



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

PEDRO HENRIQUE SÁ COSTA

EFEITOS DA UROGUANILINA EM TÚBULO PROXIMAL DE RATOS
SUBMETIDOS À DOENÇA RENAL CRÔNICA EXPERIMENTAL

FORTALEZA-CE

2019

PEDRO HENRIQUE SÁ COSTA

**EFEITOS DA UROGUANILINA EM TÚBULO PROXIMAL DE RATOS
SUBMETIDOS À DOENÇA RENAL CRÔNICA EXPERIMENTAL**

Tese de doutorado apresentado à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.

Coorientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

FORTALEZA-CE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C875e Costa, Pedro Henrique Sá.
Efeitos da uroguanilina em túbulo proximal de ratos submetidos à doença renal crônica experimental /
Pedro Henrique Sá Costa. – 2019.
96 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.
Coorientação: Prof. Dr. Helena Serra Azul Monteiro.
1. Angiotensina II. 2. Doença Renal Crônica. 3. Enalapril. 4. Natriurese. 5. Uroguanilina. I. Título.
CDD 615.1
-

PEDRO HENRIQUE SÁ COSTA

EFEITOS DA UROGUANILINA EM TÚBULO PROXIMAL DE RATOS
SUBMETIDOS À DOENÇA RENAL CRÔNICA EXPERIMENTAL

Tese de doutorado apresentado à Coordenação
do Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal do
Ceará. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr. Manassés Claudino Fonteles (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Coorientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Aline Diogo Marinho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Victor Martins Gomes

Faculdade das Américas (FADAM)

Prof. Dr. Carlos Campos Câmara

Universidade Federal do Semi-Árido (UFERSA)

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos meus irmãos, Paulo Henrique e Ana Adélia, pelo companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Manassés Fonteles, exemplo de professor e pesquisador, por compartilhar suas experiências e seus conhecimentos, e pelo apoio no projeto

A minha coorientadora, professora Helena Serra Azul, pelo incentivo e apoio no projeto.

Aos professores Carlos Câmara e Victor Martins por aceitarem compor a banca deste exame e por todas as contribuições que serão fornecidas.

À professora Lucília Lessa, pela contribuição no trabalho e por disponibilizar se laboratório para realização dos experimentos de microperfusão estacionária.

A toda a equipe de estudantes da UECE, em especial aos doutorandos Renan, Mirna e Alana, sou muito grato ao total apoio e ensinamentos que tive nos experimentos.

À equipe da UFC, doutorandos Letícia e Junior, ao mestrando Wendel, ao doutor Alison, à doutora Aline e à professora Roberta. Sou muito grato a vocês pelo apoio e ajuda nos experimentos.

Aos meus grandes amigos Stefânio, Rafael, Filipe, Carlos Celso, Evaldo e Natacha.

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

Ao CNPQ, CAPES, FUNCAP e à Universidade Federal do Ceará pela contribuição financeira para a realização deste estudo.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) constitui um importante problema de saúde pública que afeta principalmente os países ocidentais. No contexto da fisiopatologia dessa condição, o nível dos peptídeos natriuréticos, como peptídeo natriurético atrial (ANP) e uroguanilina (UGN), encontram-se elevados. Entretanto, não se sabe se os elevados níveis destes hormônios implicam em resposta natriurética adequada. Ademais, mostram-se necessários estudos que estabeleçam uma relação entre a DRC e a regulação de peptídeos natriuréticos e uma possível relação com a angiotensina II (AngII). Assim, buscou-se avaliar uma possível modulação da resposta à UGN pelo enalapril no modelo de nefrectomia 5/6 (nx 5/6). Utilizou-se ratos Wistar, machos, com peso entre 250-300g. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=8): grupos controle sem tratamento ou tratado com enalapril (10mg/kg v.o.) (SHAM e SHAM+E) e grupos submetidos à nx 5/6 sem tratamento ou tratado com enalapril (10 mg/kg v.o.) (Nx e Nx+E). Ao final da 10ª semana após a cirurgia, os animais foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária *in vivo*, no intuito de investigar o papel da UGN no túbulo proximal frente as diferentes condições. Posteriormente, foram determinados alguns marcadores de função renal e de estresse oxidativo, bem como quantificados os níveis de GMPc urinários. Nx apresentou os níveis séricos de creatinina, uréia, proteinúria, fração de excreção de sódio (FENa⁺) e malonaldeído (MDA) aumentados, e a taxa de filtração glomerular (TFG), além da atividade da superóxido dismutase renal (SOD) diminuídas. Nx+E, quando comparado a Nx, apresentou níveis reduzidos de creatinina, ureia, de proteinúria, da FENa⁺, e de MDA, além elevar a TFG. O grupo com DRC apresentou níveis baixos de GMPc na urina comparados ao controle, e o grupo tratado com enalapril atenuou em parte essa redução. Através da técnica de microperfusão estacionária, observou-se uma diminuição na reabsorção tubular proximal de bicarbonato nos animais submetidos a nx 5/6. A infusão intratubular de UGN não apresentou qualquer resposta nos animais com DRC, sugerindo insensibilidade do túbulo proximal a este hormônio nessa condição. Em contrapartida, nos animais do grupo Nx+E a UGN apresentou caráter inibitório sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato. Dessa forma, sugere-se que a modulação do SRAA na DRC aumenta sensibilidade do receptor GC-C à UGN a nível renal.

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

ABSTRACT

EFFECTS OF UROGUANYLIN IN PROXIMAL TUBULE OF RATS SUBMITTED TO EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC KIDNEY DISEASE

Chronic kidney disease (CKD) is a major public health problem that affects mainly Western countries. In the context of the pathophysiology of this condition, the level of natriuretic peptides, such as atrial natriuretic peptide (ANP) and uroguanylin (UGN), are elevated. However, it is not known whether high levels of these hormones imply in suitable natriuretic response. In addition, studies are required to establish a relationship between CKD and regulation of natriuretic peptides and a possible relationship with angiotensin II (AngII). Thus, we attempted to evaluate a possible modulation of the UGN response by enalapril in the 5/6 nephrectomy model (nx 5/6). Male Wistar rats weighing 250-300g were used. The animals were divided in 4 groups (n = 8): control groups without treatment or treated with enalapril (10mg / kg) (SHAM and SHAM + E) and groups submitted to nx 5/6 without treatment or treated with enalapril (10 mg / kg vol) (Nx and Nx + E). At the end of the 10th week after surgery, the animals were submitted to stationary microperfusion technique *in vivo*, in order to investigate the role of UGN in the proximal tubule in face of the different conditions. Subsequently, some markers of renal function and oxidative stress were determined, as well as urinary GMPc levels. Nx presented increased serum creatinine, urea, proteinuria, sodium excretion fraction (FENa⁺) and malonaldehyde (MDA), and glomerular filtration rate (GFR), as well as decreased superoxide dismutase activity (SOD). Nx + E, when compared to Nx, presented reduced levels of creatinine, urea, proteinuria, FENa +, and MDA, in addition to elevating GFR. The CKD group had low urinary cGMP levels compared to controls, and the enalapril group partially attenuated this reduction. Through the stationary microperfusion technique, a decrease in proximal tubular reabsorption of bicarbonate was observed in animals submitted to nx 5/6. Intratubular infusion of UGN did not show any response in the animals with CKD, suggesting insensitivity of the proximal tubule to this hormone in this condition. On the other hand, in the Nx + E group the UGN presented inhibitory character on the bicarbonate reabsorption flow. Thus, it is suggested that the modulation of the RAAS in DRC increase the sensitivity of the GC-C receptor to the UGN at the renal level.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs – Produtos finais de glicosilação avançada

Ang (1-9) – Angiotensina (1-9)

Ang (1-7) – Angiotensina (1-7)

AngII – Angiotensina II

AT-1 – Receptor de angiotensina II - tipo 1

CFTR - Canal regulador transmembrana da fibrose cística

DM – Diabetes Melito

DRC – Doença renal crônica

ECA – Enzima conversora da angiotensina

ECA-2 – Enzima conversora da angiotensina – 2

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EROs – Espécies reativas do oxigênio

GC-A – Guanilato ciclase - A

GC-B – Guanilato ciclase - B

GC-C – Guanilato ciclase – C

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

GN – Guanilina

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HCO₃⁻ - Bicarbonato

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HIF-1 α – Fator de transcrição induzido por hipóxia-1-alfa

IL-6 – Interleucina - 6

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LEC – Líquido extracelular

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

MCP- α – Proteína quimiotática de monócitos

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

NF κ -B – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitrato

NO₃⁻ - Nitrito

NOS – Óxido nítrico sintase

NPR-C – Receptor de *clearence*

Nx5/6 – nefrectomia 5/6

O₂⁻ - Superóxido

OH⁻ - Hidroxila

ONOO⁻¹⁰ – Peroxinitrito

PCR – Proteína C reativa

PDE-III- Fosfodiesterase - III

PKG-II – Proteína quinase - II

PKC – Proteína quinase C

PNs – Peptídeos natriuréticos

ANP – Peptídeo natriurético atrial

ROMK – Canal de potássio da medula externa renal

rpm – rotações por minuto

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

STa – Toxina termo-estável

TFG – Taxa filtração glomerular

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

TNF- α – Fator de necrose tumoral - alfa

UGN – Uroguanilina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa do total de pacientes em tratamento dialítico no Brasil entre os anos de 2000 e 2016	18
Figura 2	Vias clássica e alternativa do sistema renina-angiotensina	25
Figura 3	Ações gerais das guanilinas no túbulo proximal.	33
Figura 4	Etapas do modelo cirúrgico de nefrectomia 5/6 em ratos	38
Figura 5	Desenho experimental dos grupos sem tratamento (SHAM e Nx)	39
Figura 6	Desenho experimental dos grupos tratados com enalapril (SHAM+E e Nx+E)	40
Figura 7	Registro representativo da calibração de um microeletrodo sensível ao hidrogênio.	43
Figura 8	Desenho esquemático do sistema experimental da técnica de microperfusão estacionária	44
Figura 9	Registro representativo de um experimento com microperfusão estacionária de túbulos renais	45
Figura 10	Curva de crescimento animal no decorrer do protocolo experimental	52
Figura 11	Efeito do tratamento com enalapril no peso renal após a nefrectomia 5/6	53
Figura 12	Efeito do enalapril sobre a razão do peso renal pelo peso corpóreo dos animais 10 semanas após a nefrectomia 5/6	53
Figura 13	Efeito do tratamento com enalapril na TFG em animais com DRC experimental	55
Figura 14	Efeito do tratamento com enalapril nos níveis de creatinina sérica em animais com DRC experimental	56
Figura 15	Níveis de uréia sérica em ratos submetidos à nefrectomia 5/6	57
Figura 16	Efeito do enalapril na proteinúria em animais submetidos a nefrectomia 5/6	58
Figura 17	Quantificação do molondealdeído em tecido renal	61
Figura 18	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) em tecido renal	62

