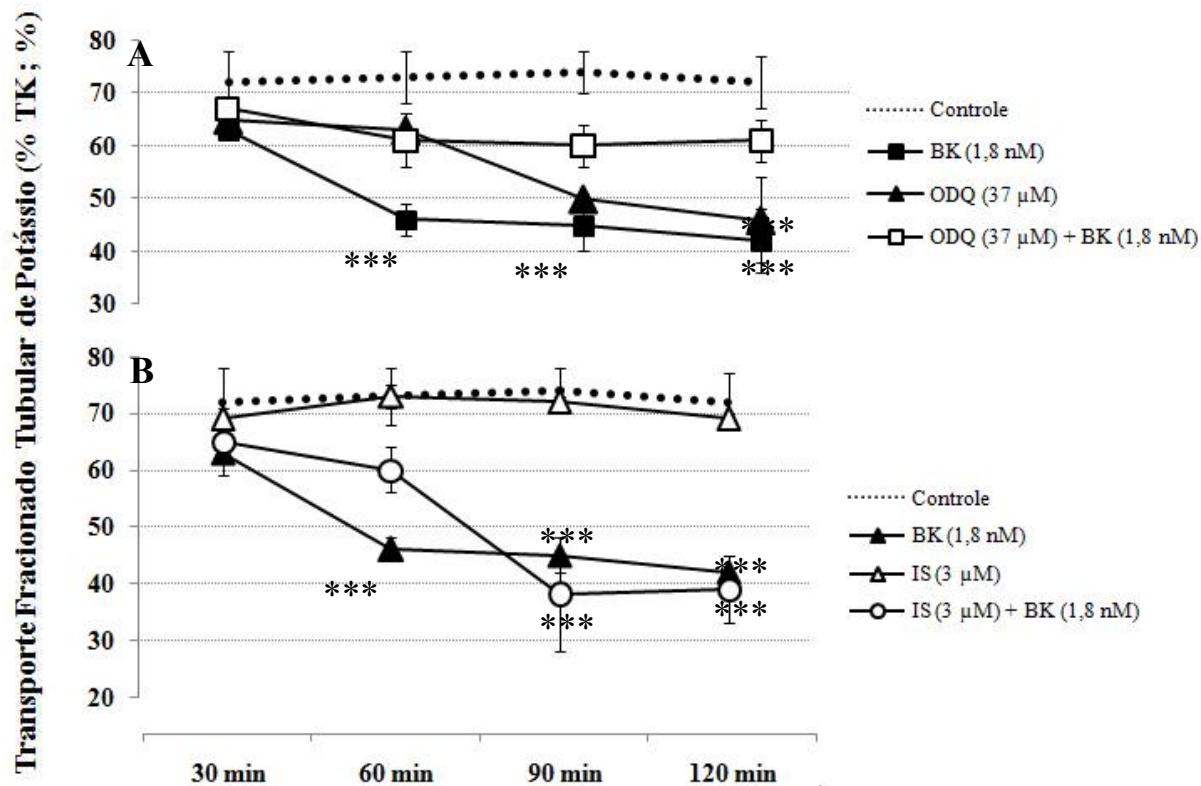


Figura 39: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Potássio (%TK; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

5.2.2. Transporte fracionado tubular de cloreto

Conforme observado nas figuras 40 a 43, o grupo controle não apresenta qualquer variação significativa nos períodos 30, 60, 90 e 120 minutos nos resultados relativos ao transporte tubular fracionado de cloreto (%TCl). Uroguanilina (UGN; 0,6 μ M; figura 40 painel a) produziu transiente mas significativa redução no %TCl aos 90 min. Bradicinina (BK; figura 40 painel b), somente aos 120 min e na dose de 1,8 nM, produziu redução no %TCl de modo significativo 120 min, mas não foi capaz de interferir nos efeitos de UGN quando associadas nos mesmos experimentos (figura 41, painel a). Urodilatina (UD; 0,03 nM; figura 41 painel b) não interferiu de modo significativo no %TCl, mas em 90 e 120 min se verificou caliurese nos experimentos em que UD esteve associada com UGN (0,3 μ M; figura 41 painel b). Na figura 42, isatina (IS; 10 μ M; painel a) incrementou caliurese de maneira significativa no período de 120 minutos. IS (3 μ M; figura 42 painel b) não interfere de forma significativa no %TCl e, em associação com BK (1,8 nM; figura 39 painel b) nos mesmos experimentos, se mostra praticamente inerte com prevalecimento dos efeitos caluréticos das últimas.. Quando associada com UGN (0,6 μ M; painel b), IS (0,3 μ M) potencializou seu efeito aos 120 min. ODQ (37 μ M; figura 43 painel a) não interfere significativamente no %TCl mas foi capaz de abolir os efeitos cloruréticos de BK (1,8 nM; figura 35 painel b).

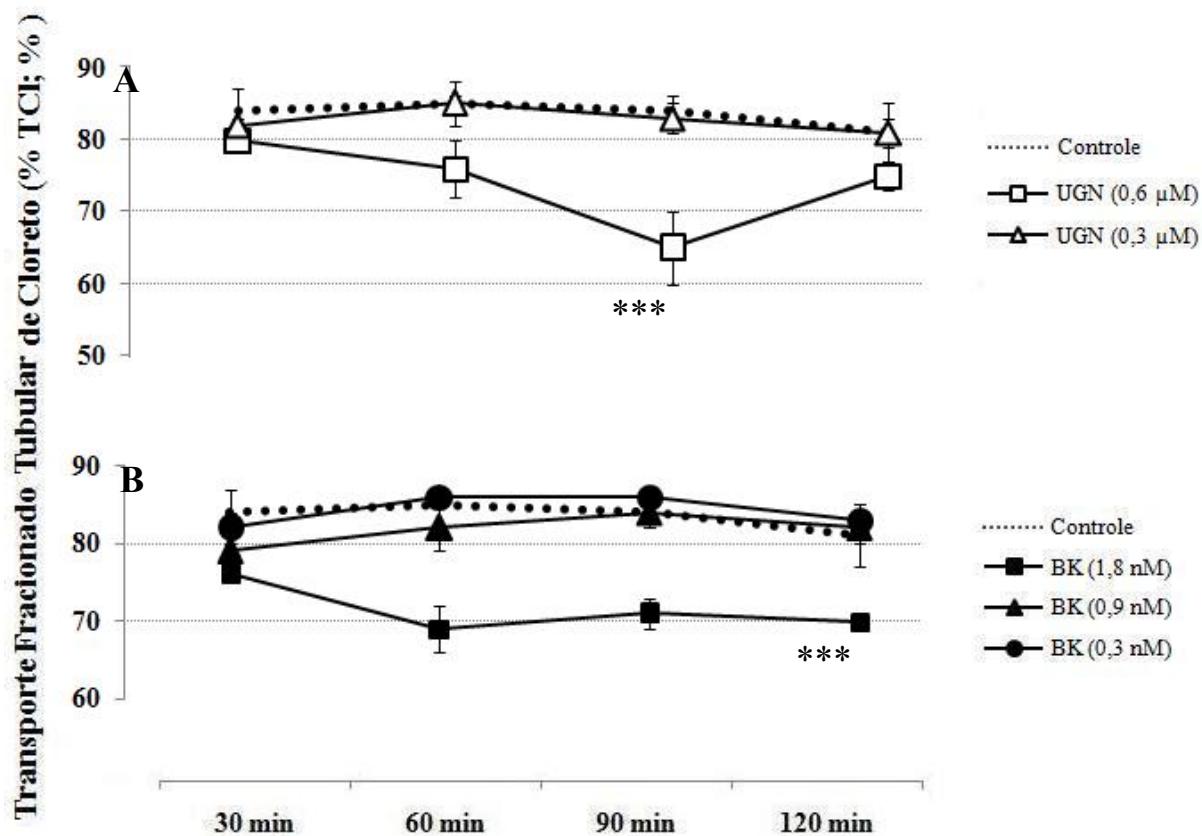


Figura 40: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M; painel A) ou bradicinina (BK; 0,3 ou 0,9 ou 1,8nM; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

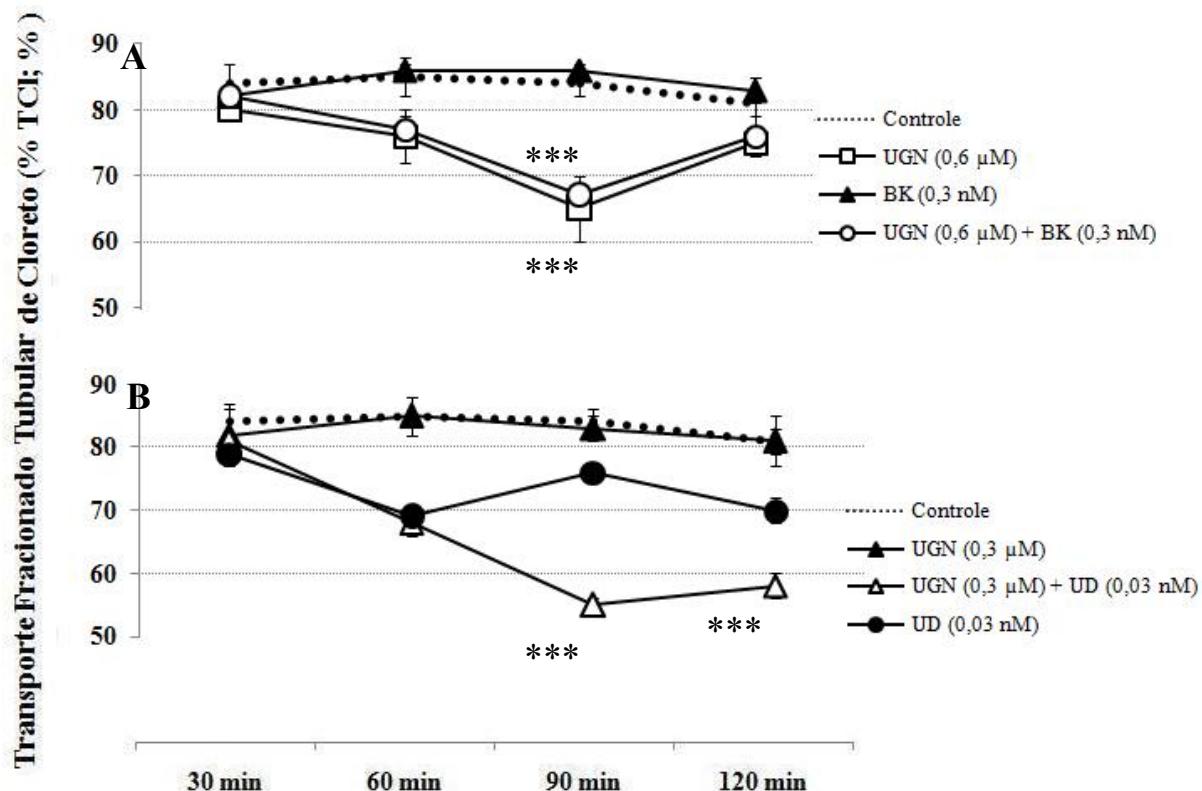


Figura 41: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: uroguanilina (UGN; 0,3 ou 0,6 μ M), bradicinina (BK; 0,3nM) ou urodilatina (UD; 0,03nM). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,6 μ M; painel A), enquanto UD (0,03nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com UGN (0,3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

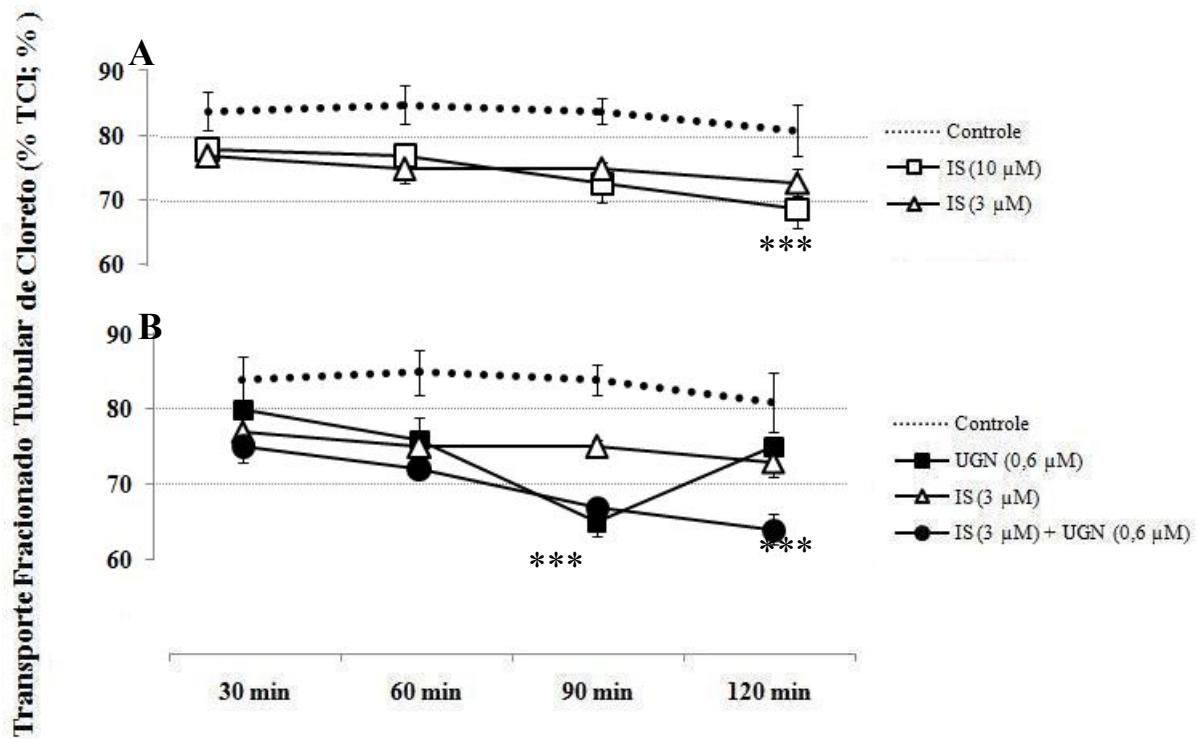


Figura 42: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: isatina (IS; 3 μ M; painel A e B; ou 10 μ M; painel A) ou uroguanilina (0,6 μ M; painel B). uroguanilina (0,6 μ M; painel B) foi também administrada após 60 min de perfusão com IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