Figura 19	Quantificação de GMPc na urina	63
Figura 20	Efeito da DRC sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal	64
Figura 21	Efeito da DRC sobre o bicarbonato estacionário no túbulo proximal.	64
Figura 22	Meia-vida de reacidificação tubular no túbulo proximal	65
Figura 23	Potencial hidrogeniônico estacionário no túbulo proximal	66
Figura 24	Efeito da uroguanilina sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6	67
Figura 25	Efeito da uroguanilina sobre o bicarbonato estacionário no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6	67
Figura 26	Efeito da uroguanilina sobre a meia-vida de reacidificação no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6	68
Figura 27	Efeito da uroguanilina sobre o potencial hidrogeniônico estacionário no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6	68
Figura 28	Efeito da uroguanilina sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril	69
Figura 29	Efeito da uroguanilina sobre o bicarbonato estacionário no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril	70
Figura 30	Efeito da uroguanilina sobre a meia-vida de reacidificação ($t_{1/2}$) no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril.	71
Figura 31	Efeito da uroguanilina sobre o potencial hidrogeniônico estacionário no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito do enalapril no volume urinário em animais controles e nefrectomizados	54
Tabela 2	Parâmetros de função glomerular nos diferentes grupos experimentais	59
Tabela 3	Processamento do sódio nos diferentes grupos experimentais	60
Tabela 4	Valores numéricos dos grupos estudados na técnica de microperfusão estacionária <i>in vivo</i> .	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Aspectos gerais da doença renal crônica	15
1.2	Epidemiologia	17
1.3	Fisiopatologia da doença renal crônica	18
1.4	O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona na doença renal crônica	23
1.5	Detalhamento das ações tubulares da angiotensina II	27
1.6	Papel nefroprotetor dos inibidores da ECA	27
1.7	Peptídeos natriuréticos e a via das guanilinas	29
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo principal	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Animais	37
4.2	Indução da DRC	37
4.3	Protocolo experimental	38
4.4	Microperfusão estacionária <i>in vivo</i>	40
4.4.1	Procedimento cirúrgico	40
4.4.2	Preparo das micropipetas	41
4.4.3	Preparo dos microelétrodos	41
4.4.4	Calibração dos microeletrodos	43
4.4.5	Estudo dos efeitos da uroguanilina sobre a atividade do permutador NHE3	44
4.5	Avaliação de parâmetros gerais em gaiolas metabólicas	46
4.6	Análise da função renal	46

4.6.1	Procedimentos realizados nas amostras de sangue	46
4.6.2	Dosagem da creatinina sérica e urinária	47
4.6.3	Cálculo da taxa de filtração glomerular	47
4.6.4	Dosagem de ureia sérica	47
4.6.5	Determinação de proteínas na urina	47
4.6.6	Cálculo da fração de excreção de sódio	48
4.7	Avaliação do estresse oxidativo no rim	48
4.7.1	Determinação de malonaldeído em tecido renal	48
4.7.2	Avaliação da atividade da superóxido dismutase em tecido renal	48
4.8	Dosagem de GMPc na urina	49
4.9	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Taxa de sobrevivência dos animais	51
5.2	Peso corpóreo e renal	51
5.3	Determinação do volume urinário de 24 horas	54
5.4	Avaliação de parâmetros de função renal	54
5.4.1	Função glomerular	54
5.4.2	Função tubular	59
5.5	Avaliação do estresse oxidativo em tecido renal	60
5.5.1	Quantificação de malonaldeído em tecido renal	60
5.5.2	Avaliação da atividade da superóxido dismutase em tecido renal	61
5.6	Quantificação de GMPc na urina	62
5.7	Avaliação do comportamento do túbulo proximal pela técnica de microperfusão estacionária	63
5.7.1	Efeito da doença renal crônica sobre o túbulo proximal	63
5.7.2	Efeito da infusão de uroguanilina no túbulo proximal de ratos com DRC	66
5.7.3	Efeito da infusão de uroguanilina no túbulo proximal de ratos com DRC tratados com enalapril	69

6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da doença renal crônica

O conceito de doença renal crônica (DRC) vem evoluindo ao longo do tempo, mas, de acordo com as diretrizes internacionais atuais, essa condição pode ser definida como uma redução da taxa de filtração glomerular (TFG) inferior a $60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ e/ou alterações em marcadores de função renal por no mínimo 3 meses de duração, independente da causa subjacente (WEBSTER et al., 2017).

O diagnóstico da DRC é realizado comumente através do rastreamento em testes aleatórios para determinação exames sanguíneos e de urina em triagens. Atualmente, o melhor indicador disponível da função renal é fornecido pelo cálculo do TFG, obtido através da relação entre os níveis urinário e plasmático de componentes endógenos (como a creatinina) ou exógenos (como inulina e iohexol). A determinação dos níveis de uréia, bem como a quantificação de proteinúria constituem estratégias essenciais no intuito de diagnosticar e estadiar a DRC. Ademais, a biópsia renal é capaz de demonstrar evidência definitiva dessa condição, através de alterações comuns, como esclerose glomerular, atrofia tubular e fibrose intersticial (RAZMARIA, 2016).

A DRC é caracterizada por uma perda progressiva, normalmente lenta e irreversível da capacidade funcional dos rins. Em consequência disso, há uma redução das funções globais dos rins, ou seja, glomerulares, tubulares e endócrinas (RIELLA; PERCOITS-FILHO, 2010). No que concerne o estadiamento, a DRC é descrita em 5 fases, de acordo com o TFG, proteinúria ou evidências de danos estruturais renais. Enquanto no início da doença os rins se adaptam de forma eficiente à perda crônica de néfrons, na fase final ocorre saturação dos mecanismos de reserva renal, resultando em diversos sintomas sistêmicos (HILL et al., 2016).

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

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

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

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

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

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

1.2 Epidemiologia

A DRC representa uma condição de saúde importante em todo o mundo, levando os países a altos gastos com saúde, além de constituir um fator de risco independente para a doença cardiovascular. Todos os estágios da DRC estão associados a riscos mais elevados de mortalidade por diversos desfechos, além de piora na qualidade de vida, em especial no estágio avançado da doença. Considerando todas as fases da DRC, a prevalência mundial dessa doença é estimada em 13% (HILL et al., 2016). Entretanto, observa-se uma considerável variação de acordo com cada região do planeta.

Entre os principais fatores de risco para a DRC, destacam-se o diabetes *melitus* (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemias e histórico familiar. Além destes, o envelhecimento da população está intrinsecamente relacionado à DRC (GANSERVOOT et al., 2013). Destes, a HAS pode ser tanto causadora, como consequência da progressão da DRC.

Já o DM, constitui outra comorbidade bastante comum. Nesse sentido, estima-se que 50% dos pacientes com DM tipo 2 apresentam lesões renais consideráveis (THOMMAS; COOPER; ZIMMET, 2015). Estudos apontam que aproximadamente 30% dos diabéticos acabam evoluindo para o estágio final da DRC (ATKINS, 2005). As glomerulopatias, especialmente a glomeruloesclerose segmentar e focal, além da glomerulonefrite membranoproliferativa, também constituem fatores que levam à DRC (SESSO; GORDAN, 2007).

Alguns distúrbios de origem genética, como as doenças císticas, são capazes de alterar a estrutura do néfron, causando DRC (LÓPEZ-NOVOA et al., 2011). Outros fatores, como a presença de infecções, o uso abusivo de analgésicos, a intoxicação por pesticidas, bem como a ingestão de alimentos com aditivos não regulamentados podem contribuir para o desenvolvimento da DRC, especialmente em países em desenvolvimento (JHA et al., 2013). Nos últimos anos, tem se intensificado a investigação do papel de fatores de riscos não-clássicos na fisiopatologia da DRC, como desnutrição, inflamação e estresse oxidativo (BRUNINI et al., 2006).

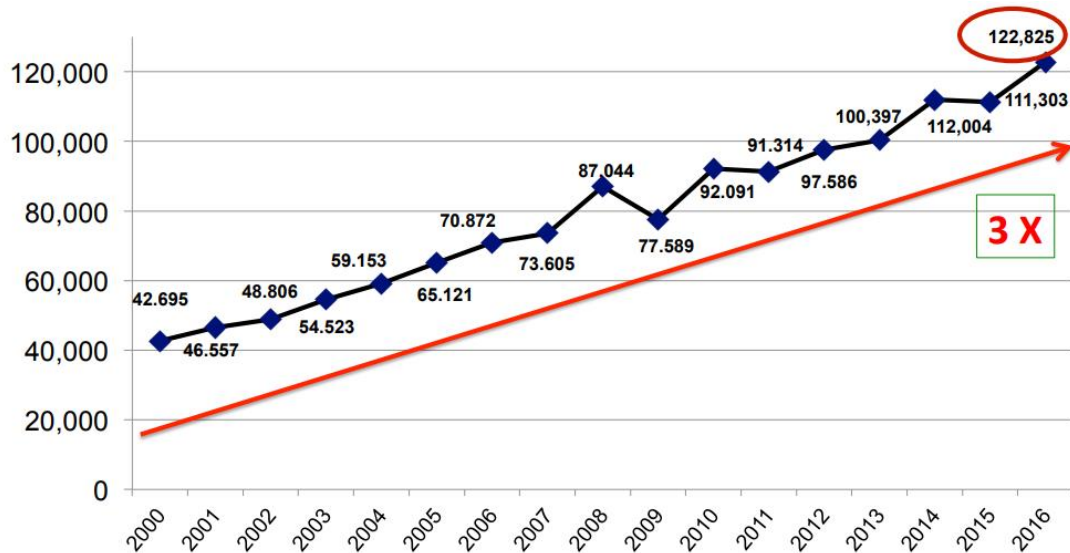
Nos Estados Unidos, verifica-se que a taxa de incidência de DRC aumentou nos anos 80 e 90, mas foi estabilizada nos anos 2000. Atualmente, observa-se que 14% da população norte-americana tem DRC. Adicionalmente, verifica-se que 468 mil pacientes recorrem à hemodiálise, e 193 mil apresentam rins transplantados (SARAN et al. 2018)

Embora em países desenvolvidos a prevalência de DRC varie entre 10 e 14% da população, em países em desenvolvimento, os dados epidemiológicos permanecem, até os dias

atuais, heterogêneos, e com qualidade limitada (STANFER et al., 2016). No Brasil a determinação da real prevalência da DRC é comprometida pela heterogeneidade dos dados presentes nos estudos presentes na literatura (MARINHO et al., 2017). Entretanto, de acordo com um estudo transversal recente, estima-se que 17,3% da população do Sudeste do Brasil tenha DRC (ALVES et al., 2017).

De acordo com uma estimativa realizada pelo Censo Brasileiro de Nefrologia (2017) a prevalência de diálises no Brasil triplicou entre os anos de 2000 e 2016 (vide Figura 1), levando ao Sistema Único de Saúde (SUS) a altos gastos com diálise e terapia renal substitutiva.

Figura 1: Estimativa do total de pacientes em tratamento dialítico no Brasil entre os anos de 2000 e 2016



Fonte: Sociedade Brasileira de Nefrologia (2017).

1.3 Fisiopatologia da doença renal crônica

Independente da etiologia, os néfrons não são afetados de forma homogênea no decorrer da DRC. A medida que a patologia avança, um aumento da população de néfrons lesionados ou mesmo destruídos tem sido comumente observado (LOPEZ-NÓVOA et al., 2010). Em geral, a progressão da doença depende de vários fatores, incluindo o teor de sódio na dieta, tipo de abordagem terapêutica empregada e ausência ou presença de comorbidades cardiovasculares (HAMZOUI et al., 2017).

Estudos em modelos experimentais animais de DRC, como a uninefrectomia e a nefrectomia 5/6, mostram que a retirada abrupta de massa renal causa uma série de alterações

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

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

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

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

Ainda no contexto da inflamação, a HAS desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão da DRC, podendo ser tanto causa como consequência da lesão renal, contribuindo para o decréscimo da função renal. A ativação do processo inflamatório e a disfunção endotelial são alguns dos componentes fisiopatológicos gerados pela hipertensão. Adicionalmente, a combinação da HAS com a DRC favorece o surgimento e a progressão de doenças cardíacas (ROSARIO; WESSON, 2006).

A HAS se faz acompanhar de uma constrição reflexa da arteríola aferente na maioria dos glomérulos, evitando que a P_{CG} se eleve. Entretanto, essa resposta não é homogênea em todos os néfrons, e em alguns deles não há constrição aferente adequada, o que resulta em hipertensão glomerular, e posteriormente, na nefrosclerose hipertensiva (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2012). Além disso, estudos experimentais têm relatado que a HAS contribui para a redução da produção de óxido nítrico, o que leva a vasoconstrição, e conseqüentemente, hipóxia do tecido renal (LOPEZ-NOVOA et al., 2010).

Além da hipertensão, distúrbios gerados pela síndrome metabólica, em situações como obesidade e resistência à insulina, desempenham um papel central na progressão da DRC (EROs) (GUEBRE-EGZIABHER et al., 2010). No contexto do metabolismo dos lipídios, estudos têm indicado que as dislipidemias, caracterizadas pelo aumento nos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de redução da lipoproteína de alta densidade (HDL), têm participação essencial na progressão do dano renal (CHEN et al., 2013).

Nos últimos anos, tem-se intensificado os estudos sobre o papel dos níveis de adiponectina, uma citocina produzida exclusivamente pelo tecido adiposo, no contexto da esclerose renal. Apesar do papel antiaterogênico e cardioprotetor da adiponectina, estudos que avaliam os efeitos de altos níveis plasmáticos de adiponectina ainda mostram-se controversos na função renal do paciente urêmico (JIA et al., 2012). A redução da gordura corporal em pacientes obesos portadores de DRC em diferentes estágios parece produzir benefícios ao rim, o que é evidenciado pela melhora em parâmetros relacionados a função renal, entre eles TFG e microalbuminúria (BOLIGNANO; ZOCCALI, 2013).

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

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

O estresse oxidativo é resultante de vários fatores intrínsecos à lesão renal, como disfunção endotelial, inflamação, uremia e hiperativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Ao mesmo tempo, o acúmulo de radicais livres tem relação fisiopatológica direta com a iniciação e perpetuação da DRC. A medida que a lesão renal se perpetua, os pacientes acometidos pela DRC apresentam uma significativa redução nas defesas antioxidantes, tornando estes mais sensíveis aos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs), que atuam diretamente ao elevar o nível de peroxidação lípida e proteica de diferentes componentes celulares (YARIBEYGI et al., 2018).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado diversos efeitos diretos do estresse oxidativo sobre células renais, incluindo modulação de fatores de transcrição pela HAS e DM, excesso de produção de angiotensina II, de AGEs e ativação da via dos polióis, que constituem mecanismos comuns em indivíduos com DM. Dessa maneira, mostra-se evidente uma forte ligação entre o DM e a formação de radicais livres na DRC (VERZOLA et al., 2004; TENG et al. 2014).

Ademais, tem sido evidenciada na literatura uma forte relação entre o estresse oxidativo e a retenção de sódio na DRC. As EROs, em especial o anion superóxido (O_2^-), atuam reduzindo a biodisponibilidade do NO no organismo. Por sua vez a queda nos níveis intra-renais de NO provocam aumento da reabsorção de sódio, resultando em retenção deste ion. Além disso, sabe-se que dieta hipersódica promove aumento do estresse oxidativo, o que contribui para perpetuar este ciclo vicioso, levando à sobrecarga renal (SOI; YEE, 2018).

Reforçando a importância dos radicais livres na progressão da DRC, verificou-se que um fármaco antioxidante denominado tempol, um agente que mimetiza a ação da superóxido

dismutase (SOD), foi capaz de atenuar a hipertensão e a lesão renal induzida pela retirada de 5/6 da massa renal em camundongos (DING et al., 2015).

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

Desse modo, os mecanismos fisiopatológicos presentes na DRC, são inúmeros, e agem de modo a contribuir para a lesão, e finalmente, a destruição progressiva do parênquima renal, levando os néfrons a uma sobrecarga sobre a função glomerular e tubular. A medida que a TFG declina, ocorre um aumento da fração de excreção de sódio ($FENa^+$), no intuito de evitar uma excessiva retenção deste no LEC. Este controle ocorre às custas de uma pequena expansão do LEC e conseqüentemente da hipertensão, o que leva ao aumento de forças natriuréticas direcionadas aos néfrons remanescentes, resultando em elevação da $FENa^+$ (SLATOPOLSKY, 1968). Nesse sentido, o aumento da liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP) observado em modelos experimentais de DRC contribuem para a natriurese. Esse efeito resulta da ação direta do ANP, e possivelmente de outros peptídeos natriuréticos sobre os túbulos renais, bem como pela inibição da secreção de aldosterona (SOI; YEE, 2018).

Nesse contexto, o ajuste de sódio no organismo tem papel essencial na progressão do dano renal na DRC. Em condições normais, o sódio é mantido dentro de limites estreitos no meio interno, mesmo em quantidades extremamente altas ou baixas de sua ingestão (ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012). No entanto, quando o número total de néfrons encontram-se reduzidos, a margem de ingestão de sódio encontra-se estreitada, o que torna o paciente mais vulnerável aos distúrbios hidroeletrólíticos. Considerado níveis elevados de sódio na dieta ocidental, faz-se necessário reduzir a ingestão de sódio no intuito de evitar hipernatremia, com conseqüente aumento da hipertensão e agravamento da doença renal (YOON et al., 2018).

Considerando a diferença de sensibilidade ao sal observada em diferentes indivíduos, o modelo proposto por Lewis Dahl em 1961, permitiu separar animais que se tornavam hipertensos (sensíveis) e os que permaneciam normotensos (resistentes) frente a uma dieta hipersódica (DAHL, 1961). Achados no modelo experimental de hipertensão Dahl sal mostram que a sobrecarga de sódio na dieta leva a progressão da glomeruloesclerose com avanço da idade, o que constitui um elo entre DRC e excesso no consumo de sal a longo prazo (TAKIZAWA et al., 1997).

Entretanto, para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos inerentes à DRC, o modelo experimental de nefrectomia 5/6 (nx 5/6) ou modelo de rim remanescente representa uma ferramenta valiosa em laboratório. A redução da massa renal é atingida por infarto ou excisão cirúrgica de ambos os pólos, com remoção do rim contralateral. Essa técnica permite investigar a influência de fatores fisiológicos, farmacológicos e nutricionais sobre parâmetros funcionais e morfológicos na DRC. Neste modelo, observa-se que a hipertensão glomerular é um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento de lesão renal. Morfológicamente, observa-se a presença de glomeruloesclerose segmentar e focal progressiva, acompanhada pelo aumento da proteinúria e deterioração da função renal (KURJAL; VERNEROVÁ, 2008).

1.4 O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona na doença renal crônica (DRC)

O SRAA é conhecido por seu papel essencial nos sistemas cardíaco e renal: manutenção da pressão arterial e controle de fluidos e eletrólitos, como sódio e potássio. Sua ação tem início através da produção de renina pelo aparelho justaglomerular. Essa enzima proteolítica converte o angiotensinogênio em angiotensina I. Esta última é clivada em angiotensina II (AngII) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Em adição, a ECA promove a degradação de bradicinina, um potente vasodilador, por sua ação no sistema calicreína-cininas.

A AngII constitui o principal peptídeo efetor desta via, ligando-se aos receptores de angiotensina tipos 1 e 2 (AT₁R e AT₂R). A maioria dos efeitos biológicos do SRA é mediado pelo AT₁R, incluindo vasoconstrição, inibição da natriurese, secreção de aldosterona, crescimento e diferenciação celular (CAREY, 2016). Entretanto, um mecanismo de contraregulação é gerado pelo receptor AT₂, evocando efeitos vasodilatadores, natriuréticos e inibindo o crescimento e diferenciação celular. Em virtude a maior densidade de AT₁R em relação AT₂R, o SRA tem função direcionada à vasoconstrição e a retenção de sódio no organismo (CAREY; PADIA, 2017)

Apesar do vasto conhecimento em relação ao papel de AT₁R na hipertensão sal sensível e na DRC, pouco se sabe sobre AT₂R. A AngII e angiotensina III representam os dois agonistas endógenos de AT₂R, sendo o último considerado o principal ativador deste receptor (CAREY; PADIA, 2013).