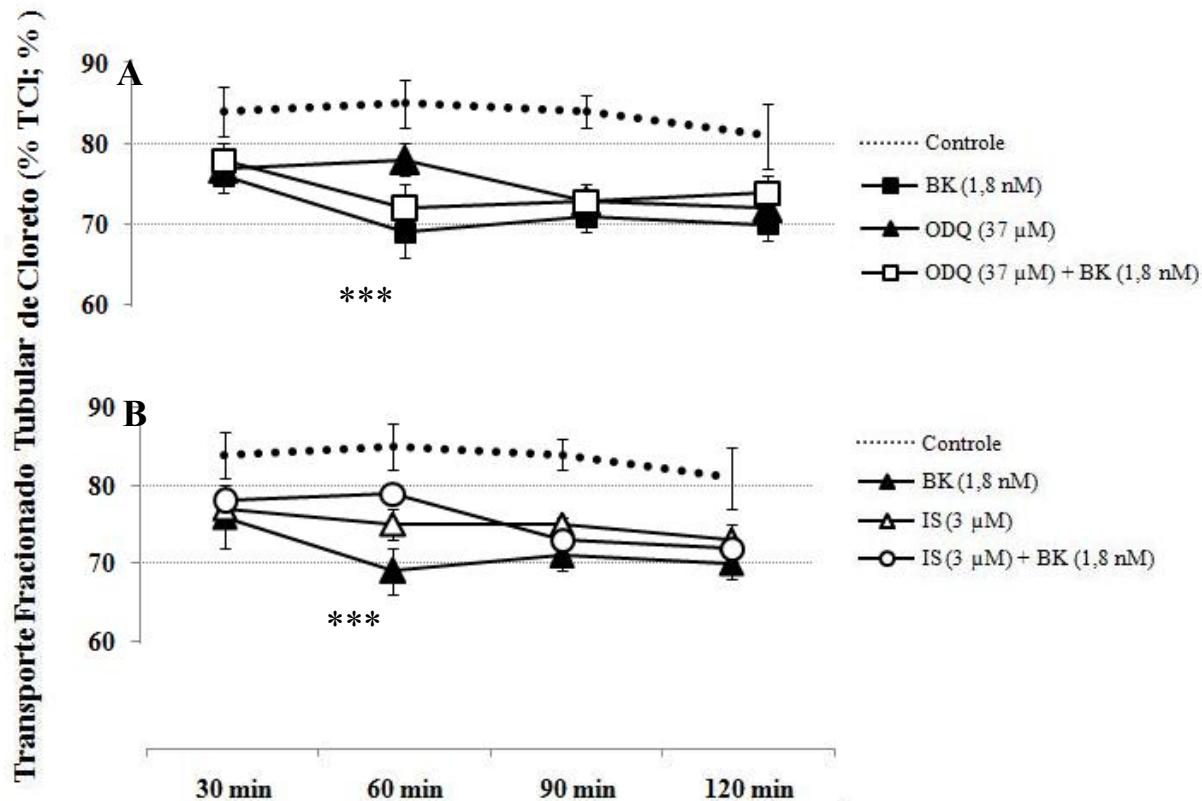


Figura 43: Cálculo do Transporte Fracionado Tubular de Cloreto (%TCl; %). Após 30 min de perfusão para controle interno, foi administrado: bradicinina (BK; 1,8nM), ODQ (37 μ M; painel A) ou isatina (IS; 3 μ M; painel B). BK (1,8nM) foi também administrada após 60 min de perfusão com ODQ (37 μ M; painel A) ou IS (3 μ M; painel B). Cálculo de média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de 12 amostras para cada grupo experimental. *** P < 0,05 em comparação ao Controle e ao controle interno (30 min) do próprio experimento.

6. DISCUSSÃO

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

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

Uma preocupação posterior foi analizar os efeitos próprios dos bloqueadores que iríamos utilizar para saber quais seus potenciais efeitos na fisiologia renal que pudesse mascarar seu uso como instrumento de dissecação farmacológica.

O indol-2,3 diona isatina, por exemplo, tem várias ações farmacológicas descritas, como inibição da MAO B, com inibição constante na faixa 3–20 μM enquanto que a inibição da MAO A acontece em concentrações maiores (K_i 60–70 μM). A ação farmacológica mais potente da isatina *in vitro* é a inibição da ligação do ANP ao seu receptor com uma IC_{50} de 0,4 μM . A isatina inibe a ação do ANP e a formação subsequente de GMPc em membranas isoladas do cérebro, coração e rins de rato (Glover *et al.*, 1988 ; Glover *et al.*, 1995).

Este composto é o único composto não-peptídeo endógeno que age como antagonista do sistema de peptídeos natriuréticos. É interessante notar que, não apenas a guanilato ciclase particulada (pGC) é inibida por isatina, mas também a isoforma solúvel como demonstrado por Medvedev e colaboradores em 2002.

Em baixas concentrações (até 10 nM), a isatina pode também inibir a função da guanilato ciclase solúvel. No entanto, esta inibiçao apesar de acontecer já em doses nanomolares não ultrapassa 40% da atividade enzimática máxima mesmo que a concentração seja aumentada até 100 μ M (Medvedev *et al.*, 1996; Glover *et al.*, 1998).

Por outro lado, este composto na concentração de 50 μ M reduz a atividade da guanilato ciclase particulada de cérebro e coração de rato em 60–80%, enquanto que a inibiçao total é atingidida na concentração de 100 μ M (Glover *et al.*, 1995).

A isatina, por exemplo, apresentou efeitos diuréticos e natriuréticos próprios na dose de 10 μ M, fenômeno este parcialmente associado ao seu grande efeito pressórico, principalmente nos tempos de 90 e 120 minutos, que não teve correspondência autoregulatória na resistência vascular e pode, portanto, ter contribuído para um aumento efetivo na carga filtrada. A possibilidade de este composto afetar diretamente a função tubular pela inativação de fenômenos regulatórios não pode ser descartada, mas não foi objeto de investigação em nosso estudo.

Este bloqueio da guanilato ciclase solúvel associado ao bloqueio da guanilato ciclase de membrana pode ser o responsável pelo incremento pressórico produzido pelo isatina observado em nossos experimentos.

No entanto, em nossos experimentos concentrações maiores (i.e., 10 μ M) tiveram muito efeito intrínseco na função renal, tornando difícil seu uso para dissecar os efeitos da uroguanilina. A ausênciia de eficácia da isatina em bloquear os efeitos renais da uroguanilina pode refletir, ou uma sobreposição de seus efeitos vasculares pressóricos, que se refletem no grande incremento da resistência vascular renal, sobre os efeitos tubulares ou ainda pela incapacidade de diminuir a atividade de guanilato ciclase particulada do tipo C.

Contudo, na mesma concentração utilizada contra a uroguanilina, a isatina foi capaz de inibir o efeito da bradicinina no transporte de sódio e cloreto, muito provavelmente por sua capacidade de bloquear a guanilato ciclase solúvel (Medvedev *et al.*, 2002). Este argumento é reforçado pelo fato do ODQ, um inibidor da ativação do grupo heme da guanilato ciclase solúvel, ter tido um efeito inibitório semelhante.

Os bloqueadores utilizados em nossos experimentos, i.e., isatina e ODQ, provocaram alguns efeitos intrínsecos que, no entanto, não mascararam os efeitos que observamos para os agonistas bradicinina e uroguanilina.

A associação de isatina e uroguanilina produziu um incremento na pressão que está relacionado com a reabsorção tubular de sódio, sendo este efeito na dinâmica dos fluidos tão importante na resposta, quanto seu efeitos tubulares. A isatina promove este efeito por inibir a óxido nítrico sintetase constitutiva e por diminuir a atividade do tipo guanilato ciclase (Medvedev *et al.*, 1996; Glover *et al.*, 1998).

O ODQ, bloqueador da ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO, aumenta especificamente a excreção de potássio nos tempos de 90 e 120 minutos sem alterar os níveis pressóricos nestes tempos. A explicação para esta observação pode estar baseada na atividade basal no NO como agente natriurético por sua ação vasodilatadora renal, pela atenuação do mecanismo de regulação tubuloglomerular e por inibir a reabsorção de sódio (Ortiz e Garvin, *et al* 2002). Cowley e colaboradores (2003) demonstraram, por exemplo, que o déficit intrarenal da síntese de NO acarreta retenção de sódio e incremento da pressão arterial sistêmica.

Um dos efeitos tubulares do NO, além do incremento de GMPc, que explica seu efeito natriurético, é sua ação inibitória sobre a isoforma $\alpha 1$ da sódio-potássio ATPase (menos sensível à inibição por ouabaína). A sódio-potássio ATPase, localizada na membrana basolateral das células tubulares renais, promove reabsorção ativa de sódio através do néfron e desta maneira está envolvida na regulação do

volume do líquido extracelular e da pressão arterial (Fréaille e Doucet, 2001). Experimentos realizados *in vitro* demonstram que o NO diminui a atividade da sódio-potássio ATPase no túbulo proximal (Aperia *et al.*, 1994; Zhang e Mayeoux, 2001), no ramo ascendente espesso da alça de Henle (Kone e Higham, 1999), em cortes de tecido medular renal (Scavone *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2000). Ademais, a infusão de doadores de NO ou do precursor do NO, L-arginina, diminuem a atividade da sódio-potássio ATPase enquanto a infusão de um inibidor da sintase de óxido nítrico, L-NAME, aumenta a atividade desta enzima sugerindo assim, que a sódio-potássio ATPase é tonicamente regulada por NO (Betowski *et al.*, 2003).

Portanto, a inibição da guanilato ciclase solúvel por ODQ pode aumentar a atividade da sódio-potássio ATPase nos túbulos distais e desta maneira aumentar a excreção de potássio, justificando assim nossos achados experimentais. Os efeitos na excreção de sódio não seriam significativos por serem também modulados nos túbulos distais pelos trocadores de sódio com bicarbonato e de sódio com hidrogênio sendo desta maneira compensados.

A escolha da isatina para dissecar os efeitos da uroguanilina na função renal se deve ao fato deste composto bloquear indistintamente os receptores principais para os peptídeos natriuréticos, quais sejam os receptores NPR-A, NPR-B e NPR-C. O grupo alemão, liderado pelo professor Ebehard Schlatter propõe que algumas ações da uroguanilina que não são explicadas por sua ação na guanilato ciclase particulada em membrana do tipo C (GC-C) se devam a sua interação com um receptor acoplado a proteína G e propõe que este receptor seja o NPR-C.

Neste sentido, para melhor entendimento, explicaremos as interseções entre os dois sistemas complementares, peptídeos natriuréticos convencionais e as guanilinas. Os receptores NPR-A e NPR-B dos peptídeos natriuréticos, correspondem aos receptores de guanilato ciclase acoplados à membrana tipo GC-A e GC-B. No

entanto, o receptor de clearence, NPR-C, dos peptídeos natriuréticos não corresponde ao receptor do tipo guanilato ciclase do tipo C (GC-C). O receptor NPR-C não tem atividade catalítica do tipo guanilato ciclase (Anand-Srivastava, 1997; Anand-Srivastava and Trachte, 1993; Savoie *et al.*, 1995).

Os peptídeos natriuréticos (i.e., peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP), peptídeo natriurético do tipo C (CNP) e urodilatina são uma família estruturalmente relacionada que contém um anel de 17 aminoácidos estabilizados por uma ponte dissulfeto (Anand-Srivastava e Trachte, 1993; Yandle, 1994). Vários tipos de receptores para peptídeos natriuréticos foram identificados. Os receptores para peptídeos natriuréticos do tipo A e B são, por exemplo, proteínas transmembrana simples com peso molecular entre 120–130 kDa, com atividade guanilil ciclase, enquanto o receptor do tipo C (receptor de clearence) está acoplado à inibição da adenilil ciclase através de uma proteína G regulatória (Anand-Srivastava and Trachte, 1993; Leitman *et al.*, 1994; Savoie *et al.*, 1995). Tanto ANP como BNP agem por ligação preferencial ao receptor do tipo A, enquanto o CNP interage de maneira relativamente seletiva pelo receptor do tipo B (Yandle, 1994) . Os três peptídeos e as próprias guanilinas interagem com o receptor do tipo C e inibem a atividade da adenilil ciclase (Anand-Srivastava, 1997; Anand-Srivastava and Trachte, 1993; Savoie *et al.*, 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 NH₂-terminal). Existem dois domínios intracelulares. Na

região COOH-terminal está o domínio catalítico guanilil ciclase, trata-se de uma sequência 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 transdução dos peptídeos guanilina/STa. Na região quinase-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 experimentos, uroguanilina induziu aumento da pressão de perfusão, aumentando o fluxo urinário nos intervalos de 90 e 120 min, ao mesmo tempo em 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). Uroguanilina sozinha também aumentou o clearance osmolar no intervalo de 120 min. Estes efeitos atribuíveis à uroguanilina em nossas observações foram semelhantes aos observados por Fonteles (Fonteles *et al.*, 1998).

A uroguanilina *per si* aumenta, em nossos experimentos, a pressão de perfusão renal muito provavelmente por seus efeitos despolarizantes descritos para doses micromolares (Sindic *et al.*, 2005). Estes efeitos dependem da interação da uroguanilina com outro receptor que não o guanilato ciclase de membrana do tipo C.

Este dado sugere a existência de múltiplos sítios de ação para uroguanilina, que podem envolver diferentes receptores e transportadores, como proposto por Carrithers e colaboradores (2004), ou interações com diferentes mediadores ao longo do néfron, como sugerido por estudos recentes (Sindic *et al.*, 2005).

No rim, está bem documentado que uroguanilina aumenta a excreção de Na^+ e K^+ e água, sem promover alterações no ritmo de filtração glomerular, fluxo plasmático renal, ou osmolalidade urinária (Greenberg *et al.*, 1997; Fonteles *et al.*, 1998; Carrithers *et al.*, 2004). No intestino, uroguanilina também promove secreção de eletrólitos e consequente diarréia (Sindic *et al.*, 2002). Estes efeitos são mediados via ativação de guanilato ciclase de membrana (GC-C), a qual é também sítio de ação da guanilina e da enterotoxina termoestável da *E. Coli*, STa.

Em células intestinais a ativação da GC-C e o aumento intracelular de GMPc por guanilina e uroguanilina ativa a proteína quinase G II (PKG II) (Vaandrager *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1997) e inibe a fosfodiesterase III, o que permite o aumento intracelular de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) (Chao *et al.*, 1994; Dousa, 1999; Vaandrager *et al.*, 2000). PKG II e PKA aumentam a secreção de Cl^- , HCO_3^- e água via ativação de canal de cloreto da fibrose cística (CFTR) (Chao *et al.*, 1994; Tien *et al.*, 1994). Além disso, a absorção de sódio via trocador Na^+/H^+ apical é também inibida (Fawcus *et al.*, 1997). Tem sido demonstrado que AMPc medeia a ativação (aumento de densidade) dos canais para potássio tipo ROMK em ductos coletores corticais de ratos (Cassola *et al.*, 1993); Dessa forma, uma via luminal Ca^{2+} -dependente pode ser ativada pela uroguanilina, promovendo o aumento da secreção de potássio.