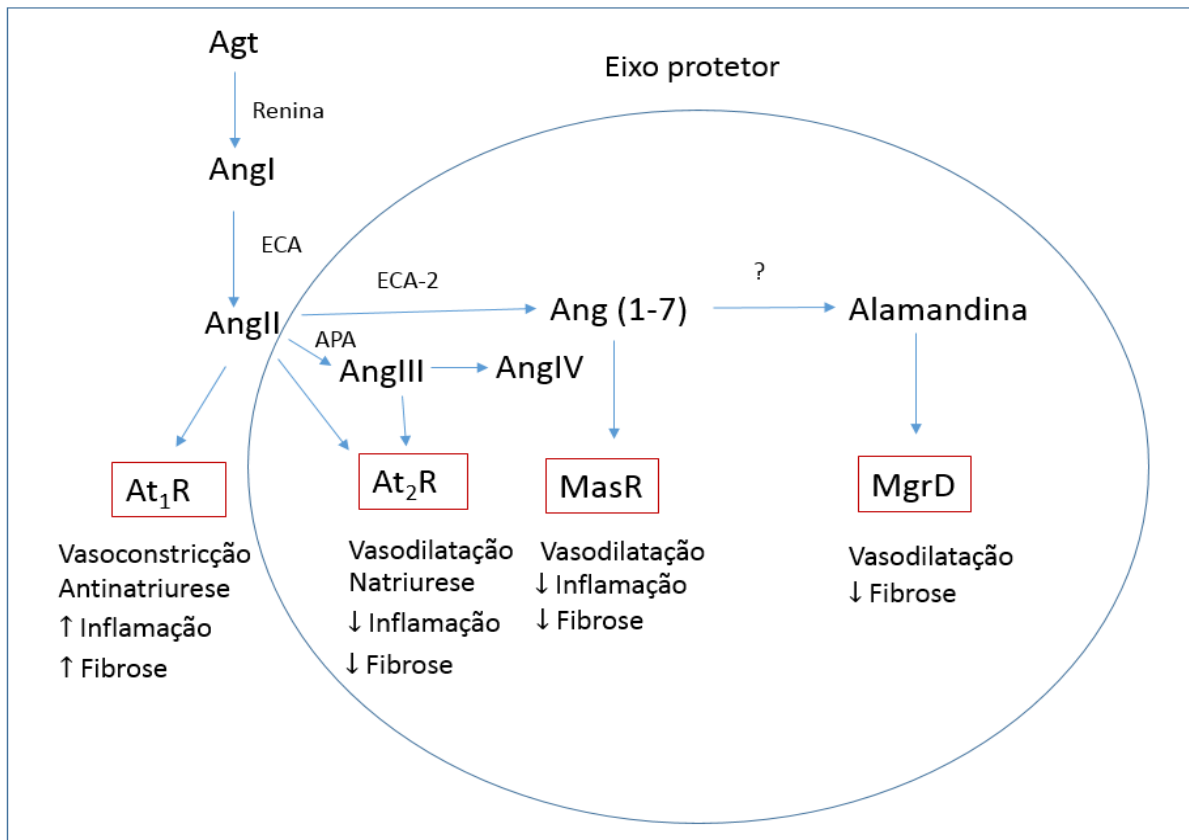
A presença de uma grande variedade de enzimas conversoras no SRA resulta na formação de peptídeos com diferentes potências e funções. Entre os mais estudados, a angiotensina 1-7 (Ang1-7) tem recebido atenção especial. Ang (1-7) é formada a partir da

formação da enzima conversora de angiotensina - 2 (ECA-2) em angiotensina 1-9 Ang(1-9), esta última, pela ação da ECA é convertida em Ang (1-7). Outra forma de produção de Ang (1-7) ocorre a partir das ações da ECA-2 ou policarboxipeptidase sobre AngII (PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA; SANTOS, 2013).

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

Por fim, a alamandina, um novo componente do SRAA, foi identificada utilizando-se espectrometria de massa (LAUTNER et al., 2013). Ensaio de reatividade vascular apontam para um efeito vasodilatador deste peptídeo, mediado pelo aumento da liberação de NO (VILLELA; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014). Ademais, foi observado efeito da alamandina na diminuição do remodelamento vascular (MENDONZA-TORRES et al., 2015) Como os níveis plasmáticos deste hormônio encontram-se elevados em pacientes com doença renal, sugere-se um efeito contrarregulador das ações predominantes da AngII (HERNAK; PAULIS; SIMKO, 2016). A Figura 2 mostra o SRA de acordo com conceitos recentes.

Figura 2. Vias clássica e alternativa do sistema renina-angiotensina



Descrição esquemática dos componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) e seus receptores à esquerda (área não circulada) está ilustrado a via da angiotensinaII/receptor AT_1 (AngII/ AT_1R), responsável pelas ações preponderantes do SRA. Na área circulada à direita, está determinada o eixo protetor do SRA, contra-regulando em parte os efeitos deletérios da via AngII/ AT_1R . O receptor AT_2 (AT_2R) é ativado pela AngII e AngIII, sendo este último peptídeo o agonista mais potente sobre AT_2 , evocando efeitos antinatriureticos. O receptor Mas (MasR) é ativado pela angiotensina 1-7 (Ang(1-7)), e o receptor MgrD é ativado pela alamandina, tendo estes dois receptores efeitos protetores a nível vascular e renal. Adaptado de CAREY, 2016

No âmbito da fisiologia e patologia renal, verifica-se um papel crucial do SRAA, em especial do hormônio AngII. Um aumento na resistência da microvasculatura glomerular é observado em resposta à ativação de AT_1 pela Ang II, o que altera a dinâmica do néfron, além de contribuir para o crescimento celular (BADER; GANTEN, 2008). Nos túbulos renais, esta interação hormônio-receptor modifica a atividade de diversos trocadores iônicos de membrana, incluindo o transportador Na^+/H^+ (NHE3), canais de sódio epiteliais (ENaC) e co-transportadores $Na^+K^+2Cl^-$ (NKCC2) e Na^+Cl^- (NaCC). Entre essas ações, destaca-se o aumento da reabsorção de Na^+ nos túbulos proximais e distais via NHE3. Adicionalmente, a Ang II promove liberação do hormônio mineralocorticoide aldosterona, que age no ductor coletor

umentando a atividade da Na^+/K^+ ATPase. Dessa forma, o transporte de Na^+ é alterado, acarretando em retenção deste íon no LEC (KOBORI et al., 2007; LI; ZHUO, 2008).

Com o avanço da biologia molecular, houve a possibilidade da clonagem e sequenciamento dos componentes do SRAA, permitindo aos cientistas o conhecimento de suas localizações no organismo. Assim, o conceito de via clássica expandiu-se, e hoje fala-se em SRAA teciduais, entre eles, destaca-se o intra-renal (RIGATTO; BOHLKE; IRIGOYEN, 2004). Há anos, muitas das ações órgão-alvo da hipertensão têm sido atribuídas à hiperatividade no SRAA.

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

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

Portanto, está claro que o excesso de Ang II na DRC tem papel central na hiperfiltração dos néfrons funcionantes, levando à hipertrofia e às alterações na estrutura do glomérulo que propiciam o surgimento de proteinúria. Assim como as ações hemodinâmicas, o papel pró-inflamatório e do estresse oxidativo, mediado pela ligação AngII sobre AT-1 a longo prazo, é tido como a principal via endócrina geradora e perpetuadora da DRC.

1.5 Detalhamento das ações tubulares da angiotensina II (Ang II)

No âmbito da fisiologia renal, a Ang II, principal hormônio efetor do SRAA, desempenha papel crucial na manutenção da pressão arterial, através de suas ações regulatórias sobre a água e o sódio. A AngII, juntamente com aldosterona, outro hormônio do SRAA, atua em diferentes porções dos túbulos renais promovendo aumento da reabsorção de sódio para o organismo. A atuação da Ang II sobre o feedback túbulo glomerular é considerada crucial no controle do balanço de sódio pelo rim (FERENBACH; BONVENTRE, 2016).

No rim, essas ações retentoras de sódio se dão pela ligação da AngII ao receptor AT_1R , em especial no túbulo proximal. Nessa região do néfron, ação da angiotensina II ocorre pela inibição do transporte de sódio através da internalização do trocador Na^+/H^+ (NHE3) na membrana apical e da bomba de Na^+/K^+ ATPase na membrana basolateral (PELUSO et al., 2017).

Ademais, a AngII desempenha funções no transporte de sódio no ramo ascendente espesso da alça de henle e nos túbulos coletores renais (FERENBACH; BONVENTRE, 2016). Entretanto, essas regiões são mais sensíveis pela ação do hormônio aldosterona, outro hormônio retentor de sódio do SRA liberado em resposta ação da Ang II sobre o córtex adrenal (ZATZ, 2010). Nos túbulos renais, a aldosterona promove ativação de receptores expressos na membrana apical de células tubulares, em especial no túbulo contorcido distal. Nesta porção a aldosterona aumenta a quantidade de canais de sódio epiteliais (ENaC) e estimula a atividade da Na^+/K^+ ATPase, resultando no aumento da reabsorção de sódio (KOBORI et al., 2007).

1.6 Papel nefroprotetor dos inibidores da ECA

As intervenções terapêuticas em portadores de DRC, especialmente nas fases iniciais, são usualmente eficazes no retardo da progressão das doenças e na redução das complicações relacionadas à uremia, de forma a melhorar a qualidade e expectativa de vida desses pacientes (LEVEY; CORESH, 2012). Entre os principais fármacos utilizados, os antagonistas do SRAA, representados pelos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs) pelos bloqueadores dos receptores de angiotensina II tipo 1 (BRAs). Existem ainda os inibidores diretos da renina (IDRs), que apresentam potencial efeito nefroprotetor, apesar da necessidade

de mais estudos que estabeleçam alguma vantagem sobre as duas primeiras classes (DANDAN, 2012).

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

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

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

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

1.7 Peptídeos natriuréticos e a via das guanilinas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Com relação a estrutura, potência e locais de ação a STa, GN e UGN apresentam algumas diferenças. Peptídeos STa e UGN possuem em suas sequências, resíduos de asparagina, o que conferem resistência a endoproteases presentes no rim. Enquanto isso, na GN, esses resíduos estão ausentes, tornando-a sensível à hidrólise por quimotripsinas nos túbulos renais, fato que justifica a ausência de guanilina na urina (FORTE et al., 1999). Outra característica está nas diferenças de ativação de GC-C dependentes de pH. Enquanto a GN provoca maior aumento de GMPc em pH 8,5, a UGN o faz em pH 5,5 (BASU; ARSHAD; VISWESWARIAH, 2010). GN e UGN são expressas inicialmente na forma de pré-pró-peptídeos, sendo posteriormente convertidos e armazenados na forma de pró-peptídeos inativos, denominados pró-GN, nas células caliciformes intestinais, e pró-UGN, nas células enterocromafins do intestino (LI et al., 1995; PERKINS; GOY; LI, 1997).