Em células renais o aumento dos níveis de GMPc induzido por uroguanilina foi demonstrado em células de túbulos proximais de rim de gambá (células OK) (London *et al.*, 1999) e em uma linhagem de células de túbulos proximais de humanos

(IHKE1) (Sindic *et al.*, 2002). Além disso, GMPc e STa inibem o transporte de Na^+ em túbulos proximais (Lima *et al.*, 1992). No entanto, estudos utilizando camundongo deficiente em GC-C, demonstram que o efeito intestinal dos peptídeos de guanilina é eliminado, porém a natriurese ainda ocorre, sugerindo a existência de uma outra via, além da GC-C em células renais (Carrithers *et al.*, 2004). Dessa forma, não está completamente certo que os efeitos renais da uroguanilina ocorrem por ativação somente da via GC-C/ GMPc.

Além disso, estudos recentes demonstram que em camundongos “Knockout” para uroguanilina, ocorrem alterações no processo de redistribuição da isoforma NHE₃ do trocador Na^+/H^+ , em túbulos proximais, o que promove aumento na reabsorção proximal de sódio (Elitsur *et al.*, 2006).

Estes mecanismos independentes de GC-C tem sido demonstrada não só para uroguanilina como para outros peptídeos da família das guanilinas. A STa, por exemplo, que é tida como superagonista da guanilato ciclase C (GC-C) provoca diminuição da atividade do trocador Na^+/H^+ (NHE₃) por uma via proteína quinase dependente de GMPc (PKG-II), resultando na inibição da absorção de Na^+ e estimulação da secreção de cloreto, bicarbonato e água (Vaandrager *et al.*, 2002).

Apesar de existirem evidências abundantes que suportam o papel da GC-C como principal sítio receptor mediando os efeitos da STa na secreção intestinal, existem, por outro lado, evidências fortes da existência de receptores alternativos baseados em estudos de ligação com receptores e análise de cinética da ligação da STa. Vários estudos têm demonstrado pelo menos dois sítios distintos de ligação para STa no intestino, um de alta outro de baixa afinidade (Crane *et al* 1992; Hakki *et al* 1993; Hugues *et al* 1991; Ivens *et al.*, 1990).

Alguns estudos por sua vez mostram que a própria GC-C pode se encontrar em estados de conformação diferente com baixa ou alta afinidade de ligação por STa

(Deshmane *et al.* 1995 e 1997), enquanto outros atribuem estes sítio adicionais a outros receptores para STa que não a GC-C. Por exemplo, Hakki *et al.* 1993 observaram uma proteína presente na membrana intestinal de ratos que liga STa e que não está associada a atividade enzimática tipo guanilil ciclase- GMPc (Sellers *et al.* 2005).

Posteriormente, Sellers *et al.* (2008) demonstraram que além da STa uroguanilina e guanilina como se ligam a um receptor funcional estimula no intestino que está ligado à secreção de bicarbonato e que não é o receptor GC-C.

As observações demonstrando que a uroguanilina e a guanilina podem estimular o transporte de íons no intestino de animais “knockout” para GC-C são consistentes com estudos da função renal que mostram que estes peptídeos podem estimular alteração no transporte de íons de maneira independente de GC-C (Carrinthers *et al.*, 2004; Sindic, *et al.* 2005).

Sellers *et al.*, (2008) também demonstraram que o estímulo da secreção de bicarbonato induzido por uroguanilina e guanilina é bloqueado por glibenclamida. Estes autores concluem que o efeito da uroguanilina e guanilina é dependente do canal de cloreto do tipo retificador para fora.

O efeito da uroguanilina no transporte de potássio observado em nossos experimentos também é compatível com achados anteriores (Fonteles *et al.*, 1998; Santos-Neto *et al.*, 1999; Sindic *et al.*, 2002; Amorim *et al.*, 2006). Amorim *et al.*, (2006), por exemplo, demonstraram em túbulos de ratos microperfundidos que o efeito da uroguanilina em aumentar a secreção de potássio é bloqueado por iberiotoxina e que portanto, parece ser dependente de canais de potássio, voltagem dependente, do tipo cálcio sensível chamado de maxi-K. A secreção de potássio foi analisada por estes autores nos túbulos distais onde em conjunto com os dutos coletores, acontece a regulação geral da secreção de K⁺. A condutância ao potássio é

aumentada por uroguanilina nas células do epitélio tubular distal, onde há uma alta densidade de canais de K⁺ na membrana apical e também uma probabilidade de abertura aumentada para estes canais.

A isatina bloqueia parcialmente o efeito da uroguanilina na pressão de perfusão e na secreção de sódio, sem ter efeito, no entanto na excreção de potássio. Segundo a teoria de Schlatter, a uroguanilina afeta o transporte de K⁺ em células epiteliais tubulares isolados pela ativação de um receptor acoplado à proteína G sensível à toxina Pertussis que segundo ele pode ser o NPR-C (Sindic *et al.*, 2002; Sindic *et al.*, 2005). Este receptor, NPR-C, foi inclusive recentemente associado ao peptídeo natriurético do tipo C enquanto putativo fator hiperpolarizante derivado do endotélio por sua relação com aumento da condutância ao potássio (Villar *et al.*, 2007). No entanto, a isatina não bloqueou os efeitos da uroguanilina na excreção de potássio demonstrando que provavelmente este efeito se deve à ativação de GC-C mesmo ou de outro receptor alternativo, que não um receptor para peptídeo natriurético.

Outro importante componente regulatório da pressão arterial via excreção renal de sódio, além do sistema das guanilinas, é o sistema calicreína-cinina renal.

O rim é reconhecido como um órgão importante no controle da pressão arterial (Guyton *et al.*, 1995). Uma vez que o rim possui os componentes de um sistema calicreína-cinina completamente funcional (Scicli e Carretero, 1986), os efeitos da bradicinina nos mecanismos de controle da pressão arterial renal são de considerável interesse. Por exemplo, alguns pacientes com hipertensão essencial têm níveis mais baixos de calicreína na urina do que controles normotensos (Scicli e Carretero, 1986; Margolius, 1995). Cepas de ratos com níveis plasmáticos baixos de cininogênio (Majima *et al.*, 1993), níveis de calicreína urinários baixos (Mededdu *et al.*, 1997) e camundongos mutantes “knockout” para receptor B2 sofrem de hipertensão sal sensível (Alfie *et al.*, 1997).

As cinininas são uma família de peptídeos que exercem seus efeitos através de dois subtipos de receptores B1 e B2. A bradicinina é um nonapeptídeo gerado pelo sistema de proteinases calicreína-cinina plasmático e é o agonista natural dos receptores B2. Carboxipeptidases do tipo M degradam a bradicinina formando o segundo membro da família das cininas, o des-Arg9-bradicinina, o qual é um agonista seletivo de receptor B1 (Bathon and Proud, *et al* 1991). A calidina, por sua vez, é um decapeptídeo produzido pelo sistema calicreína-cinina tecidual e é também um agonista natural de receptor B2 e pode ser convertida a bradicinina por aminopeptidases plasmáticas. O eficiente sistema de catabolismo renal das cininas filtradas (Casarini *et al.*, 1999) sugere que a ativação local do sistema calicreína-cinina é responsável pela geração intrarenal tanto de agonistas B1 e B2.

O sistema calicreína-cinina é um sistema parácrino/autócrino que participa da regulação da hemodinâmica renal e função tubular (Siragy *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000). Acredita-se que os efeitos das cininas, em condições fisiológicas, sejam primariamente mediados por receptores B2, os quais são constitutivamente expressos ao longo do néfron (Figueroa *et al.*, 1995). O receptor B1 é expresso em densidade muito baixa, mas pode ser induzido por estímulo inflamatório ou por inibição crônica da enzima conversora de angiotensina (Marin-Castano *et al.*, 1998; Marin-Castano *et al.*, 2002).

A bradicinina é um importante peptídeo vasodilatador que compõe o sistema calicreína, cinina renal. A bradicinina exerce os seus efeitos pela ligação ao receptor B2 ativando o complexo heterotrimérico da proteína G, fosfolipase C e óxido nítrico sintetase (e-NOS). O óxido nítrico liga ao grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel aumentando a produção de GMPc (Siragy *et al.*, 1997). Vários estudos mostram que o bloqueio da ação da bradicinina diminui a capacidade renal de excretar excesso de sódio (Katori *et al.*, 1998).

Um papel fisiológico da bradicinina na natriurese pressórica, com aumento de fluxo renal, aumento das cargas excretadas de sódio, cloreto e potássio tem sido proposto por muitos autores. Por exemplo, o bloqueio do receptor B2 da bradicinina seletivamente diminui o fluxo sanguíneo papilar renal e bloqueia a resposta natriurética a uma expansão de volume sem afetar o fluxo sanguíneo cortical ou a taxa de filtração glomerular (Fenoy *et al.*, 1992). Enquanto, a infusão local de bradicinina no interstício medular renal aumenta o fluxo sanguíneo papilar e tem efeito diurético e natriurético (Mattson e Cowley, 1993).

A vasodilatação medular renal produzida por cininas parece ser principalmente mediada por NO (Mattson e Cowley, *et al* 1993). A participação do NO no fenômeno da natriurese pressórica é provável uma vez que o bloqueio da síntese de NO impede a natriurese pressórica e melhora o desempenho do processo de autoregulação de fluxo sanguíneo (Fenoy *et al.*, 1995; Madrid *et al.*, 1997). Uma vez que a vasoconstrição autoregulatória pré-glomerular pode aumentar o estresse de cisalhamento de acordo com o incremento pressórico, tem sido postulado que o endotélio vascular funciona como um sensor e o NO como um efetor acoplando desta maneira elevações pré-glomerulares na pressão arterial com redução na reabsorção tubular de sódio e água (Fenoy *et al.*, 1995).

As cininas renais podem fazer parte deste mecanismo uma vez que estas podem ser liberadas pelo endotélio em resposta ao aumento do estresse de cisalhamento (Groves *et al.*, 1995) e também porque suas ações medulares se devem em parte à liberação de NO (Lahera *et al.*, 1991; Mattson and Cowley, 1993).

A infusão intra-arterial de bradicinina diretamente no rim de cães não anestesiados produz um aumento no fluxo sanguíneo total renal e uma queda na resistência vascular (Granger and Hall *et al.*, 1985). Em ratos a infusão de bradicinina diretamente no interstício medular (Mattson e Cowley, 1993) ou a administração

intravenosa de um inibidor da endopeptidase neutra, uma enzima que metaboliza cininas (Roman *et al.*, 1988), aumentam seletivamente o fluxo sanguíneo medular renal sem provocar mudanças no fluxo sanguíneo renal total ou na pressão arterial sistêmica.

Ademais, o aumento do fluxo sanguíneo medular e na excreção de sódio que normalmente acontecem após a expansão de volume são abolidos por antagonistas de receptor de bradicinina do tipo B2 (Fenoy e Roman, 1992).

Estes dados quando analisados coletivamente, sugerem que bradicinina pode causar vasodilatação renal regional ou generalizada e aumentar a excreção de sódio. Outros estudos sugerem que a administração intrarenal de bradicinina pode causar elevações na pressão arterial sistêmica. Por exemplo, a infusão intrarenal de bradicinina em ratos Wistar aumenta a resistência vascular renal e a pressão sanguínea arterial (Janssen *et al.*, 1989; Smits e Brody, 1989). Estes autores também demonstraram que as respostas por eles observadas eram mediadas por vias aferentes neurais renais, uma vez que eram abolidas após a desnervação renal.

Os receptores B2 da bradicinina, podem estar envolvidos uma vez que mediam a ativação das vias aferentes sensoriais no intestino e coração (Lew e Longhurst, 1986; Longhurst e Dittman, 1987; McDernott *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1994). Este fenômeno, por exemplo foi também demonstrado acontecer nos rins. Por exemplo, Hoagland *et al.* (1999) demonstraram que a bradicinina induz efeitos pressóricos neurogênicos e que estas respostas eram dependentes da ativação de receptores B2. Esta resposta pressórica com elevação do fluxo sanguíneo renal foi demonstrada a despeito de não haver nenhuma alteração significativa de resistência e dependia, portanto, do aumento da pressão de perfusão. Esta observação pode também sugerir que durante a infusão intrarenal de bradicinina a autoreregulação do fluxo sanguíneo renal está de alguma maneira bloqueada ou pode estar operando com um “set point” mais alto.

Em nossos experimentos a bradicinina aumenta a pressão de perfusão e não altera a resistência vascular renal de maneira que o sistema de auto regulação renal para a manutenção do fluxo parece também estar de alguma maneira inoperante durante perfusão com a bradicinina.

Desta maneira, um dos mecanismos responsáveis pelo efeito natriurético e diurético agudo da bradicinina, é a alteração hemodinâmica promovida com aumento de fluxo e, portanto com aumento de carga filtrada.

Reforçando este argumento, o trabalho de Willis *et al.* (1969), por exemplo, relataram que a prevenção do incremento de fluxo produzido por bradicinina era capaz de abolir os efeitos natriuréticos deste peptídeo.

Nossos achados hemodinâmicos são semelhantes aos de Hoagland *et al.* (1999) que demonstraram um efeito natriurético e diurético associado com um efeito pressórico e aumento de fluxo sanguíneo renal sem contudo haver alteração na resistência vascular renal.

Vários estudos, no entanto, usando ratos Wistar demonstraram um aumento na resistência vascular renal durante a injeção em bolus de bradicinina na artéria renal (Janssen *et al.*, 1989; Smits e Brody, 1984; Braun *et al.*, 1997). Portanto, existe uma variação na resposta hemodinâmica renal à bradicinina de acordo com o modelo utilizado.

Yun e colaboradores (1982) também encontraram após infusão intrarenal de bradicinina um efeito presórico, com aumento no fluxo urinário, aumento da excreção de sódio e potássio e sem mudança na taxa de filtração glomerular. Este efeito observado por estes autores não foi bloqueado pelo pré-tratamento com indometacina ou propranolol sugerindo que são independentes de prostanoïdes ou de ação β -adrenérgica.

O rim possui mecanoceptores e quimoceptores sensoriais aferentes. Os quimoceptores respondem a bradicinina com aumento da atividade simpática (Smits e Brody, 1984; Hoagland *et al.*, 1999). No entanto, esta teoria mecanística se aplica ao animal intacto e não pode explicar nossos achados uma vez que este mecanismo neurogênico depende de vias neuronais aferentes e eferentes intactas.

Ademais, a demonstração de que a resistência vascular renal não é alterada por bradicinina após a desnervação renal sugere que a bradicinina tem um efeito vasodilatador limitado no rim.

Estas observações se contrapõem com a visão geralmente aceita que bradicinina é um potente vasodilatador endotélio-dependente. Uma explicação potencial para esta aparente contradição é que os efeitos vasodilatadores da bradicinina são regionalmente seletivos dentro do tecido renal.