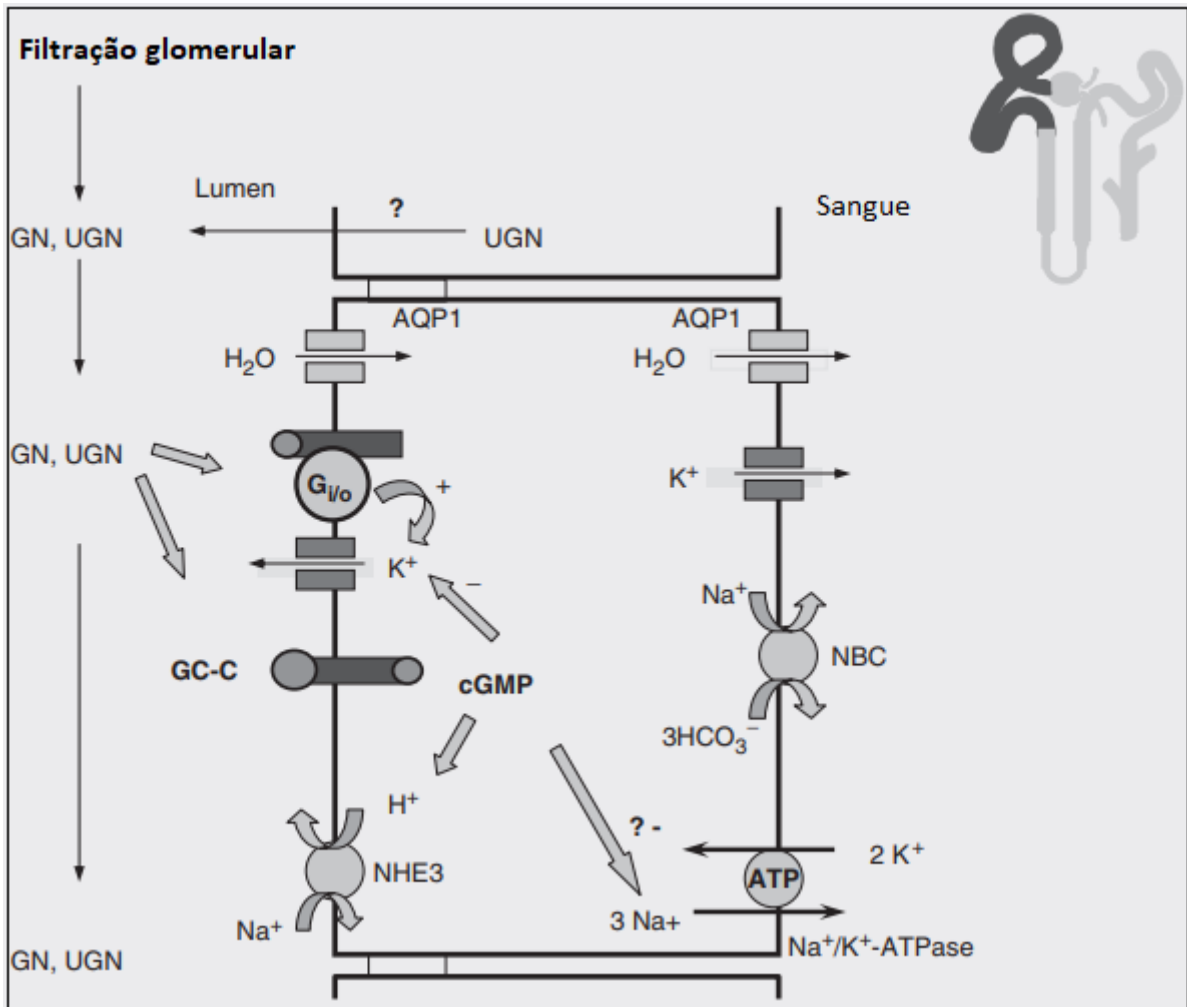
Entretanto, sabe-se que o rim é capaz de sintetizar peptídeos da família das guanilinas, destinados a uma parácrina nos túbulos renais. Uma evidência disso foi a detecção de RNAm para a UGN em amostras de rim total através da técnica de PCR em tempo real (POTTHAST et al., 2001). Outrossim, Qian e colaboradores (2011) demonstraram expressão de pro-UGN por Western Blotting. Surpreendentemente, foi observado em estudo recente que a ingestão de dieta hipersódica em ratos promoveu aumento da expressão intrarenal de UGN, mas não houve modificações nos níveis entéricos e plasmáticos deste hormônio (FELLNER; MOSS; GOY, 2016). Este achado reforça a grande importância da sinalização intra-renal da via das guanilinas no controle da homeostase hidrossalina.

A resposta natriurética à UGN se dá principalmente no túbulo proximal, conforme observado na figura 3 (LESSA et al., 2012). Atualmente, sabe-se que essa região tubular do

néfron é responsável pela reabsorção de cerca de dois terços do sódio filtrado para os capilares peritubulares. Essa ação ocorre graças ao trocador Na^+/H^+ (NHE-3) situado na membrana basolateral do túbulo proximal. O NHE-3 é o principal mecanismo de secreção de hidrogênio, que leva à reabsorção de bicarbonato no néfron (ZATZ, 2012).

Nesse sentido, foi sugerido que, no rim, mais precisamente nas membranas da borda em escova de células do túbulo proximal, ocorre a conversão proteolítica pró-UGN em UGN, que está presente em quantidades relativamente elevadas na urina (QIAN et al., 2008). Ainda no túbulo proximal, o aumento de GMPc resulta em redução na fosforilação da isoforma NH3 do permutador Na^+/H^+ (NHE3), elevando assim a excreção de sódio (LESSA et al., 2012). Outra ação da UGN nessa região do néfron ocorre através da inibição da bomba de Na^+/K^+ ATPase basolateral através de 3 mecanismos: GMPc/proteína quinase G, AMPc/proteína quinase A, e MTOR (BATISTA et al., 2016).

Figura 3: Ações gerais das guanilinas no túbulo proximal



Representação esquemática do papel das guanilinas no túbulo proximal. Guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) ativam a guanilato ciclase C (GC-C), o que leva a um aumento na concentração intracelular de GMPc, segundo mensageiro que inibe o canal de K^+ , o permutador Na^+/H^+ (NHE3) e a Na^+K^+ ATPase. Adicionalmente, a UGN ativa uma proteína G sensível à toxina pertusis, levando a ativação do canal de K^+ . Adaptado de Sindic e Schlatter (2006).

Ademais, sabe-se também que a UGN atua na redução da expressão da Na^+/K^+ ATPase, reduzindo o gradiente de sódio disponível para o transporte acoplado de sódio (CARRITHERS et al., 2004). Um papel importante em resposta às guanilinas na Na^+/K^+ ATPase foi detectado em uma linhagem de células de túbulo proximal humano, denominada IHKE-1 (SINDIC et al., 2002).

Por outro lado, diferente do túbulo proximal, um mecanismo GMPc independente parece ser o principal efeito da UGN nas células principais do ducto coletor. Através deste mecanismo, ocorre uma ativação de receptor acoplado a proteína G, com conseqüente ativação

de fosfolipase A2 (PLA2), que cliva o ácido aracdônico dos fosfolípídeos de membrana. Livre para agir, o ácido aracdônico inibe os canais ROMK das células principais, resultando em despolarização e conseqüente diminuição da força motriz para reabsorção de sódio (SINDIC, 2006).

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

Além dessas observações, é sabido que no âmbito da DRC o balanço hidroeletrolítico e o estado estacionário redox no rim são acompanhados por um intricado de vias de sinalizações ativadas tanto por peptídeos natriuréticos renais como pela AngII, representando, respectivamente forças natriuréticas e antinatriuréticas (MIKUSIC et al., 2014). Em virtude dessa constatação o estudo da interação entre estas duas vias constitui alvo do presente estudo.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A doença renal crônica (DRC) constitui um sério problema de saúde pública, com consequências negativas sobre a qualidade e a expectativa de vida da população, além de levar os países a altos gastos anualmente (HILL et al., 2016). Esta doença é silenciosa nas fases iniciais, e afeta diretamente os néfrons, através de lesões progressivas em todo o parênquima renal. Como consequência, o manejo de eletrólitos, especialmente o sódio, leva os túbulos a adaptações profundas no intuito de manter a homeostase (ZATZ; SEGURO; MALNIC, 2012).

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

Entre os PNs, destacam-se os hormônios sintetizados pelo coração, tendo como seu principal representante o peptídeo natriurético atrial (ANP) e os produzidos pelo intestino, denominados guanilina (GN) e uroguanilina (UGN). Adicionalmente, sabe-se que o próprio rim é capaz de sintetizar estes hormônios, sendo os principais a UGN, e urodilatina (UD), peptídeo renal com ações similares ao ANP (JORGE et al., 2018).

Estudos revelaram aumento nos níveis plasmáticos de ANP e UGN em pacientes submetidos à terapia dialítica prolongada, apesar da expansão do volume extracelular, sugerindo que as lesões túbulo-glomerulares afetariam os receptores para estes agonistas (FUKAE et al., 2000). Nesse sentido, a hipótese de que a melhora na injúria renal, obtida na prática clínica através dos supressores do SRAA, acarrete na modulação na resposta aos PNs tem sido considerada por alguns pesquisadores.

Em vista disso, este estudo propõe investigar uma possível modulação da via das guanilinas pela DRC e se o bloqueio do SRAA nesta condição, através da administração oral de enalapril, acarretará em melhora da resposta à UGN na técnica de microperfusão estacionária *in vivo*. Ademais, será estudado o comportamento tubular proximal frente as modificações fisiopatológicas induzidas pela DRC experimental

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel do hormônio uroguanilina na doença renal crônica experimental em resposta ao bloqueio do sistema-renina-angiotensina-aldosterona.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito do enalapril sobre os parâmetros bioquímicos de função renal em animais com doença renal crônica;
- Quantificar o estresse oxidativo na DRC e sua resposta no contexto do bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA);
- Determinar os níveis de GMPc urinário na DRC e sua resposta no contexto do bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA);
- Avaliar o efeito das alterações fisiopatológicas induzidas pela nefrectomia 5/6 sobre o túbulo proximal;
- Avaliar o efeito da uroguanilina sobre o túbulo proximal em animais submetidos à nefrectomia 5/6 tratados e não tratados com enalapril;
- Avaliar os níveis de expressão proteica da uroguanilina e do receptor GC-C no rim em resposta a nefrectomia 5/6 e em resposta ao tratamento com enalapril nesta condição;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

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

Os animais foram devidamente acondicionados em sala aclimatada à temperatura de 23° C, com estantes apropriadas e circulação de ar. Os animais permaneceram sob o ciclo claro-escuro de 12/12h com água e ração *ad libitum*, no Biotério Setorial do NPDM-UFC.

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

4.2 Indução da DRC

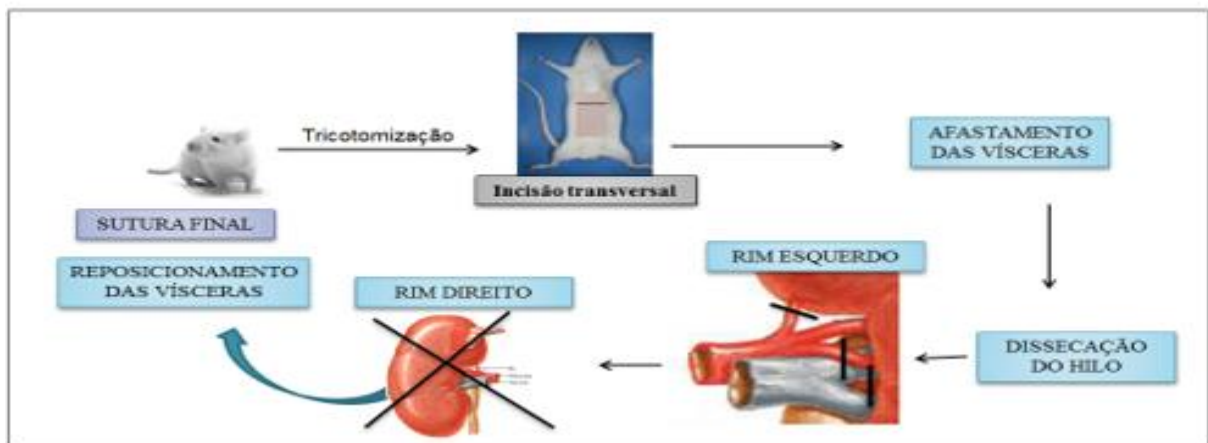
Para a indução da DRC, optou-se pelo modelo experimental de nefrectomia 5/6 descrito por Fujihara e colaboradores (2005). Um único procedimento cirúrgico realizou-se para a retirada de 5/6 da massa renal dos animais (o rim direito por inteiro e infarto de 2/3 do rim esquerdo).