Consistente com esta explicação está à demonstração de que a infusão de bradicinina no interstício renal reduz a resistência vascular medular, mas não afeta o fluxo sanguíneo na região cortical (Mattson e Cowley *et al.*, 1993). Portanto, a administração intrarenal de bradicinina pode afetar seletivamente a vasculatura medular e uma vez que esta contribui muito pouco para o fluxo sanguíneo renal total, o efeito vasodilatador de bradicinina não se configura numa mudança significativa no fluxo sanguíneo renal.

Adicionalmente, Yu e colaboradores (1998) sugeriram que os efeitos vasculares renais da bradicinina dependem de um tônus adrenérgico aumentado. Corroborando com esta proposição Pöppermayer e colaboradores (2002) demonstraram um efeito vasodilatador da bradicinina no modelo de rim de rato isolado, não filtrante com pressão de perfusão aumentada artificialmente por infusão contínua com fenilefrina.

Granger e Hall (1985) relataram também um aumento do fluxo renal, neste caso associado a uma diminuição de resistência vascular renal. No entanto, estes autores utilizaram em seus experimentos um sistema servo-controlador da pressão de perfusão que mantinha a pressão arterial renal controlada artificialmente em um valor fixo.

Uma alternativa, para explicar este efeito pressórico da bradicinina, é que este peptídeo possa através da ativação de receptor B2 induzir a liberação de mediadores como a substância P e prostaglandinas que podem contribuir para o aumento da pressão de perfusão como descrito por Di Bonna e Kopp, 1997 e Kopp *et al.*, 1997. Corroborando com esta proposição, Yu *et al.*, (1998) utilizando a arteriola aferente de coelhos microperfundida, demonstraram que a bradicinina tem um efeito bifásico, induzindo vasodilatação em baixas concentrações (nanomolares) e vasoconstrição em concentrações maiores. Este último efeito era mediado por receptores B2 e dependia da liberação de prostanóides vasoconstritores.

Outro alvo que pode ser importante para o efeito final da bradicinina é o glomérulo renal. O glomérulo, e mais precisamente, o mesângio glomerular tem um papel central na fisiologia e patofisiologia da ultrafiltração renal. O tipo celular predominante no mesângio é a célula mesangial, a qual é muito similar a uma celular muscular lisa (Latta, 1973; Kreisberg *et al.*, 1985). Estudos de morfologia ultraestrutural mostraram que estas células têm abundância de feixes de filamentos contráteis (Anchews e Coeffey, 1983). Ademais, experimentos com células mesangiais em cultura mostraram que estas respondem a muitas substâncias vasoativas. Por exemplo, arginina-vasopressina e angiotensina II provocam contração destas células, enquanto dopamina e prostaglandina E2 induzem relaxamento (Mene *et al.*, 1990).

A bradicinina ativa receptores B2 nas células mensangiais e no glomérulo isolado levando a ativação de PKC e também formação de inositol 1,4,5-trifosfato com aumento de cálcio livre no citosol (Emond *et al.*, 1990; Bascand *et al.*, 1990).

Este efeito leva a uma contração de células mesangiais levando a uma diminuição de área de superfície filtrante, explicando o aumento da pressão de perfusão renal. Este aumento na pressão não se reflete em aumento da resistência global renal porque a bradicinina também tem efeitos tubulares que levam a um incremento da diurese e provavelmente pelos conhecidos efeitos vasodilatadores da bradicinina. Este efeito vasodilatador, portanto, é mascarado pelo efeito glomerular que diminui a área total de superfície filtrante dos capilares glomerulares sem alterar a condutividade hidráulica dos mesmos.

A relação entre aumento da pressão de perfusão renal e aumento da carga excretada de sódio pode explicar parte do efeito natriurético observado em nossos experimentos. Apesar do fluxo sanguíneo cortical e a filtração glomerular variarem muito pouco dentro de uma faixa grande de variação de pressão de perfusão (fenômeno denominado de autoregulação de fluxo), o fluxo sanguíneo papilar renal não é autorregulado, e tem sido hipotetizado que com o aumento da pressão de perfusão, o fluxo sanguíneo medular, a pressão capilar dos *vasa recta* e a pressão intersticial aumentam, levando a uma queda na reabsorção de sódio tubular (Tornel *et al.*, 2000).

Outro componente importante para explicar os efeitos da bradicinina é seu efeito sobre a produção de AMPc. A diminuição de AMPc induzida por bradicinina tem sido demonstrada nos glomérulos e em células do ducto coletor e células MDCK. A inibição da formação de AMPc pode diminuir a ação moduladora negativa deste sistema sobre o sistema nitrérgico (NO-GCs-GMPc) nos túbulos renais que em conjunto com a estimulação direta deste sistema (i.e.,nitrérgico) pela bradicinina

explica seus efeitos tubulares similares à uroguanilina, sendo no entanto, por falta de contraposição do sistema AMPc, mais duradouros que os deste último. Este mecanismo explica também porque estes efeitos são contrapostos por oxalodiazoloquinoxalina (ODQ), mas apenas parcialmente por isatina.

Outro argumento a favor da hipótese hemodinâmica se baseia no fato de que o ODQ bloqueia a resposta pressórica induzida pela bradicinina e também seus efeitos no transporte de íons com exceção de seus efeitos caliuréticos nos tempos de 90 e 120 minutos. Desta maneira, o efeito hemodinâmico explica em parte os efeitos renais deste peptídeo que não são dependentes do sistema NO-GMPc.

De maneira similar, a isatina bloqueia parcialmente o efeito pressórico da bradicinina e bloqueia completamente seus efeitos natriuréticos e cloruréticos, mas não seus efeitos caliuréticos nos tempos de 90 e 120 minutos.

A pergunta que fica é: como estes inibidores se contrapõem aos efeitos pressóricos da bradicinina? A diminuição da síntese de NO por isatina (Glover *et al.*, 1998) e a inibição de seu efetor, a enzima guanilato ciclase solúvel, por ODQ pode aumentar a atividade da sódio-potássio ATPase como discutido anteriormente e assim se contrapor aos efeitos pressóricos da bradicinina. Efeitos pressóricos estes que estão relacionados finalmente ao incremento de cálcio nas células musculares lisas vasculares e mensangiais. A bradicinina ativa receptores B2 nas células mesangiais e no glomérulo isolado levando a ativação de PKC e também formação de inositol 1,4,5-trifosfato com aumento de cálcio livre no citosol (Emond *et al.*, 1990; Bascand *et al.*, 1990). O incremento de atividade da bomba sódio-potássio ATPase induzido pela redução da síntese ou da atividade do NO (induzido por isatina e ODQ, respectivamente) pode se contrapor a este efeitos por aumentar a extrusão de cálcio via trocador sódio-cálcio (NCX). Este seria então, uma espécie de antagonismo fisiológico ao incremento de cálcio intracelular.

Por outro lado, o efeito tubular de aumento de excreção de potássio induzido pela bradicinina independe da via NO-GC-GMPc uma vez que é resistente a ODQ e a isatina. Uma alternativa para explicar este efeito caliurético da bradicinina, respaldada por observações de outros pesquisadores, é seu efeito ativador da isoforma da enzima sódio-potássio ATPase insensível ao bloqueio por ouabaína, mas sensível à furosemida. Este efeito foi descrito por Caruso-Neves e colaboradores (1999) para o túbulo proximal e por Buffin-Meyer *et al.* (2004) para o ducto coletor. Caruso-Neves e colaboradores demonstraram que este efeito é dependente, pelo menos no túbulo proximal, da ativação da fosfolipase C. Assim, a ativação desta enzima na membrana basolateral nos túbulos distais contribui para aumento da excreção de potássio.

Os efeitos da bradicinina no transporte de cloreto, além de dependerem de seus efeitos no fluxo renal, podem se dever também a um efeito na condutância ao cloreto nas células tubulares. Por exemplo, Kose e colaboradores (2000), demonstraram que bradicinina induz ativação de corrente de cloreto no ducto coletor e Tiwari *et al.* (2007) demonstraram este efeito no túbulo proximal. O efeito clorurético observado para bradicinina em nossos experimentos já foram demonstrados por outros pesquisadores (Grider *et al.*, 1995) como sendo dependentes de ativação de receptores B2. No entanto, a cascata de sinalização para estes eventos ainda carece de esclarecimentos. Em nossos experimentos o efeito clorurético deste peptídeo foi inibido por isatina, mostrando a participação da via NO-GMPc neste fenômeno, provavelmente através da ativação dos canais de cloreto retificadores na membrana basolateral.

7. CONCLUSÕES

1. O rim isolado e perfundido de rato mostrou-se uma preparação *ex-vivo* funcionalmente estável durante 120 min e apropriado para os diversos estudos hormonais aqui empreendidos;
2. Isatina em doses elevadas ($10\mu\text{M}$) apresentou significativa ação intrínseca na preparação experimental, produzindo elevação da pressão de perfusão, diurese, natriurese, caliurese e clorurese. Esta substância na dose de $3\mu\text{M}$ promove incremento da pressão de perfusão e da diurese sem significativos efeitos no transporte de eletrólitos. Estes resultados ainda não haviam sido descritos na literatura;
3. ODQ na dose de $37\ \mu\text{M}$ é dotada de ação intrínseca e promove transiente aumento da pressão de perfusão e da diurese com significativa caliurese;
4. Os resultados da presente pesquisa convalidam a participação das enzimas guanilato ciclase de membrana e solúvel em um papel basal na regulação do tônus vascular e no transporte tubular de eletrólitos;
5. O bloqueio da guanilato ciclase de membrana induz diurese e natriurese provavelmente de natureza pressórica;
6. Uroguanilina produz diurese, natriurese, clorurese e caliurese de maneira dose-dependente na preparação experimental estudada;
7. Bradicinina, em doses maiores, apresentou inesperado efeito hipertensivo com natriurese, clorurese e caliurese, mas sem aumento da diurese na preparação experimental estudada;

8. Urodilatina (0,03nM) produziu efeito natriurético, caliuréticos e hipotensor no rim isolado e perfundido de rato; e ainda antagonizou os efeitos da uroguanilina sobre a pressão de perfusão, mas produziu sinergismo de ação na promoção de natriurese, caliurese e clorurese;
9. Bradicinina antagonizou a diurese e a caliurese promovidas por uroguanilina;
10. Nesta mesma preparação experimental, ODQ adicionado à bradicinina compensam seus efeitos vasculares, natriuréticos, cloruréticos e caliuréticos enquanto isatina adicionada à bradicinina compensam seus efeitos vasculares, natriuréticos e cloruréticos, mas não os caliuréticos;
11. Foi também demonstrado que bradicinina atua no túbulo proximal de modo independente do sistema Guanilato ciclase solúvel-GMPc e dependentemente deste sistema no túbulo distal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGUIAR R. Ciência Hoje, Rio de Janeiro, agosto de 2001.
<http://www2.uol.com.br/cienciahoje/perfis/rocha/rocha1.htm>, 2008;
- 2 ALFIE, M., SIGMON, D., POMPOSIELLO, S., AND CARRETERO, O. Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin B2 receptors. *Hypertension*. 29: 483–487, 1997.
- 3 AMORIM J. B., MUSA-AZIZ R., LESSA L. M., MALNIC G., FONTELES M. C. Effect of uroguanylin on potassium and bicarbonate transport in rat renal tubules. *Can J Physiol Pharmacol*. 84(10): 1003-10, 2006;
- 4 ANAND-SRIVASTAVA M.B. Atrial natriuretic peptide-C receptor and membrane signalling in hypertension. *J Hypertens*. 15: 815–826, 1997.
- 5 ANAND-SRIVASTAVA M.B., TRACHTE G.J. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 45: 455-97, 1993.
- 6 ANCHEWS P. M., A. K. COEFFEY. Cytoplasmic contractile elements in glomerulus cells. *Fed Proc*. 42: 3046-3052, 1983.
- 7 ANTUNES-RODRIGUES J., DE CASTRO M., ELIAS L.L.K., VALENÇA M.M., McCANN, S.M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev*. 84: 169–208, 2004.
- 8 APERIA A., HOLTBACK U., SYREN M.L., SVENSSON L.B., FRYCKSTEDT J., GREENGARD P. Activation/deactivation of renal Na^+,K^+ -ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J*. 8: 436–9, 1994.

- 9 BASCANDS J. L., C. EMOND, C. PECHER, D. REGOLI, J. P. GIROLAMI. Bradykinin stimulates production of inositol (1,4,5) trisphosphate in cultured rat mesangial cells via B2-kinin receptor. *Br J Pharmacol.* 102: 962-966, 1991.
- 10 BATHON J.M., PROUD, D. Bradykinin antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 31: 129–162, 1991.
- 11 BELTOWSKI J, MARCINIAK A, WOJCICKA G, GORNY D. Nitric oxide decreases renal medullary Na^+,K^+ -ATPase activity through cyclic GMP-protein kinase G dependent mechanism. *J Physiol Pharmacol.* 54: 191–210, 2003.
- 12 BELTOWSKI J. Guanylin and related peptides. *J Physiol Pharmacol.* 52: 351-75, 2001.
- 13 BHOOLA K. D., FIGUEROA C. D., WORTHY K.; Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases.; *Pharmacol Rev.* 44(1):1-80, 1992.
- 14 BIEK D.P., COHEN S.N.: Identification and characterization of recD, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 167: 594-603, 1986.
- 15 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. *Essentials of human physiology - a multimedia resource.* Medical College of Georgia, 1996.
- 16 BOWMAN R.H. AND MAACK T.E. Effect of albumin concentration and ADH on H_2O and electrolyte transport in perfused rat kidney. *Am J Physiol.* 226: 426-430, 1974.
- 17 BOWMAN R.H. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J Biol Chem.* 2455: 1604-1612, 1970;

- 18 BRAUN, C., ADE, M., UNGER, T., VAN DER WOUDE, F., ROHMEISS, P. Effects of bradykinin and icatibant on renal hemodynamics in conscious spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 30: 446–454, 1997.
- 19 BRENNER B.M., RECTOR P. *Nephrology*. 7th Edition. In MdConsult, 2004.
- 20 BROWN B.L., WALKER S.W. AND TOMLINSON S. Calcium calmodulin and hormone secretion. *Clin Endocrinol.* 23: 201-18, 1985.
- 21 BUFFIN-MEYER B., YOUNES-IBRAIMM, EL MERNISSI G., cheval L., MARSY S., GRIMA M., GIROLAMI J. P., DOUCET A. Differential regulation of collecting duct Na^+ , K^+ -ATPase and K^+ excretion by furosemide and piretanide: role of bradykinin. *J Am Soc Nephrol.* 15(4): 876-84, 2004;
- 22 BUSA W.B. Roles for the phosphatidylinositol cycle in early development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 320: 415-26, 1988.
- 23 CALDERONE A., THAIK C., TAKAHASHI N., CHANG D.L.F., COLUCCI W.S. Nitric oxide, atrial peptide, and cyclic GMP inhibit the growth promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest.* 101: 812-18, 1998.
- 24 CAREY R.M. Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man: lack of dependence upon aldosterone. *Circulation Res.* 43: 19-23, 1978.
- 25 CAREY, R.M.; SMITH, J.R.; ORTT, E.M. Gastrointestinal control of sodium excretion in sodium-depleted rabbits.. *Am J Physiol.* 230: 1504, 1976.
- 26 CARNEIRO, H. Comida e sociedade. Uma história da alimentação, Rio de Janeiro, Campus, 2003, pp.179-185, in Nuevo Mundo Mundos Nuevos, www.ehess.fr/cerma/Revue/, 2005.