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

Em seguida, as vísceras foram hidratadas com solução salina estéril e rebatidas para direita para exposição do rim direito, que foi descapsulado – para preservação da glândula suprarrenal – e removido após clampeamento do hilo renal com fio cirúrgico. As vísceras foram reposicionadas e a parede abdominal suturada, utilizando fio cirúrgico de Nylon 3.0. A Figura 4 demonstra as principais etapas do presente modelo experimental.

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

Figura 4. Etapas do modelo cirúrgico de nefrectomia 5/6 em ratos



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

4.3 Protocolo experimental

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

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

· **Grupo Nx 5/6 +E**, no qual animais foram submetidos a nefrectomia 5/6 e tratados com enalapril (10mg/kg) v.o. entre a 5^a e a 10^a semana após o procedimento cirúrgico, ao fim da qual foram sacrificados.

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

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

Figura 5. Desenho experimental dos grupos sem tratamento (SHAM e Nx)

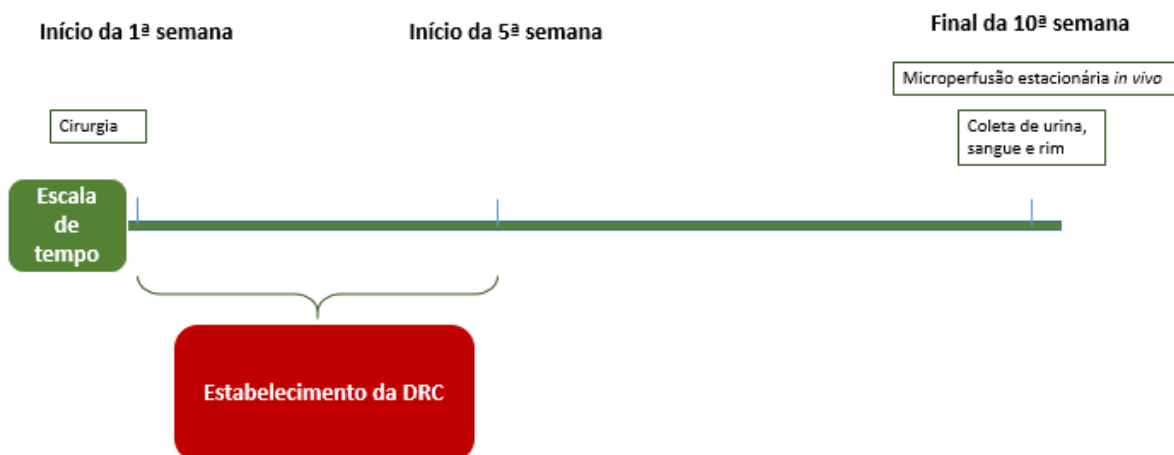
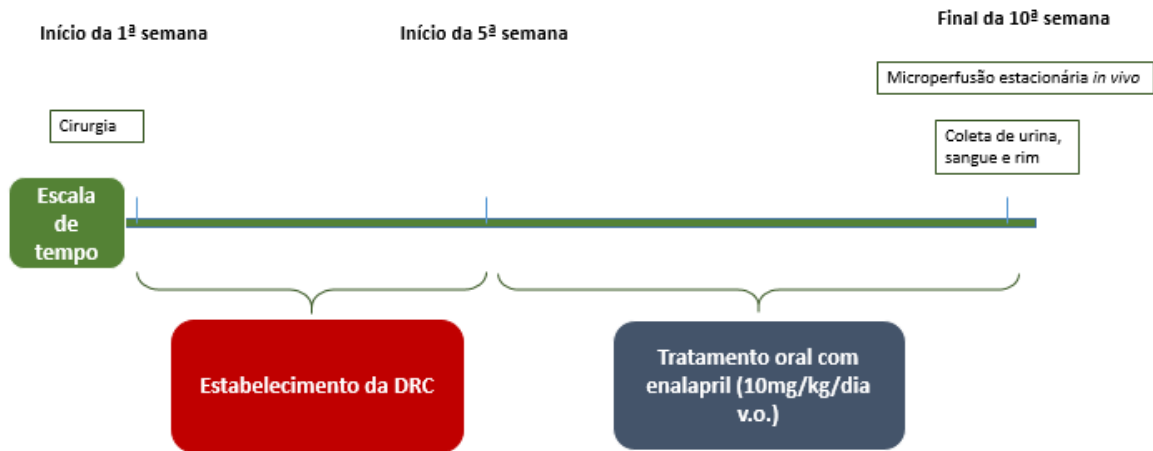


Figura 6. Desenho experimental dos grupos tratados com enalapril (SHAM+E e Nx+E)



4.4 Microperfusão estacionária in vivo

4.4.1 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg;i.p). Em seguida foram levados a uma cama cirúrgica aquecida a 37°C. Inicialmente foi realizada uma traqueostomia, com o intuito de facilitar a ventilação e, por conseguinte, evitar transtornos respiratórios. Logo após, a veia jugular esquerda foi identificada e canulada para infusão de uma solução de manitol a 3%, dissolvido em solução fisiológica (NaCl 0,9%) para manter o animal hidratado, com diurese levemente aumentada, e melhor visualização dos túbulos durante o experimento. Neste procedimento foi utilizada uma bomba de infusão contínua (Havard Apparatus, MA, USA), numa velocidade de 0,05 a 0,1 mL/min.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito. Foi realizada uma incisão para-lombar na parede abdominal e exposto o rim esquerdo. Foi removida a gordura perirrenal e em seguida o rim foi fixado em uma pequena câmara de acrílico e imobilizado por uma solução de gel de Agar a 5%, dissolvido em solução fisiológica. Uma pequena área da superfície renal, da região centro-lateral, foi mantida sem gel, com o intuito de permitir o acesso das micropipetas e do microeletrodo, manipulados com o auxílio de micromanipuladores (Leitz, Alemanha). Durante todo o experimento esta região foi banhada por solução fisiológica à 37°

C, com exceção dos momentos de calibração do microeletrodo, nos quais utilizamos soluções padrão específicas, porém também mantidas a 37°C.

A visualização dos túbulos na superfície do córtex renal foi realizada por meio de um microscópio estereoscópico (Olympus, Japão), com aumento de 40 a 100x, sendo o rim iluminado com cabos de fibra óptica acoplados a uma lâmpada halógena de baixa tensão. Foi posicionado uma hemicélula de Ag/AgCl na cavidade peritoneal do animal e acoplada a gaiola de Faraday. Dessa forma, o compartimento extracelular do animal foi utilizado como nível de referência das medidas elétricas realizadas.

4.4.2 Preparo das micropipetas

Capilares do tipo Theta foram utilizados (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) na preparação de micropipetas duplas, bem como capilares do tipo simples Thin Wall (WPI, Sarasota, FL, USA), com paredes finas e diâmetro de 0,8mm, para preparação de micropipetas simples.

Cada capilar foi alongado em estirador vertical (Sutter Instruments, CA, USA) e foi feito um bisel, com diâmetro de 12 a 15µm, na ponta das micropipetas no esmeril de um afiador de pipetas (Sutter Instruments, CA, USA). Um dos ramos da micropipeta dupla foi então preenchido por solução perfusora, com composição específica para cada tipo de experimento, como foi mencionado, a qual é corada com FDC-green 0,05% para facilitar a identificação dos segmentos perfundidos. O outro ramo foi preenchido com óleo de rícino corado com Sudan-black, utilizado para bloquear uma coluna de fluido perfusor na luz tubular. A micropipeta simples, por sua vez, foi utilizada para realizar experimentos pareados em um mesmo segmento de túbulo e para tanto foi preenchida com uma solução de mesma composição da solução controle, além da substância a ser estudada.

4.4.3 Preparo de microeletrodos

Nos experimentos para análise de pH e da atividade de NHE3, foram utilizados microeletrodos seletivos a hidrogênio, construídos com o uso de capilares duplos assimétricos (WPI, Sarasota, FL, USA), onde o ramo maior apresenta 1,6mm de diâmetro e o ramo menor 0,8mm. Inicialmente os capilares assimétricos foram estirados verticalmente (Sutter Instruments, CA, USA), de forma a obter-se uma ponta de aproximadamente 1,0 µm de diâmetro.

A seguir, para se efetuar a construção de microeletrodos seletivos a íons, é necessário que seja realizado um tratamento do interior do ramo do capilar que foi preenchido pela resina de troca iônica, processo denominado de “hidrofobização”. Este procedimento é necessário porque se o capilar é preenchido com um líquido de troca iônica, um canal hidratado persiste entre o líquido orgânico e a superfície do vidro. O processo de hidrofobização do ramo de maior diâmetro do eletrodo, que foi preenchido pela resina de troca iônica, é feito por uma silanização, que consiste na reação dos grupos hidroxila do vidro com o átomo de silício do composto orgânico volátil hexametildisilazano (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

Dessa forma, o ramo do capilar é exposto à vaporização deste composto por um período de 30 minutos, por meio de adição de 0,2mL de hexametildisilazano a uma câmara de vidro com 15cm de altura e 5cm de diâmetro, com tampa de rosca contendo uma vedação de borracha perfurada, adaptada para a fixação dos microeletrodos e para impedir o vazamento do composto. Este aparato foi então mantido em capela com exaustão durante o procedimento.

O próximo passo foi o preenchimento do ramo do microeletrodo, previamente silanizado, com uma pequena camada de 100-200 μ m de comprimento de resina de troca iônica sensível a hidrogênio (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). O preenchimento foi realizado com o auxílio de um capilar de vidro estirado manualmente em bico de Bunsen. Este procedimento é realizado pelo menos 24 horas antes do experimento propriamente dito, para que haja o preenchimento completo da ponta do eletrodo pela resina, que é um líquido bastante viscoso.

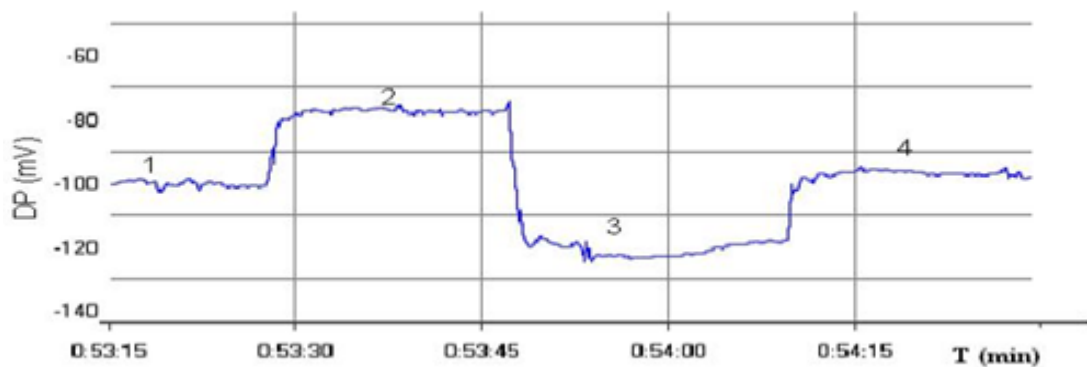
No momento do experimento o preenchimento deste ramo do eletrodo foi concluído utilizando-se uma solução condutora específica (130mM de NaCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 10mM de NaH₂PO₄, pH igual a 7,0). Já o ramo de menor diâmetro do microeletrodo foi preenchido no momento do experimento, com solução de referência, composta por 1M de KCl.