- 27 CARPICK B.W. AND GARIEPY J. The *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is a long-lived superagonist of guanylin. *Infect Immun.* 61: 4710-4715, 1993.
- 28 CARRITHERS S.L., OTT C.E., HILL M.J., JOHNSON B.R., CAI W., CHANG J.J., SHAH R.G., SUN C., MANN E.A., FONTELES M.C., FORTE L.R., JACKSON B.A., GIANNELLA R.A., GREENBERG R.N. Guanylin and uroguanylin induce natriuretics in mice lacking guanylyl cyclase-C. *Kidney Int.* 65: 40-53, 2004.
- 29 CARRITHERS S.L., TAYLOR B., CAI W.Y., JOHNSON B.R., OTT C.E., GREENBERG R.N., JACKSON B.A. Guanylyl cyclase-C receptor mRNA distributions along the rat nephron. *Regulatory peptides.* 95: 65-74, 2000.
- 30 CASARINI D.E., BOIM M.A., STELLA R.C.R., SCHOR N. Endopeptidases (kininases) are able to hydrolyze kinins in tubular fluid along the rat nephron. *Am J Physiol.* 276: F66-F74, 1999.
- 31 CASSOLA A.C., GIEBISCH G., WANG W. Vasopressin increases density of apical low-conductance K⁺ channels in rat CCD. *Am J Physiol.* 264: F502-9, 1993.
- 32 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 U S A.* 91: 2935-2939, 1994.
- 33 CHAO A.C., DE SAUVAGE F.J., DONG Y.J., WAGNER J.A., GOEDDEL D.V., GARDNER P. Activation of intestinal CFTR Cl- channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 13: 1065-72, 1994.

- 34 COWLEY A.W., MORI T., MATTSON D., ZOU A.P. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284: R1355–69, 2003.
- 35 CRANE M., HUGUES M., O'HANLEY P., WALDMAN, S. Identification of two affinity states of low-affinity receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: correlation of occupation of lower-affinity state with guanylate cyclase activation. *Mol Pharmacol.* 41: 1073–1080, 1992.
- 36 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.
- 37 DA SILVA, J. F. M.; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C. J. The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999. *Braz Chem Soc.* 12: 273-324, 2001.
- 38 DE BOLD A.J. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can J Physiol Pharmacol.* 60: 324-30, 1982.
- 39 DE BOLD AJ, BORESTEIN HB, VERESS AT, SONNENBERG H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28: 89-94, 1981.
- 40 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: 121-7, 1997.
- 41 DE GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW, UNGER T. *et al* International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev.* 52: 415–72; 2000.

- 42 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.
- 43 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 U S A.* 89(19): 9089-93, 1992.
- 44 DE WARDENER H.E., MILLS I.H., CLAPHAM W.F., HAYTER C.J. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. *Clin Sci.* 21: 249-58, 1961.
- 45 DESHMANE S. P., CARRITHERS S. L., PARKINSON S. J., CRUPPER S. S., ROBERTSON D. C., WALDMAN, S. A. Rat guanylyl cyclase C expressed in COS-7 cells exhibits multiple affinities for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Biochemistry.* 34: 9095–9102, 1995.
- 46 DESHMANE S. P., PARKINSON S. J., CRUPPER S. S., ROBERTSON D. C., SCHULZ S., WALDMAN S. A. Cytoplasmic domains mediate the ligand-induced affinity shift of guanylyl cyclase C. *Biochemistry.* 36: 12921–12929, 1997.
- 47 DIBONA, G., KOPP, U. Neural control of renal function. *Physiol Rev.* 77: 75-180, 1997.
- 48 DOUSA T.P. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 55: 29-62, 1999.
- 49 DREWETT J.G., GARBERS D. L. The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocrine Ver.* 15: 135-162, 1994.

- 50 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. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1: 1109-1113, 1991.
- 51 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.
- 52 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*. 8: 347-54, 1997.
- 53 DZAU V.J., BERNSTEIN K., CELERMAJER D. Working Group on Tissue Angiotensin Converting Enzyme, International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. Pathophysiologic and Therapeutic Importance of Tissue ACE: A Consensus Report. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 16: pp.149-60, 2002.
- 54 ELITSUR N., LORENZ J.N., HAWKINS J.A., RUDOLPH J.A., WITTE D., YANG L.E., McDONOUGH A.A., COHEN M.B. The proximal convoluted tubule is a target for the uroguanylin-regulated natriuretic response. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 43: S74-81, 2006.
- 55 ELLIOTT D.C. Data for Biochemical Research, 3rd Ed. Dawson Editores, R.M.C., (Clarendon Press) pp. 328-329, 1987.
- 56 EMOND C., J. L. BASCANDS, C. PECHER, G. CABOS-BOUTOT, P. PRADELLES, D. REGOLI, J. P. GIROLAMI. Characterization of a B2-kinin receptor in rat renal mesangial cells. *Eur J Pharmacol*. 190: 381-392, 1990.

- 57 ERDMANN, O.L. "Untersuchungen über den Indigo". *Journal für Praktische Chemie* 19(1): 321-362, 2004.
- 58 ERDOS E.G., DEDDISH P.A., MARCIC B.M. Potentiation of Bradykinin Actions by ACE Inhibitors. *Trends Endocrinol Metab.* 10: 223-9, 1999.
- 59 ETCHEVERRY, G.J. De agua y sal somos: Premios Nobel de Fisiología: Medicina y de Química 2003. *Medicina (B. Aires)*, vol.64, no.2, p.170-174, 2004.
- 60 FAN X., WANG Y., LONDON R.M., EBER S.L., KRAUSE W.J., FREEMAN R.H., FORTE L.R. Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology*. 138: 4636-4648, 1997.
- 61 FAN X.H., HAMRA F.K., EBER S.L., SMITH C.E., CURRIE M.G., FREEMAN R.H., FORTE L.R. Purification and properties of uroguanylin from rat urine. *FASEB J.* 9: A6, 1995.
- 62 FAN, X., HAMRA F.K., FREEMAN R.H., EBER S.L., KRAUSE W.J., LIM R.W., PACE V.M., CURRIE M.G., FORTE L.R. Uroguanylin. Cloning of preuroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and prouroguanylin from plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 219: 457-462, 1996.
- 63 FASANO A. Cellular Microbiology. How Enteric Pathogens Socialize with Their Intestinal Host. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 26: 520-532, 1998.
- 64 FAWCUS K., GORTON V.J., LUCAS M.L., MCEWAN G.T. Stimulation of three distinct guanylate cyclases induces mucosal surface alkalinisation in rat small intestine in vitro. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 118: 291-5, 1997.

- 65 FEELISCH, M., KOTSONIS, P. SIEBE, J. Clement, B., Schmidt, H. H. The soluble guanylyl cyclase inhibitor ODQ is a nonselective heme protein inhibitor of NOS and other cytochrome P - 450 enzymes involved in NO donor activation. *Mol Pharmacol.* 56: 243, 1999.
- 66 FEINSTEIN G., MALEMUD C.J. AND JANOFF A. The inhibition of human leucocyte elastase and chymotrypsin-likeprotease by elastatinal and chymostatin. *Biochim Biophys Acta.* 429(3): 925-32, 1976.
- 67 FENOY F.J., FERRER P., CARBONELL L.F., SALOM M.G. Role of nitric oxide on papillary blood flow and pressure natriuresis. *Hypertension.* 25: 408–414, 1995.
- 68 FENOY, F.J., ROMAN, R.J. Effects of kinin receptor antagonists on renal hemodynamic and natriuretic responses to volume expansion. *Am J Physiol.* 263: R1136–R1140, 1992.
- 69 FÉRAILLE E., DOUCET A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev.* 81: 345-418, 2001.
- 70 FERREIRA S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of Bothrops jararaca. *Br J Pharmacol.* 24: 163-9, 1965.
- 71 FIELD M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest.* 111: 931-43, 2003.
- 72 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.

- 73 FIGUEROA C.D., GONZALEZ C.B., GRIGORIEV S., ALLA S.A., HASSEMAN M., JARNAGIN K., MULLER-ESTERL W. Probing for the bradykinin B2 receptor in rat kidney by anti-peptide and anti-ligand antibodies. *J Histochem Cytochem.* 43: 137-148, 1995.
- 74 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.* 117: 859-65, 1983.
- 75 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.
- 76 FONTELES M.C., GREENBERG R.N., MONTEIRO H.S.A., CURRIE M.G., FORTE L.R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol.* 275: F191-F197, 1998.
- 77 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. *Braz. Federation for Experimental Biol.* 134: abstract, 1989.
- 78 FONTELES M.C., LIMA A.A.M. Functional Comparison of kidney perfused with fatty acid-free and rich albumin. *Braz Med Biol Res.* 15(4-5): 296, 1982.
- 79 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. *Brazilian J Med Biol Res.* 29: 75-79, 1996.

- 80 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.
- 81 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.
- 82 FONTELES, M. C., A. A. M. LIMA, G. FANG, R. L. GUERRANT. Effects of STa, LT and cholera toxin on renal electrolyte transport: Possible roles of an endogenous ST like compound from the isolated perfused kidney. Extended Abstract. XXVII US-Japan Cholera Meeting in Charlottesville, 1991.
- 83 FORTE L. R., CURRIE M. G. Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *The FASEB Journal.* 9: 643. 650, 1995.
- 84 FORTE L.R., EBER S.L., TURNER J.T., FREEMAN R.H., FOK K.F., CURRIE M.G. Guanylin stimulation of Cl⁻ secretion in human intestinal T84 cells via cyclic guanosine monophosphate. *J Clin Invest.* 91: 2423-2428, 1993.
- 85 FORTE L.R., HAMRA R.H. Guanylin and Uroguanylin: Intestinal peptides hormones that regulate epithelial transport. *News Physiol Sci.* 11: 17-24, 1996.
- 86 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.

- 87 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.
- 88 FURUYA S., NARUSE S., ANDO E., NOKIHARA K. AND HAYAKAWA T. Effect and distribution of intravenously injected ^{125}I -guanylin in rat kidney examined with high-resolution light microscopic radioautography. *Anat Embryol.* 193(3): 185-93, 1997.
- 89 GAGELMANN M., HOCK D., FORSSMANN W.G. Urodilatin (CDD/APN-95-1 26) is not biologically inactivated by a peptidase from dog kidney cortex membranes in contrast to atrial natriuretic peptide-cardiodilatin (α -hANP/CDD-99-126). *FEBS Lett.* 233: 239-254, 1988.
- 90 GARBERS D.L. Guanylate cyclase receptor family. *Recent Prog Horm Res.* 46: 85-96, 1990.
- 91 GARBERS D.L. The guanylyl cyclase receptor family. *New Biol.* 2(6): 499-504, 1990.
- 92 GARCIA K.C., DE SAUVAGE F.J., STRUBLE M., HENZEL W., REILLY D., GOEDDEL D.V. Processing and characterization of human proguanylin expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 268(30): 22397-401, 1993.
- 93 GARTHWAITE, J., E. SOUTHAM, C.L. BOULTON, E.B. NIELSON, K. SCHMIDT, B. MAYER. Potent and Selective Inhibition of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase by 1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 48: 184-188, 1995.
- 94 GILMAN A.G. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep.* 15: 65-97, 1995.

- 95 GILMAN A.G. Nobel Lecture. G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 56: 615-649, 1987.
- 96 GILMAN A.G. The Albert Lasker Medical Awards. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *JAMA.* 262: 1819-25, 1989.
- 97 GIL-TURNERS, M. S.; HAY, M. E. FENICAL, W. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science.* 246: 116-118, 1989.
- 98 GLOBITS S., FRANK H., PACHER B., HUELSMANN M., 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.
- 99 GLOVER, V., BHATTACHARYA, S.K., CHARKRABARTI, A., SANDLER, M. The psychopharmacology of isatin: a brief review. *Stress Med.* 14: 225–229, 1998.
- 100 GLOVER, V., MEDVEDEV, A., SANDLER, M., 1995. Isatin is a potent endogenous antagonist of guanylate cyclase coupled atrial natriuretic peptide receptors. *Life Sci.* 57, 2073–2079.
- 101 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;
- 102 GOMEZ R.A., CHEVALIER R.L., CAREY R.M., PEACH M.J. Molecular biology of the renal renin-angiotensin system. *Kidney Int Suppl.* 30: S18-23, 1990.
- 103 GRANGER, J.P., HALL, J.E. Acute and chronic actions of bradykinin on renal functions and arterial pressure. *Am J Physiol.* 248: F87–F92, 1985.

- 104 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.
- 105 GRIDER J., FALCONE J., KILPATRICK E., OTT C., JACKSON B. Effect of bradykinin on NaCl transport in the medullary thick ascending limb of the rat. *Eur J Pharmacol.* 287(1): 101-4, 1995.
- 106 GROVES P., KURZ S., JUST H., DREXLER H. Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation.* 92: 3424 – 3430, 1995.
- 107 GUBA, M., KUHN M., FORSSMANN W. G., CLASSEN M., GREGOR M. AND SEIDLER U. Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃-secretion: Proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology.* 111: 1558-1568, 1996.
- 108 GUO, Y.Z., CHEN, F.K. *Zhongcaoyao (Chinese Traditional and Herbal Drugs).* 17(2): 8, 1986.
- 109 GUYTON A.C. Renal function curves and control of body fluids and arterial pressure. *Acta Physiol Scand Suppl.* 591:107-13, 1990;
- 110 GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, W. B. Saunders Company, chapter 1: Funcional Organization of the Human Body and Control of the "Internal Environment", pp 03-09, 1996.
- 111 GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, W. B. Saunders Company, chapter 65: Digestion and Absorption in the Gastrointestinal Tract, pp 833-843, 1996.

- 112 GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th 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.
- 113 GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, W. B. Saunders Company, chapter 27: Urine Formation by the Kidneys: II Tubular Processing of the Glomerular Filtrate, pp 331 - 347, 1996.
- 114 GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, W. B. Saunders Company, Chapter 9: Heart Muscle, The Heart as a Pump, pp 107 - 120; 1996.
- 115 GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, W. B. Saunders Company, Chapter 8: Contraction and Excitation of Smooth Muscle, pp 95 - 106, 1996.
- 116 GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th edition, W. B. Saunders Company, chapter 4: Transport of Ions and Molecules Through the cell Membrane, pp 43-54, 1996.
- 117 GUYTON, A., HALL, J., COLEMAN, T., MANNING, R., JR., NORMAN, R., JR. The dominant role of the kidneys in long-term arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. In *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. Edited by J. Laragh and B. Brenner. Raven Press, New York. pp. 1311–1326, 1995.
- 118 HAKKI S., ROBERTSON D., WALDMAN, S. A 56 kDa binding protein for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin isolated from the cytoskeleton of rat intestinal membranes does not possess guanylate cyclase activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1152: 1–8, 1993.

- 119 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: 257-265, 1996a.
- 120 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.
- 121 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, 1996b.
- 122 HARDMAN J.G., LIMBIRD L., MOLINOFF P.B., RUDDON R.W., GILMAN A.G. *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis Therapeutics*, 9th Edition, Publisher: McGraw-Hill CD-ROM: 0-07-864186-1, 1996
- 123 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.
- 124 HECKER M., PORSTI I., BUSSE R. Mechanisms involved in the angiotensin II-independent hypotensive action of ACE-inhibitors. *Braz J Med Biol Res.* 27: 1917-21, 1994.

- 125 HESS R., KUHN M., SCHULZ-KNAPPE P., RAIDA M., FUCHS M., KLODT J., ADERMANN K., KAEVER V., CETIN Y., FORSSMANN W.G. GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* 374: 34-38, 1995.
- 126 HILL O., CETIN Y., CIESLAK A., MAGERT H.J., FORSSMANN W.G. A new human guanylate cyclase-activating peptide (uroguanylin): precursor cDNA and colonic expression. *Biochim Biophys Acta.* 1253: 146-149, 1995.
- 127 HIRAYAMA T., WADA A., HIDAKA Y., FUJISAWA J., TAKEDA Y., 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.
- 128 HOAGLAND, K.M., MADDOX, D.A., MARTIN, D.S. Intrarenal infusion of bradykinin elicits a pressor response in conscious rats via a B₂-receptor mechanism. *Can J Physiol Pharmacol.* 77: 563–570, 1999.
- 129 HOPE R.A., LONGMORE J.M., MOSS P.A.H. AND WARRENS A.N. *Oxford Manual de Clínica Médica*, 2^a edição, Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda, Capítulo 6: Doenças Infecciosas, pp 170. 253, 1994.
- 130 HORNIG B., KOHLER C., DREXLER H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation.* 95: 1115–1118, 1997.
- 131 HUGHES JM, ROUSE JD, BARADA FA, GUERRANT RL. Etiology of summer diarrhea among the Navajo. *Am J Trop Med Hyg.* 29: 613-9, 1980.

- 132 HUGUES M., CRANE M., HAKKI S., O'HANLEY P., WALDMAN, S. Identification and characterization of a new family of high-affinity receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in rat intestinal membranes. *Biochemistry*. 30: 10738–10745, 1991.
- 133 IVENS K., GAZZANO H., O'HANLEY P., WALDMAN, S. Heterogeneity of intestinal receptors for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin. *Infect Immun.* 58: 1817–1820, 1990.
- 134 JANSSEN, B.J., VAN ESSEN, H., BOUDIER, H.A.S., SMITS, J.F. Hemodynamic effects of activation of renal and mesenteric sensory nerves in rats. *Am J Physiol.* 257: R29–R36, 1989.
- 135 JARRAHPOUR A. A., KHALILI D. Synthesis of 3,3'-[methylenebis(3,1-phenylenenitrilo)]bis[1,3-dihydro]-2H-indol-2-one as a novel bis-Schiff base. *Molbank*, M437, <http://www.mdpi.net/molbank/>, 2005;
- 136 JOHNSON M.D. Relative natriuretic activities of synthetic atriopeptins I, II and III. *Life Sci.* 38: 225-31, 1986.
- 137 KANG D.G., KIM J.W., LEE J. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the Na^+,K^+ -ATPase activity in the kidney. *Pharmacol Res*; 41: 121–5, 2000.
- 138 KATORI M., MAJIMA M. The renal kallikrein-kinin system: its role as a safety valve for excess sodium intake, and its attenuation as a possible etiologic factor in salt-sensitive hypertension. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40(1): 43-115, 2003.
- 139 KATORI M., MAJIMA M. The renal kallikrein-kinin system: its role as a safety valve for excess sodium intake, and its attenuation as a possible etiologic factor in salt-sensitive hypertension. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40: 43-115, 2003.

- 140 KATZUNG B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*, 5^a edição, Editora Guanabara Koogan S.A., capítulo 2: Receptores Farmacológicos e Farmacodinâmica, pp 8 a 26, 1994.
- 141 KATZUNG B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*, 5^a edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Capítulo 19: Broncodilatadores e Outros Agentes Utilizados na Asma, pp 209 a 220, 1994.
- 142 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.
- 143 KENTSCH M., LUDWIG D., DRUMMER C., GERZER R., MULLERESCH G. Haemodynamic and renal effects of urodilatin bolus injection in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Invest.* 22: 662-69, 1992.
- 144 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.* 4: S529-31, 1986.
- 145 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: 1028-1034, 1997.
- 146 KIRCHOFF K., BUB A., MARXEN P. AND FROSSMAN W.G. Urodilatin inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused rat kidney. *Exp Nephrol.* 6: 231-237, 1994.

- 147 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. *Amer J Physiol.* 266: F342-F348, 1994.
- 148 KNOOP F.C., OWENS M. Pharmacologic action of Escherichia coli heat-stable (Sta) enterotoxin. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 28: 67-72, 1992a.
- 149 KOESLING D., BOHME E., SCHULTZ G. Guanylil-cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.* 5: 2785-91, 1992b.
- 150 KOHLSTEDT K., BUSSE R., FLEMING I. Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension.* 45: 126-32, 2005.
- 151 KONE B.C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 51: 429-41, 2001.
- 152 KONE B.C., HIGHAM S. Nitric oxide inhibits transcription of the Na⁺-K⁺-ATPase alpha1-subunit gene in an MTAL cell line. *Am J Physiol.* 276: F614-21, 1999.
- 153 KOPP, U.C., FARLEY, D.M., SMITH, L.A. Bradykinin mediated activation of renal sensory neurons due to prostaglandin dependent release of substance P. *Am J Physiol.* 272: R2009-R2016, 1997.
- 154 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.* 153: 210-219, 1995.

- 155 KRAUSE W.J., FREEMAN R.H., 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.
- 156 KREISBERG J. I., M. A. VENKATACHALAM, D. TROYER. Contractile properties of cultured mesangial cells. *Am J Physiol.* 249: F457-F463, 1985.
- 157 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.
- 158 KUHN M., KULAKSIZ H., ADERMANN K., RECHKEMMER G. AND FORSSMANN W.G. Radioimmunoassay for circulating human guanylin. *FEBS Lett.* 341: 218-22, 1994.
- 159 LAHERA V., SALOM M.G., OLSEN M.F., ROMERO J.C. Mediatory role of endothelium-derived nitric oxide in renal vasodilatory and excretory function. *Am J Hypertens.* 4: 260-262, 1991.
- 160 LAINCHBURY J.G., BURNETT J.C. Jr, MEYER D, REDFIELD MM Effects of natriuretic peptides on load and myocardial function in normal and heart failure dogs. *Am J Physiol.* 278: H33-40, 2000.
- 161 LANEY-JR D.W., BEZERRA J.A., KOSIBA J.L., DEGEN S.J., COHEN M.B. Upregulation of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. *Am J Physiol.* 266: G899-906, 1994.
- 162 LASKOWSKI Jr .M., KATO I. Protein Inhibitor of Preteinases. *Ann Rev Biochem.* 49: 593-626, 1980.

- 163 LATTA H. Ultrastructure of the glomerular and juxtaglomerular apparatus, *Handbook of Physiology*. Sec. 7. Chap. 1. American Physiological Society, Washington, DC, 1-29, 1973.
- 164 LAURENT, A. "Recherches sur l'indigo". *Ann chim phys.* 3(3): 393 – 434, 1840.
- 165 LAYCHOCK S.G. Coordinate interactions of cyclic nucleotide and phospholipidmetabolizing pathways in calcium-dependent cellular processes. *Curr Top Cell Regul.* 30: 203-42, 1989.
- 166 LEE K.A. Transcriptional regulation by cAMP. *Curr Opin Cell Biol.* 3: 953-9 1991.
- 167 LEITMAN, D.L., WALDMAN, S.A., MURAD, F. Regulation of particulate guanylate cyclase by natriuretic peptides and Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *Adv. Parmacol.* 26, 67–86, 1994.
- 168 LENNANE R.J., PEART W.S., CAREY R.M., 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.
- 169 LENNANE, R.J., CAREY, R.M., GOODWIN, T.J., AND PEART, W.S. A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted man: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med.* 49: 437-440, 1975.
- 170 LEVIN E.R. Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am J Physiol.* 264: E483-89, 1993.
- 171 LEW, W.Y.W., LONGHURST, J.C. Substance P, 5- hydroxytryptamine, and bradykinin stimulate abdominal visceral afferents. *Am J Physiol.* 250: R465–R473, 1986.

- 172 LI Z., PERKINS A.G., PETERS M.F., CAMPA M.J., GOY M. F. Purification, cDNA sequence, and tissue distribution of rat uroguanylin. *Regul Pept.* 68(1): 45-56, 1997.
- 173 LICLICAN E.L., MCGIFF J.C., PEDRAZA P.L., FERRERI N.R., FALCK J.R., CARROLL M.A. Exaggerated response to adenosine in kidneys from high salt-fed rats: role of epoxyeicosatrienoic acids. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(2): F386-92, 2005.
- 174 LIMA A.A.M., 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.
- 175 LIMA A.A.M., MONTEIRO H.A.S., FONTELES M.C. The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal tubule sodium transport. *Pharmacol Toxicol.* 70: 163–167, 1992.
- 176 LIMA A.A.M., MONTEIRO H.S.A., FONTELES M.C. The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacology and Toxicology*. 70: 163-167, 1992.
- 177 LIMA A.A.M., MONTEIRO H.S.A., FONTELES M.C. Effects of thermostable *Escherichia coli* enterotoxin peptide on the isolated rat kidney. *Brazilian J Med Biol Res.* 25: 633-636, 1992.
- 178 LINDER M.E., 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.* 267(1): 56-61, 64-5, 1992.
- 179 LISY O., BURNETT J.C. JR. Potential future therapies: natriuretic peptides. *Coron Artery Dis.* 10: 389-394, 1999.

- 180 LOHMANN S. M., VAANDRAGER A. B., SMOLENSKI A., WALTER U., DE JONGE H. R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 22(8): 307-12, 1997.
- 181 LONDON R.M., EBER S.L., VISWESWARIAH S.S., KRAUSE W.J., FORTE L.R. Structure and activity of OK-GC: a kidney receptor guanylate cyclase activated by guanylin peptides. *Am J Physiol.* 276: F882–F891, 1999.
- 182 LONDON R.M., EBER S.L., VISWESWARIAH S.S., KRAUSE W.J., FORTE L.R. Structure and activity of OK-GC: a kidney receptor guanylate cyclase activated by guanylin peptides. *Am J Physiol.* 276: F882-91, 1992.
- 183 LONDON, R.M.; KRAUSE, W.J.; FAN, X.; EBER, S.; FORTE, L.R.: Signal transduction pathways via guanylin and uroguanylin in stomach and intestine. *Am J Physiol.* 273: G93-G105, 1997;
- 184 LONGHURST, J.C., DITTMAN, L.E. Hypoxia, bradykinin, and prostaglandins stimulate ischemically sensitive visceral afferents. *Am J Physiol.* 253: H556–H567, 1987.
- 185 LORENZ J.N., NIEMAN M., SABO J., SANFORD L.P., HAWKINS J.A., ELITSUR N., GAWENIS L.R., CLARKE L.L., COHEN M. B. Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. *J Clin Invest.* 112(8): 1244-54, 2003.
- 186 MADEDDU P., VARONI M.V., DEMONTIS M.P., CHAO J., SIMSON J.A., GLORIOSO N., ANANIA V. Kallikrein-kinin system and blood pressure sensitivity to salt. *Hypertension.* 29:471–477, 1997.

- 187 MADEDU P., VARONI M.V., DEMONTIS M.P., CHAO J., SIMSON J.A., GLORIOSO N., ANANIA V.; Kallikrein-kinin system and blood pressure sensitivity to salt. *Hypertension*. 29(1 Pt 2): 471-7, 1997.
- 188 MADRID M.I., SALOM M.G., TORNEL J., GASPARO M., FENOY F.J. Interactions between nitric oxide and angiotensin II on renal cortical and papillary blood flow. *Hypertension*. 30: 1175–1182, 1997.
- 189 MAIA L.G., RAMOS M.C., FERNANDES L., DE CARVALHO M.H., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SOUZA DOS SANTOS R.A. Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 43: 685-91, 2004.
- 190 MAJIMA M, SHIMA C, SAITO M, KURIBAYASHI Y, KATORI M, AOYAGI T. Poststatin, a novel inhibitor of bradykinin-degrading enzymes in rat urine. *Eur J Pharmacol*. 232: 181-190, 1993.
- 191 MAJIMA M., YOSHIDA O., MIHARA H., MUTO T., MIZOGAMI S., KURIBAYASHI Y., KATORI M., OHISHI S. High sensitivity to salt in kininogen-deficient brown Norway Katholiek rats. *Hypertension*. 22: 705–714, 1993.
- 192 MAJIMA, M., AND KATORI, M. Approaches to the development of novel antihypertensive drugs: crucial role of the renal kallikrein–kinin system. *Trends Pharmacol Sci*. 16: 239–246, 1995.
- 193 MANN E.A., COHEN M.B., GIANELLA R.A. Comparison of receptors for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: novel receptor present in IEC-6 cells. *Am J Physiol*. 264: G172-178, 1993.
- 194 MARGOLIUS H.S. Kallikreins and kinins: some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension*. 26: 221–229, 1995.

- 195 MARIN-CASTANO M.E., SCHANSTRA J.P., NEAU E., PRADDAUDE F., PECHER C., ADER J.L., GIROLAMI J.P., BASCANDS J.L. Induction of functional bradykinin B1-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation.* 105: 627–632, 2002.
- 196 MARIN-CASTANO M.E., SCHANSTRA J.P., PRADDAUDE F., PESQUERO J.B., ADER J.L., GIROLAMI J.P., BASCANDS J.L. Differential induction of functional B1-bradykinin receptors along the rat nephron in endotoxin induced inflammation. *Kidney Int.* 54: 1888–1898, 1998.
- 197 MARTINEZ-MALDONADO M., OPAVA-STITZER S. Free water clearance curves during saline, manitol, glucose and urea. *J Physiol.* 280: 487-497, 1978.
- 198 MARUMO T., NAKAKI T., HISHIKAWA K., HIRAHASHI J., SUZUKI H., KATO R., SARUTA T. Natriuretic peptide-augmented induction of nitric oxide synthase through cyclic guanosin 3',5'-monophosphate elevation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 136: 2135-42, 1995.
- 199 MATTSON D.L., COWLEY A.W. Kinin actions on renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension.* 21: 961–965, 1993.
- 200 McDERMOTT, D.A., MELLER, S.T., GEBHART, G.F., GUTTERMAN, D.D. Use of an indwelling catheter for examining cardiovascular responses to pericardial administration of bradykinin in rat. *Cardiovasc Res.* 30: 39–46, 1995.