Foi introduzido, ainda no ramo de referência, um fio de prata de 0,5mm de espessura previamente cloretado. O processo de cloretação foi realizado mergulhando-se o fio de prata em uma solução de 0,2N de HCl e conectando-se esta solução ao pólo positivo de uma bateria de 9 volts. O pólo negativo da bateria foi conectado a extremidade do fio de prata também mergulhada em solução de HCl. O resultado deste procedimento é a deposição de íons AgCl (insolúvel) no fio de prata através da reação eletroquímica entre a solução e o fio. Este ramo do eletrodo apresenta uma resistência na ponta de aproximadamente 5m Ω e representa o ramo de referência, sendo utilizado para a medida da diferença de potencial transepitelial.

4.4.4 Calibração dos microeletrodos

O microeletrodo para a medida de pH intratubular, contendo resina de troca iônica sensível a H^+ , foi calibrado utilizando-se três soluções contendo 20mM de fosfato e 130mM de NaCl a 37°C, com valores de pH ajustados para 6,5; 7,0 e 7,8 com 0,1N de NaOH ou HCl. O microeletrodo foi mantido na superfície do rim e banhado com uma solução de cada vez. Cada valor de pH conhecido corresponderá a um valor de voltagem, medido pelo microeletrodo. A partir da realização da curva de calibração se obtém um valor de “slope” em milivolts para cada variação de 1 unidade de pH (Figura 7).

Figura 7 - Registro representativo da calibração de um microeletrodo sensível ao hidrogênio



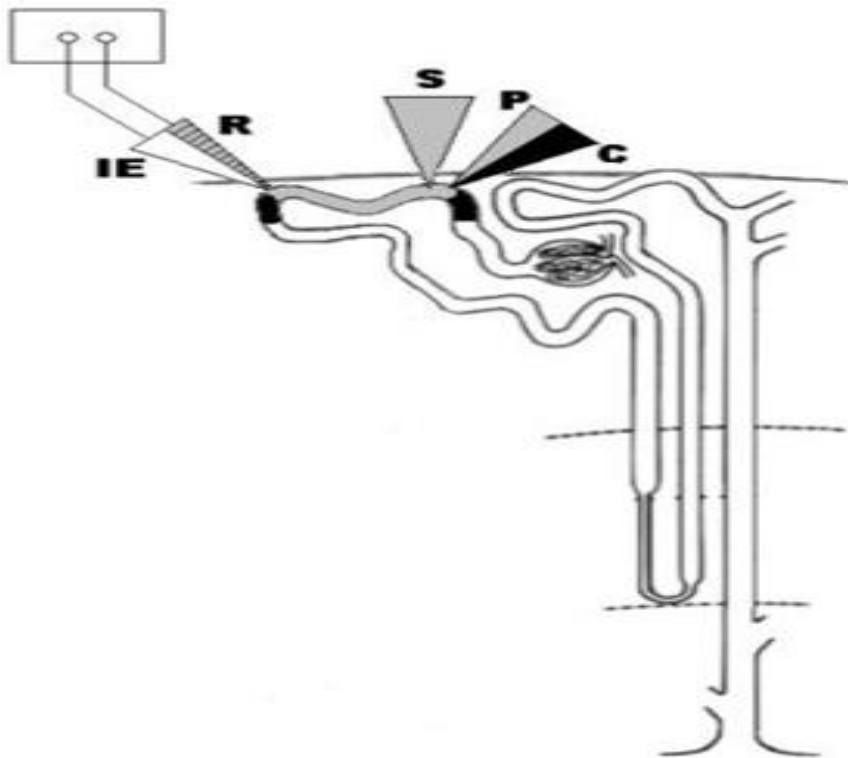
O traçado representa o potencial medido entre os ramos do eletrodo durante a perfusão do rim com soluções de pH conhecido. Em 1, potencial obtido na superfície renal; em 2, perfusão com solução de pH 6,32; em 3, perfusato com solução de pH 7,82; em 4, perfusão com solução de pH 6,99.

Experimentos realizados utilizando microeletrodos com resina sensível a H^+ demonstraram que estes eletrodos possuem uma resposta linear ao pH, na faixa de 4,5-11, com um “slope” próximo ao teórico, sendo 57,8 mV/unidpH o valor do “slope” experimental e 58,17mV/unidpH a 20°, o valor teórico. Estes estudos demonstraram ainda o alto grau de seletividade da resina de troca iônica sensível a H^+ , sendo comparada à seletividade da membrana de vidro com permeabilidade seletiva a H^+ (AMMANN et al., 1981). Em nossos experimentos, microeletrodos com valores de “slope” menores que 40 mV/unidpH foram descartados.

4.4.5 Estudo dos efeitos da uroguanilina sobre a atividade do permutador NHE3 in vivo em animais com doença renal crônica.

A avaliação da atividade do permutador NHE3 foi realizada através de experimentos utilizando o método de microperfusão estacionária “in vivo” (MALNIC; MELLO–AIRES, 1971), através do qual foi mensurado o fluxo de reabsorção de bicarbonato em segmentos de túbulos proximais, considerando que cerca de 80% deste transporte ocorre através do transportador NHE3. Com o auxílio de uma micropipeta dupla, um túbulo proximal foi puncionado. Um ramo da micropipeta foi utilizado para injetar solução de perfusão corada com verde–FDC (25 mM de NaHCO_3 , 100 mM de NaCl , 5 mM de KCl , 1 mM de CaCl_2 , 1,2 mM de MgSO_4). Em alguns experimentos foi adicionado à solução perfusora $1\ \mu\text{M}$ de uroguanilina (UGN). O outro ramo foi utilizado para injetar óleo de rícino corado com Sudan–black, necessário para bloquear as colunas de fluido injetadas no lúmen (Figura 8).

Figura 8 - Desenho esquemático do sistema experimental da técnica de microperfusão estacionária



Técnica de microperfusão em túbulos proximais: direita, pipeta de perfusão de dois ramos com P (solução de perfusão) e C (óleo de rícino); no meio, uma micropipeta adicional de um ramo (S) com solução experimental;

esquerda, microeletrodo de dois ramos com resina de troca iônica sensível a H^+ (IE) e solução de referência (Ref), introduzida em segmento proximal.

No mesmo néfron, reconhecido pela perfusão com solução corada, foi implantado um microeletrodo de dois ramos, assimétrico. Este microeletrodo foi usado para medir o pH intratubular. Após a calibração do eletrodo, foi iniciada a aquisição da diferença de potencial (DP) de curvas experimentais obtidas a partir da perfusão intratubular com solução perfusora inicialmente contendo 25 mM de HCO_3^- (pH0), de pH alcalino, que é reduzido até um valor estacionário da DP, correspondente ao nível mais ácido do pH luminal (Figura 9).

Figura 9 - Registro representativo de um experimento com microperfusão estacionária de túbulos renais



O traçado representa o potencial obtido pelo eletrodo durante a perfusão tubular com solução controle. Em 1, potencial que representa o pH tubular; em 2, perfusão com solução alcalina (25 mM de $NaHCO_3$); em 3, recuperação do pH; em 4, potencial que representa o pH estacionário ao final da perfusão.

O valor de pH obtido da maneira exposta acima foi utilizado para determinar a concentração de bicarbonato na solução, tal como demonstra a equação de Henderson–Hasselbalch, considerando a pCO_2 tubular igual à do sangue arterial (MELLO–AIRES et al., 1990; MALNIC, 1980).

A taxa de acidificação tubular foi expressa como a meia vida da redução da concentração de íon bicarbonato (HCO_3^-) ao nível estacionário ($t_{1/2}$). Admitindo que a acidificação da solução luminal ocorra de forma exponencial, o nível de reabsorção de HCO_3^- ($J_{HCO_3^-}$) foi calculado através da equação a seguir:

$$J_{\text{HCO}_3^-} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} (\text{HCO}_3^- - \text{HCO}_3^-) \cdot \frac{r}{2}$$

#

Onde $t_{1/2}$ é a meia vida da reabsorção de bicarbonato, r é o raio do túbulo, e $[\text{HCO}_3^-]_0$ e $[\text{HCO}_3^-]_S$ são as concentrações de HCO_3^- injetada e HCO_3^- a nível estacionário, respectivamente. Os fluxos de HCO_3^- assim obtidos foram dados por cm^2 de área de epitélio.

Em cada animal foram perfundidos de 1 a 4 túbulos proximais; desta maneira, o valor de “N” indicado para as médias obtidas corresponderá ao número de túbulos perfundidos.

A aquisição de dados foi feita a cada 0,5 s pelo sistema de aquisição de dados da Lynx, São Paulo, sendo os dados depois exportados para o Excel (Microsoft, USA). No Excel, a partir dos valores tubulares em mV e de calibração obtidos para cada eletrodo, os valores de pH, HCO_3^- , $t_{1/2}$ e $J_{\text{HCO}_3^-}$ foram calculados por um programa VisualBasic e os valores de $t_{1/2}$, $J_{\text{HCO}_3^-}$, HCO_3^- estacionário e pH estacionário foram analisados estatisticamente para determinar a significância das diferenças entre os grupos experimentais.

4.5 Avaliação de parâmetros gerais em gaiolas metabólicas

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

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

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

4.6 Análise da função renal

4.6.1 Procedimentos realizados nas amostras de sangue

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

4.6.2 Dosagem da creatinina sérica e urinária

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

4.6.3 Cálculo da Taxa de Filtração Glomerular

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

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

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

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

4.6.4 Dosagem de uréia sérica

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

4.6.5 Determinação de proteínas na urina

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

4.6.6 Cálculo da fração de excreção de sódio

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

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

4.7 Avaliação do estresse oxidativo no rim

4.7.1 Determinação da concentração de malonaldeído no tecido renal de ratos

Com o objetivo de confirmar o dano oxidativo direto no tecido renal, o grau de lipoperoxidação nos tecidos foi mesurado por meio da determinação dos níveis de MDA através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico TBARS, conforme o método de Ohkawa et al (1979). Foi feito homogenato dos tecidos renais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Retirou-se 250 μL do homogenato e, em seguida, foi adicionado 1,5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1% + 500 μL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Colocou-se em banho fervente (95-100 °C) por 45 minutos. A mistura foi resfriada em água corrente e, a seguir, foi adicionado 2 mL de n-butanol. O tubo foi agitado no vórtex por 1 min. e centrifugado a 1200rpm/15min. Após a centrifugação foi retirado a fase orgânica para realização da leitura em espectrofotômetro (520-535 nm). Os resultados foram expressos em nMols de malonaldeído (MDA) por mg de proteína. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método adaptado de Bradford (1976).