- 201 MCKENZIE J.C., TANAKA I., MISONO K.S., INAGAMI I. Immunohistochemical localization atrial natriuretic factor in the kidney adrenal medulla, pituitary and atrium of rat. *J Histochem Cytochem.* 78: 1-5, 1985.
- 202 MEDVEDEV A., BUSSYGYNA O, PYATAKOVA N., GLOVER V., SEVERINA I. Effect of isatin on nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase from human platelets. *Biochem Pharmacol.* 63(4): 763-6, 2002.
- 203 MEDVEDEV, A.E., CLOW, A., SANDLER, M., GLOVER, V. Isatin: a link between natriuretic peptides and monoamines? *Biochem. Pharmacol.* 52: 385–391, 1996.
- 204 MEDVEDEV, A.E., SANDLER, M., GLOVER, V. Interaction of isatin with type-A of natriuretic peptide receptor. *Life Sci.* 62: 2391–2398, 1998.
- 205 MELO, L.G.; ACKERMAN, U. ANP in regulation of arterial pressure and fluid-electrolyte balance: lessons from genetic mouse models. *Physiol Genomics.* 3: 45-58, 2000.
- 206 MENE P., F. PUGLIESE, G. A. CINOTTI. Cellular basis of hormonal actions in the glomerular. *Am J Nephrol.* 10: 28-35, 1990.
- 207 MILLUL V., ARDAILOU N., PLACIER S., BAUDOUIN B., RONCO P.M. Receptors for natriuretic peptides in a human cortical collecting duct cell line. *Kidney Int.* 51: 281-87, 1997.
- 208 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, 1996a.

- 209 MIYAZATO M., NAKAZATO M., YAMAGUCHI H., DATE Y., KOJIMA M., KANGAWA K., MATSUO H., MATSUKURA S. Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. *Biochem Biophys Res Commun.* 219: 644-648, 1996.
- 210 MORHY L., 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.
- 211 MÜNXEL T, FIEL R, MÜLSCH A, LOHMANN SM, HOFMANN F, WALTER U.: Phisiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation.* 108: 2172, 2003.
- 212 MURRAY R. Rehydration strategies--balancing substrate, fluid, and electrolyte provision. *Int J Sports Med.* 19: S133-5, 1998.
- 213 NEER E.J., CLAPHAM D.E. Roles o f G protein subunits in transmembrane signaling. *Nature.* 333: 129-134, 1988.
- 214 NEVES F.A.R., DUNCAN K.G., BAXTER J.D. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension.* 27: 514-517, 1996.
- 215 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: 11369-76, 1983a.
- 216 NORTHUP J.K., STERNWEIS P.C., 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: 11361-8, 1983b.

- 217 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 U S A.* 77: 6516-20, 1980.
- 218 O'GRADY S.M., PALFREY H.C., FIELD M. Characteristics and functions of $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Cl}^-$ cotransport in epithelial tissues. *Am J Physiol.* 253: C177-92, 1987.
- 219 ONDETTI M. A., RUBIN B., CUSHMAN D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 196: 441-4, 1977.
- 220 ORTIZ P.A., GARVIN J.L. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 282: F777–84, 2002b.
- 221 PAN, H.-L., STAHL, G.L., RENDIG, S.V., CARRETERO, O.A., LONGHURST, J.C. Endogenous BK stimulates ischemically sensitive abdominal visceral C fiber afferents through kinin B2 receptors. *Am J Physiol.* 267: H2398–H2406, 1994.
- 222 PARKINSON S.J., CARRITHERS S.L., WALDMAN S.A. Opposing adenine nucleotide-dependent pathways regulates guanylyl cyclase C in the rat intestine. *J Biol Chem.* 269: 22683-22690, 1994.
- 223 PFEFFER M.A., BRAUNWALD E., MOYE L.A. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* 327: 669-77, 1992.

- 224 PINTO C. M. H. Seminários de integração sobre os aspectos morfofuncionais, de clínica médica e de saúde pública; “Introdução ao estudo da Medicina II”, março de 2006. Curso de graduação em Medicina (2^a fase), do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina; http://www.cristina.prof.ufsc.br/sm_2005_2_med7002.htm, 2008;
- 225 POMPERMAYER K., ASSREUY J., VIEIRA, M.A.R. Involvement of nitric oxide and potassium channels in the bradykinin-induced vasodilatation in the rat kidney perfused ex situ. *Regulatory Peptides*. 105: 155–162, 2002.
- 226 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.
- 227 RAMALHO F. S.; A Regeneração Hepática e os Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina. *Acta Cir. Bras.* v.15 supl.2 São Paulo, 2000;
- 228 REGOLI D., GOBEIL F., NGUYEN Q. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci.* 55: 735-49, 1994.
- 229 REUDELHUBER T.L. Molecular Biology of Renin. In Schlöndorff D, Bonventre JV eds. *Molecular Nephrology*. 1^a ed., New York, New York, Dekker, 71-89, 1995.
- 230 RIORDAN J.R. The cistic fibrosis transmembrane condutance regulator. *Annu Rev Physiol.* 55: 609-630, 1993.
- 231 RLEGGGER G.A.J., ELSNER D., SCHULZ-KNAPPE P. FORSSMANN W.G. The new peptide, urodilatin, (ANP-95-126) in dogs with and without heart failure. *Circulation*. 78 (suppl II): II-429, 1988.
- 232 ROCHA E SILVA M., BERALDO W.T., ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol.* 156: 261-73, 1949.

- 233 ROMAN, R.J., KALDUNSKI, M.L., SCICLI, A.G., CARRETERO, O.A. Influence of kinins and angiotensin II on the regulation of papillary blood flow. *Am. J. Physiol.* 288: F690–F698, 1988.
- 234 ROSS E.M. Physical separation of the catalytic and regulatory proteins of hepatic adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 256: 1949-53, 1981.
- 235 ROSS E.M., GILMAN A.G. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu Rev Biochem.* 49: 533-564, 1980.
- 236 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.
- 237 RUDOLPH J.A., HAWKINS J.A., COHEN M.B. Proguanylin secretion and the role of negative-feedback inhibition in a villous epithelial cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283(3): G695-702, 2002.
- 238 SANDMEYER T. Isonitrosoacetanilide Isatin Synthesis. *Helv Chim Acta.* 2: 234, 1919;
- 239 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.
- 240 SANTOS-NETO M.S., CARRITHERS S. L., CARVALHO A. F., MONTEIRO H. S., GREENBERG R. N., FORTE L. R., FONTELES M. C. Guanylin and its lysine-containing analogue in the isolated perfused rat kidney: interaction with chymotrypsin inhibitor. *Pharmacol Toxicol.*; 92(3): 114-20, 2003.

- 241 SANTOS-NETO M.S., CARVALHO A.F., FORTE L.R., FONTELES M.C. Relationship between the action of atrial natriuretic peptide (ANP), guanylin and uroguanylin on the isolated kidney. *Braz J Biol Res* 32: 1015-1019, 1999.
- 242 SANTOS-NETO M.S., CARVALHO A.F., SILVA A.C., FORTE, L.R., 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, 1997;
- 243 SANTOS-NETO M.S., OLIVEIRA A.V., GREENBERG R., MONTEIRO H.S.A., FONTELES M.C. Curva dose-resposta sigmoidal de guanilina em perfusão renal. *Resumos do XIII Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa*, p 161, Fortaleza, Ce., 1994b.
- 244 SATOH T., COHEN H.T., 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: 1496-500, 1992.
- 245 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.
- 246 SAVOIE, P., DE CHAMPLAIN, J., ANAND-SRIVASTAVA, M.B. C-type natriuretic peptide and brain natriuretic peptide inhibit adenylyl cyclase activity: interaction with ANF-R2rANP-C receptors. *FEBS Lett.* 370: 6–10, 1995.

- 247 SCAVONE C., SCANLON C., MCKEE M., NATHANSON J.A. Atrial natriuretic peptide modulates sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase through a mechanism involving cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther.* 272: 1036-43, 1995.
- 248 SCHIRGER J.A., HEUBLEIN D.M., CHEN H.H. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc.* 74: 126-30, 1999.
- 249 SCHULTZ S., CHRISMAN T. D., GARBERS D. L. Cloning and expression of gunylin its existence in various mammalian tissues. *J Biol Chem.* 267: 16019-16021, 1992.
- 250 SCHULZ S., GREEN C.K., YUEN P.S.T., GARBERS D.L. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell.* 63: 941-948, 1990.
- 251 SCHULZ-KNAPPE P., FORSSMANN K., HERBST F., HOCH D., PIPKORN R., FORSSMANN W.G. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr.* 66: 752-759, 1988.
- 252 SCICLI A.G., CARRETERO O.A. Renal kallikrein-kinin system. *Kidney Int.* 29: 120-130, 1986.
- 253 SELLERS Z., CHILDS D., CHOW J., SMITH A., HOGAN D. L., ISENBERG J. I., DONG H., BARRETT K., PRATHA V. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) stimulates a non-CFTR-mediated duodenal bicarbonate secretory pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288(4): G654-663, 2005.

- 254 SELLERS Z.M., MANN E., SMITH A., HYUN KO.K., GIANNELLA R., COHEN M.B., BARRETT K.E., DONG H. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) can stimulate duodenal HCO_3^- secretion via a novel GC-C- and CFTR-independent pathway. *FASEB J.* 22(5): 1306-1316. 2008.
- 255 *Sigma Product Information Sheet*, Sigma quality control data: chymostatin (Sigma Prod. No. C7268, CAS NUMBER: 9076-44-2). www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/c7268pis.pdf, 1998.
- 256 SINDIC A, BASOGLU C, CERCI A, HIRSCH JR, POTTHAST R, KUHN M, GHANEKAR Y, VISWESWARIAH SS, SCHLATTER E. Guanylin, uroguanylin, and heat-stable euterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells. *J Biol Chem.* 277: 17758-64, 2002.
- 257 SINDIC A., VELIC A., BASOGLU C., HIRSCH J.R., EDEMIR B., KUHN M., SCHLATTER E. Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. *Kidney Int.* 68: 1008-17, 2005.
- 258 SINGH S., SINGH G., HEIM J.M., GERZER R. Isolation and expression of a guanylate cyclase-coupled heat-stable enterotoxin receptor cDNA from a human colonic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1455-1463, 1991.
- 259 SIRAGY H.M., JAFFA A.A., MARGOLIUS H.S., CAREY R.M. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol.* 271: R1090–R1095, 1996.

- 260 SIRAGY M. H., JAFFA A. A., MARGOLIUS S. H. Bradykinin B2 Receptor Modulates Renal Prostaglandin E2 and Nitric Oxide Hypertension. 29: 757-762, 1997;
- 261 SMITS, J.F.M., BRODY, M.J. Activation of afferent renal nerves by intrarenal bradykinin in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 247: R1003–R1008, 1984.
- 262 SNIPES R.L. Intestinal absorptive surface in mammals of different sizes. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 138: 1-90, 1997.
- 263 SOARES A.M., SANTOS-NETO M.S., LIMA A.A.M. Comparaçao 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.
- 264 SONNENBERG J.L., SAKANE Y., JENG A.Y. Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat Kidney. *Peptides.* 9: 173-180, 1988.
- 265 STERNWEIS P.C., NORTHUP J.K., HANSKI E., SCHLEIFER L.S., SMIGEL M.D., GILMAN A.G. Purification and properties of the regulatory component (G/F) of adenylate cyclase. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 14: 23-36, 1981a.
- 266 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: 11517-26, 1981b.
- 267 STEVENS F.C. Calmodulin: an introduction. *Can J Biochem Cell Biol.* 61: 906-910, 1983.

- 268 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: 119-125, 1996.
- 269 STINGO A.J., CLAVELL A.L., AARHUS L.L. Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide. *Am J Physiol.* 262: H308-H312, 1992.
- 270 TATSUTA K., MIKAMI N., FUJIMOTO K., UMEZAWA S. AND UMEZAWA H. The structure of chymostatin, a chymotrypsin inhibitor. *J Antibiot.* 26: 625-646, 1973.
- 271 TAYLOR W. The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochemistry Journal.* 272: 1-13, 1990.
- 272 TIEN X.Y., BRASITUS T.A., KAETZEL M.A., DEDMAN J.R., NELSON D.J. Activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by cGMP in the human colonic cancer cell line, Caco-2. *J Biol Chem.* 269: 51-54, 1994.
- 273 TIWARI M. M., STIMERS J. R., MAYEUR P.R. Bradykinin-induced chloride conductance in murine proximal tubule epithelial cells. *Mol Cell Biochem.* 297(1-2): 1-8. 2006.
- 274 TORNEL J, MADRID MI, GARCIA-SALOM M, WIRTH KJ, FENOY, FJ. Role of Kinins in the Control of Renal Papillary Blood Flow, Pressure Natriuresis, and Arterial Pressure. *Circ Res.* 86: 589-595, 2000.
- 275 TORP-PEDERSEN C., KOBER L. Effect of ACE inhibitor trandolapril on life expectancy of patients with reduced leftventricular function after acute myocardial infarction. TRACE Study Group. Trandolapril Cardiac Evaluation. *Lancet.* 354: 9-12, 1999.

- 276 UMEZAWA H., AOYAGI T., MORISHIMA H., KUNIMOTO S., MATSUZAKI M. Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes. *J Antibiot.* 23: 425-427, 1970.
- 277 VAANDRAGER A. B., BOT A. G., RUTH P., PFEIFER A., HOFMANN F., DE JONGE H. R. Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology*; 118(1) :108-14; 2000.
- 278 VAANDRAGER A. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. *Mol. Cell. Biochem.* 230: 73-83, 2002.
- 279 VAANDRAGER A.B., SCHULZ S., DE JONGE, H.R. AND GARBERS D.L. Guanylyl cyclase C is a N-linked glicoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *J. Biol. Chem.* 268: 2174-2179, 1993a.
- 280 VAANDRAGER A.B., VAN DER WIEL E., HOM M.L., LUTHJENS L.H., DE JONGE H.R. Heat-stable enterotoxin receptor/guanylate cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J. Biol. Chem.* 269: 16409-16415, 1994.
- 281 VAANDRAGER A.B., VAN DER WIEL, E., DE JONGE H.R. Heat-stable enterotoxin activation of immunepurified guanylate cyclase C: Modulation by adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 268: 19598-19603, 1993b.
- 282 VALENTIN J.P., HUMPHREYS H. URODILATIN: a paracrine renal natriuretic peptide. *Seminars in Nephrology*. 13: 61-70, 1993.
- 283 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, 1993b.

- 284 VESELY D.L. Atrial natriuretic peptides in the diagnosis and treatment of congestive heart failure. *Cong Heart Failure*. 5: 171-79, 1999.
- 285 VILLAR I.C., PANAYIOTOU C.M., SHERAZ A., MADHANI M., SCOTLAND R.S., NOBLES M., KEMP-HARPER B., AHLUWALIA A., HOBBS A.J. Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Cardiovasc Res*. 74: 515-25, 2007.
- 286 WADA A., HIRAYAMA T., KITAO S., FUJISAWA J., HIDAKA Y. AND SHIMONISHI Y. Pig intestinal membrane-bound receptor (guanylate cyclase) for heat-stable enterotoxin: cDNA cloning, functional expression, and characterization. *Microbiol. Immunol.* 38: 535-541, 1994.
- 287 WANG D., YOSHIDA H., SONG Q., CHAO L., CHAO J. Enhanced renal function in bradykinin B2 receptor transgenic mice. *Am J Physiol* 278: F484–F491, 2000.
- 288 WATKINS P., CLOW A., GLOVER V., HALKET J., PRZYBOROWSKA A., SANDLER M. Isatin, regional distribution in rat brain and tissues. *Neurochem. Int.* 17: 321–323, 1990.
- 289 WATSON D.W., SODEMAN-JR. W.A. *Pathologic Physiology: Mechanisms of Disease*, 6th edition, T. M. Sodeman Company, Chapter: The Small Intestine, pp 824, 1979.
- 290 WAY L.W. *Surgical Diagnosis & Treatment*, 10^a edição, Editora Appleton & Lange, Chapter 9: Fluid & Electrolyte Management, pp 129. 142, 1994.

- 291 WEGENER, J.W., CLOSS, E.I., FORSTERMANN, U., NAWRATH, H. Failure of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) to inhibit soluble guanylyl cyclase in rat ventricular cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 127: 693, 1999.
- 292 WEINBERGER, M.H. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Raven, New York, 1990.
- 293 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;
- 294 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, 1997b;
- 295 WIEGAND R.C., KATO J., 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, 1992a;
- 296 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, 1992b.
- 297 WILLIS L. R., J. H. LUDENS, J. B. HOOK, H. E. WILLIAMSON. Mechanisms of natriuretic action of bradykinin. *Am. J. Physiol.* 217: 1-5, 1969.

- 298 YAMAMOTO T., FENG L., MIZUNO T., HIROSE S., KAWASAKI K., YAIOTA E., KIHARA I., WILSON C. B. Expression of mRNA for natriuretic peptide receptor subtypes in bovine kidney. *Am. J. Physiol.* 267: F318-24, 1994.
- 299 YANDLE, T.G. Biochemistry of natriuretic peptides. *J. Intern. Med.* 235: 561–576, 1994.
- 300 YE P., KANOH M., ZHU W., LASZKIEWICZ I., ROYLAND J.E., WIGGINS R.C., KONAT G. Cyclic AMP-induced upregulation of proteolipid protein and myelin associated glycoprotein gene expression in C6 cells. *J Neurosci Res* 31: 578-83, 1992.
- 301 YU, H., CARRETERO, O., JUNCOS, L., GARVIN, J. Biphasic effect of bradykinin on rabbit afferent arterioles. *Hypertension*, 32: 287–292, 1998.
- 302 YUN J.C., GILL J.R., BARTTER F.C., KELLY G.D., KEISER H.R. Effect of bradykinin on renal function in dogs treated with indomethacin or propranolol. *Ren Physiol.* 5: 31-43, 1982.
- 303 ZHANG C., MAYEUX P.R. NO-cGMP signaling modulates regulation of Na^+,K^+ -ATPase activity by angiotensin II in rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 280: F474–9, 2001.
- 304 ZHAO Y., BRANDISH P.E., DIVALENTIN M., SCHELVIS J.P., BABCOCK G.T., MARLETTA M.A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* 39:10848, 2000.
- .

9. ANEXOS

Tabela 3: Pressão de perfusão aferida da artéria renal (PP; mmHg). Média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de cada grupo experimental.

Grupo Experimental	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	112 \pm 6	111 \pm 7	108 \pm 8	104 \pm 9
UGN (0,6 μ M)	113 \pm 6	127 \pm 6	136 \pm 4 ***	133 \pm 3 ***
UGN (0,3 μ M)	127 \pm 5	121 \pm 3	120 \pm 3	135 \pm 4 ***
BK (1,8 nM)	118 \pm 2	130 \pm 3 ***	140 \pm 5 ***	139 \pm 5 ***
BK (0,9 nM)	111 \pm 4	105 \pm 3	104 \pm 4	107 \pm 5
BK (0,3 nM)	109 \pm 4	101 \pm 2	104 \pm 3	107 \pm 1
UD (0,03 nM)	109 \pm 6	95 \pm 3	86 \pm 4 ***	87 \pm 6 ***
IS (10 μ M)	122 \pm 5	137 \pm 3 *	147 \pm 5 ***	154 \pm 8 ***
IS (3 μ M)	115 \pm 4	113 \pm 5	120 \pm 4	154 \pm 5 ***
ODQ (37 μ M)	118 \pm 3	130 \pm 5	130 \pm 2	123 \pm 1
IS (3 μ M) + UGN (0,6 μ M)	123 \pm 11	140 \pm 13	164 \pm 12 ***	158 \pm 7 ***
IS (3 μ M) + BK (1,8 nM)	116 \pm 4	115 \pm 4	128 \pm 4	129 \pm 2
ODQ (37 μ M) + BK (1,8 nM)	120 \pm 3	118 \pm 4	108 \pm 5	111 \pm 3
UGN (0,6 μ M) + BK (0,3 nM)	113 \pm 2	109 \pm 2	110 \pm 2	112 \pm 3
UGN (0,6 μ M) + UD (0,03 nM)	123 \pm 5	126 \pm 4	130 \pm 5 ***	133 \pm 5 ***
UGN (0,3 μ M) + UD (0,03 nM)	112 \pm 6	110 \pm 8	107 \pm 8	116 \pm 6

* 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 4: Transporte tubular fracionado de sódio (%TNA; %). Média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de cada grupo experimental.

Grupo Experimental	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	84+3	84+2	84+2	82+3
UGN (0,6 µM)	81+1	80+2	72+1	76+2***
UGN (0,3 µM)	83+1	85+1	83+2	83+2
BK (1,8 nM)	81+1	76+2***	77+2	77+1
BK (0,9 nM)	81+3	84+2	81+2	80+3
BK (0,3 nM)	84+2	87+1	87+1	85+1
UD (0,03 nM)	84+1	82+2	86+2	84+2
IS (10 µM)	83+1	81+2	76+2***	74+3***
IS (3 µM)	84+1	82+1	82+1	80+1
ODQ (37 µM)	81+3	82+1	80+0	79+3
IS (3 µM) + UGN (0,6 µM)	83+1	80+2	76+1***	73+2***
IS (3 µM) + BK (1,8 nM)	82+2	84+1	81+2	80+1
ODQ (37 µM) + BK (1,8 nM)	82+1	78+2	79+2	80+1
UGN (0,6 µM) + BK (0,3 nM)	84+1	79+1	74+2***	79+2
UGN (0,6 µM) + UD (0,03 nM)	84+1	80+2	77+2	73+4***
UGN (0,3 µM) + UD (0,03 nM)	84+1	82+2	76+3***	76+3

* 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 5: Transporte tubular fracionado de potássio (%; %TK). Média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de cada grupo experimental.

Grupo Experimental	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	72 \pm 6	73 \pm 5	74 \pm 4	72 \pm 5
UGN (0,6 μ M)	62 \pm 5	56 \pm 8	48 \pm 7***	58 \pm 4
UGN (0,3 μ M)	69 \pm 3	73 \pm 3	72 \pm 2	71 \pm 2
BK (1,8 nM)	63 \pm 2	46 \pm 3***	45 \pm 5***	42 \pm 6***
BK (0,9 nM)	76 \pm 4	79 \pm 2	77 \pm 3	80 \pm 3
BK (0,3 nM)	70 \pm 4	77 \pm 2	77 \pm 2	76 \pm 2
UD (0,03 nM)	65 \pm 2	62 \pm 2	65 \pm 3	62 \pm 3
IS (10 μ M)	62 \pm 3	57 \pm 4	57 \pm 5*	57 \pm 3
IS (3 μ M)	69 \pm 2	73 \pm 2	72 \pm 1	69 \pm 1
ODQ (37 μ M)	65 \pm 3	63 \pm 3	50 \pm 1***	46 \pm 8***
IS (3 μ M) + UGN (0,6 μ M)	71 \pm 4	68 \pm 4	58 \pm 7**	62 \pm 4
IS (3 μ M) + BK (1,8 nM)	65 \pm 3	60 \pm 4	38 \pm 10***	39 \pm 6***
ODQ (37 μ M) + BK (1,8 nM)	67 \pm 2	61 \pm 5	60 \pm 4	61 \pm 4
UGN (0,6 μ M) + BK (0,3 nM)	73 \pm 2	66 \pm 3	59 \pm 4	66 \pm 3
UGN (0,6 μ M) + UD (0,03 nM)	71 \pm 4	70 \pm 2	69 \pm 2	70 \pm 2
UGN (0,3 μ M) + UD (0,03 nM)	68 \pm 3	63 \pm 4	46 \pm 6***	48 \pm 4***

* 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: RVR Média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de cada grupo experimental.

Grupo Experimental	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	2 ± 1
UGN (0,6 µM)	3 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
UGN (0,3 µM)	11 ± 1 **	11 ± 1 **	11 ± 1 **	11 ± 1 **
BK (1,8 nM)	7 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 1
BK (0,9 nM)	5 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	5 ± 1
BK (0,3 nM)	6 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 1
UD (0,03 nM)	4 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
IS (10 µM)	5 ± 1 **	5 ± 1 **	5 ± 1 **	7 ± 2 **
IS (3 µM)	11 ± 2 **	11 ± 2 **	11 ± 2 **	11 ± 2 **
ODQ (37 µM)	7 ± 1	8 ± 1	8 ± 1	8 ± 1
IS (3 µM) + UGN (0,6 µM)	12 ± 4 **	13 ± 4 **	21 ± 5 **	26 ± 6 ***
IS (3 µM) + BK (1,8 nM)	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1
ODQ (37 µM) + BK (1,8 nM)	5 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	5 ± 1
UGN (0,6 µM) + BK (0,9 nM)	11 ± 1 **	11 ± 1 **	11 ± 1 **	11 ± 1 **
UGN (0,6 µM) + UD (0,03 nM)	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 2	8 ± 2
UGN (0,3 µM) + UD (0,03 nM)	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1

* 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 7: Transporte tubular fracionado de cloreto (%; %TCl). Média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de cada grupo experimental.

Grupo Experimental	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	84 \pm 3	85 \pm 3	84 \pm 2	81 \pm 4
UGN (0,6 μ M)	80 \pm 1	76 \pm 4	65 \pm 5***	75 \pm 2
UGN (0,3 μ M)	82 \pm 1	85 \pm 1	83 \pm 2	81 \pm 2
BK (1,8 nM)	76 \pm 1	69 \pm 3***	71 \pm 2***	70 \pm 1***
BK (0,9 nM)	79 \pm 4	82 \pm 3	84 \pm 2	82 \pm 2
BK (0,3 nM)	82 \pm 2	86 \pm 1	86 \pm 1	83 \pm 2
UD (0,03 nM)	79 \pm 3	69 \pm 3	76 \pm 4	70 \pm 5***
IS (10 μ M)	78 \pm 1	77 \pm 2	73 \pm 3	69 \pm 3***
IS (3 μ M)	77 \pm 0	75 \pm 2	75 \pm 1	73 \pm 2
ODQ (37 μ M)	77 \pm 3	78 \pm 2	73 \pm 1	72 \pm 4
IS (3 μ M) + UGN (0,6 μ M)	75 \pm 2	72 \pm 3	67 \pm 2***	64 \pm 3***
IS (3 μ M) + BK (1,8 nM)	78 \pm 1	79 \pm 1	73 \pm 3	72 \pm 1
ODQ (37 μ M) + BK (1,8 nM)	78 \pm 2	72 \pm 3	73 \pm 2	74 \pm 2
UGN (0,6 μ M) + BK (0,3 nM)	82 \pm 2	77 \pm 2	67 \pm 3***	76 \pm 3
UGN (0,6 μ M) + UD (0,03 nM)	73 \pm 4	73 \pm 4	78 \pm 2	68 \pm 5***
UGN (0,3 μ M) + UD (0,03 nM)	81 \pm 2	68 \pm 3***	55 \pm 7***	58 \pm 5***

* 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 8: Fluxo urinário (FU; $\text{ml} \cdot 10^2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Média e EPM dos períodos de perfusão (30 min, 60 min, 90 min e 120 min) de cada grupo experimental.

Grupo Experimental	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	10 \pm 1	9 \pm 1	10 \pm 2	10 \pm 2
UGN (0,6 μM)	12 \pm 1	11 \pm 1	17 \pm 1	19 \pm 1 ***
UGN (0,3 μM)	8 \pm 1	8 \pm 1	8 \pm 1	8 \pm 1
BK (1,8 nM)	13 \pm 1	13 \pm 1	14 \pm 1	13 \pm 1
BK (0,9 nM)	8 \pm 1	8 \pm 1	8 \pm 1	8 \pm 1
BK (0,3 nM)	9 \pm 1	8 \pm 1	9 \pm 1	9 \pm 2
UD (0,03 nM)	11 \pm 1	8 \pm 1	7 \pm 1	7 \pm 1 *
IS (10 μM)	8 \pm 1	13 \pm 1	21 \pm 1 ***	30 \pm 1 ***
IS (3 μM)	17 \pm 1 **	20 \pm 1 **	29 \pm 1 ***	28 \pm 1 ***
ODQ (37 μM)	11 \pm 1	13 \pm 1	11 \pm 1	12 \pm 1
IS (3 μM) + UGN (0,6 μM)	17 \pm 1	29 \pm 3 ***	44 \pm 4 ***	63 \pm 8 ***
IS (3 μM) + BK (1,8 nM)	13 \pm 1	14 \pm 1	12 \pm 1	13 \pm 1
ODQ (37 μM) + BK (1,8 nM)	9 \pm 1	10 \pm 1	10 \pm 1	11 \pm 1
UGN (0,6 μM) + BK (0,3 nM)	9 \pm 1	10 \pm 1	11 \pm 1	10 \pm 1
UGN (0,6 μM) + UD (0,03 nM)	9 \pm 1	10 \pm 1	10 \pm 1	10 \pm 1
UGN (0,3 μM) + UD (0,03 nM)	8 \pm 1	10 \pm 1	12 \pm 1	13 \pm 1

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo; ** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.