4.7.2 Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD) em tecido renal

A atividade da enzima SOD foi avaliada medindo-se a capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Nesse método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera O_2^- o qual reduz o NBT produzindo formazan, que absorve no comprimento de onda de 560nm segundo o método de Sun et al., (1988). Na presença de SOD

a redução do NBT é inibida, determinando que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%.

O homogenato (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (10 minutos, 3600 rpm a 4°C). O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para a realização do ensaio utilizou-se o sobrenadante. Em uma câmara escura foram misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8) 30 µL da amostra, 150µL do NBT 75µM e 300 µL de riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. A leitura foi feita espectrofotômetricamente em 560nm. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína.

4.8 Dosagem de GMPc na urina

A Guanidina 3'-5'-monofosfato cíclica (GMPc) foi descoberta em 1963 (ASHMAN et al., 1963) e está envolvida em inúmeros processos biológicos, como o efeito natriurético. Alguns hormônios, como acetilcolina, inulina e ocitocina, além de serotonina e histamina aumentam a concentração de GMPc. Peptídeos, como o ANP, que relaxam o músculo liso vascular também são responsáveis por elevação de GMPc.

As urinas provenientes dos rins isolados de rato foram utilizadas para determinação GMPc, sendo previamente diluídas (1:50) no tampão do Kit segundo as recomendações do fabricante (Sigma). O Kit utilizado foi imunoenensaio competitivo em microplacas de 96 poços, para a determinação quantitativa de GMPc. A dosagem consistiu na utilização de um anticorpo policlonal que se liga ao GMPc ou a fosfatase alcalina complexada ao GMPc (complexo presente no Kit) de maneira competitiva. As amostras ou padrões foram, então, incubados a temperatura ambiente e, em seguida, adicionado um substrato para a enzima fosfatase alcalina.

Após um breve período de incubação a reação foi parada com solução “stop” e a cor amarela formada foi lida em 405nm. A intensidade da cor formada foi inversamente proporcional a concentração do GMPc nas amostras. Os resultados foram calculados a partir da curva padrão dos controles e expressos em pmol/mL/g, compilados em intervalos de 30 minutos.

4.9 Análise estatística

Para análise estatística, todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através do programa GraphPad Prism utilizando análise de variância (ANOVA), pós- teste de Bonferroni para os parâmetros bioquímicos e pós teste de Tuckey para os dados provenientes da técnica de microperfusão estacionária *in vivo*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

5.RESULTADOS

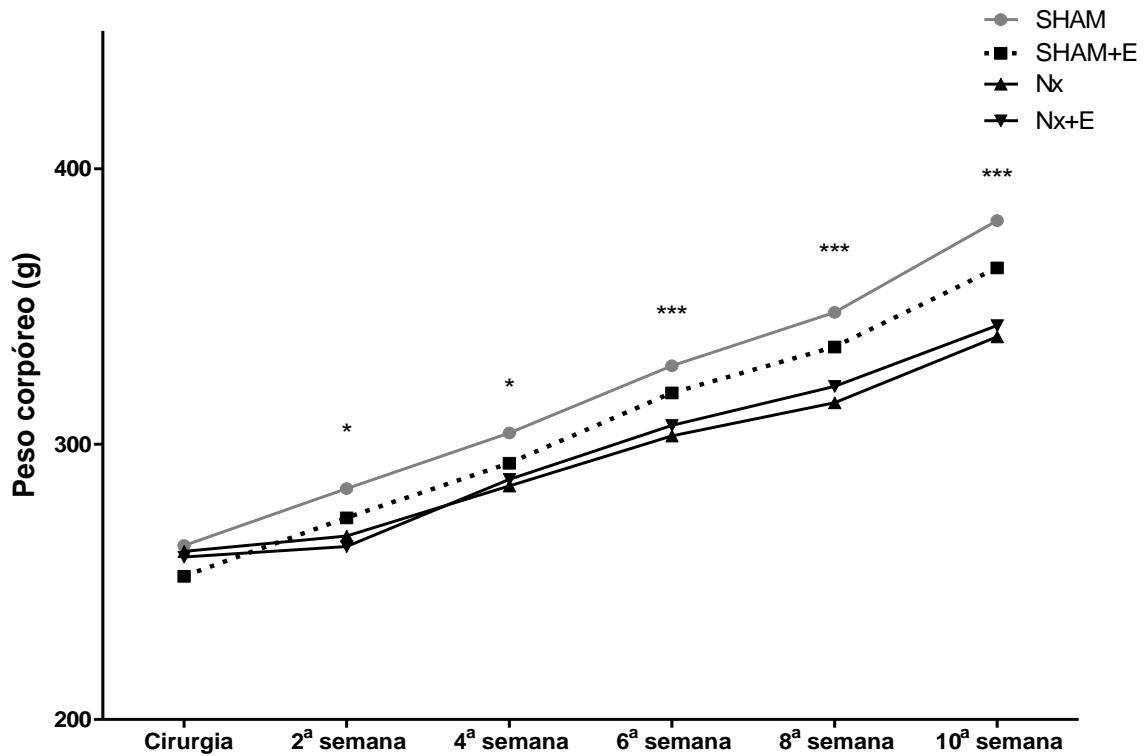
5.1 Taxa de sobrevida dos animais

Durante as 10 semanas do protocolo experimental, não foram verificadas mortes de nenhum animal nos grupos SHAM e SHAM+E. No grupo Nx, a sobrevida foi de 85% até a segunda semana e reduziu-se para 70% antes do fim da décima semana. No grupo Nx+E a sobrevida foi de 88% até a segunda semana, permanecendo neste valor ao fim das 10 semanas.

5.2 Peso corpóreo e renal

A nefrectomia 5/6 reduziu significativamente o peso dos animais da 2^a à 10^a semana após o procedimento cirúrgico. O tratamento com o enalapril não recuperou o peso dos animais nefrectomizados quando comparado ao grupo SHAM, conforme observado na figura 10.

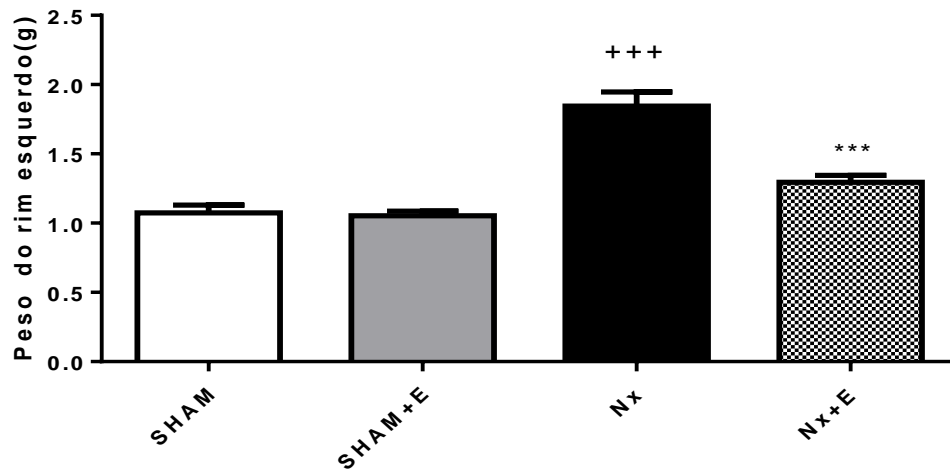
Figura 10: Curva de crescimento animal no decorrer do protocolo experimental



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

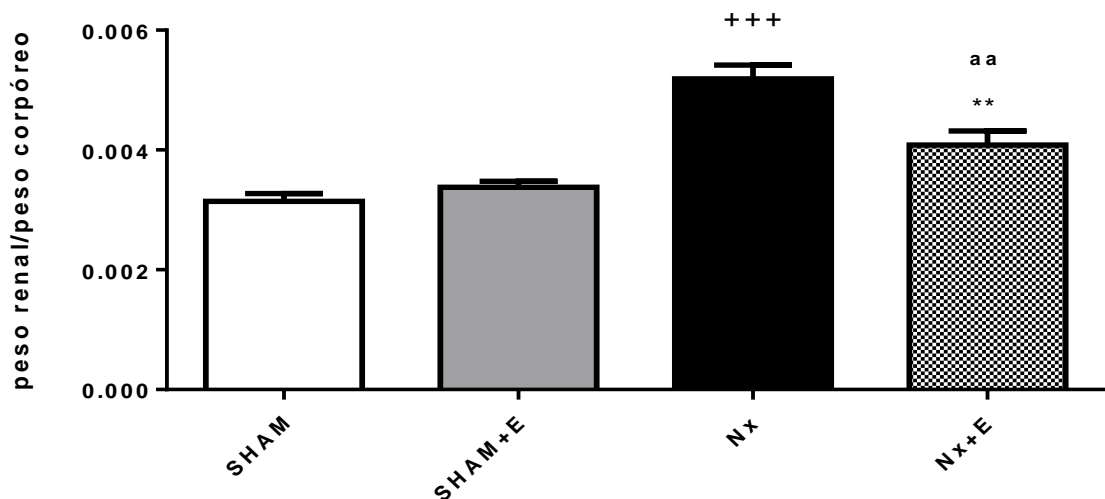
Após a determinação do peso do rim esquerdo de cada animal, foi observado que o grupo Nx apresentou maior massa em relação ao grupo SHAM, o que demonstra que a nefrectomia 5/6 foi eficaz em induzir hipertrofia e edema renal em resposta a sobrecarga dos néfrons remanescentes. O grupo Nx+E apresentou peso renal reduzido comparado a Nx, conforme demonstrado na figura 11. A figura 12 ilustra a razão do peso do rim esquerdo em função do peso corpóreo total dos animais ao final do protocolo experimental, o que reforça o ganho de massa renal.

Figura 11: Efeito do tratamento com enalapril no peso renal após a nefrectomia 5/6



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

Figura 12: Efeito do enalapril sobre a razão do peso renal pelo peso corpóreo dos animais 10 semanas após a nefrectomia 5/6



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

estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. As seguintes diferenças significativas foram determinadas: +++P<0,001 vs SHAM, **P<0,01 vs Nx; aaP<0,01 vs SHAM.

5.3 Determinação do volume urinário de 24 horas

Conforme expresso na tabela 1, não houve diferenças significativas no volume urinário dos animais nefrectomizados em relação ao grupo SHAM. O tratamento oral com enalapril em animais nefrectomizados também não resultou em alterações no volume urinário em relação ao grupo Nx.

Tabela 1: Efeito do enalapril no volume urinário em animais controles e nefrectomizados

	SHAM	SHAM + E	NX	NX + E
VOLUME URINÁRIO (mL/24h)	21,67 ± 3,8	23,81 ± 5,3	25,88 ± 6,9	20,98 ± 2,99

Os valores da figura expressam a média ± E.P.M do fluxo urinário em 24 horas em cada grupo. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

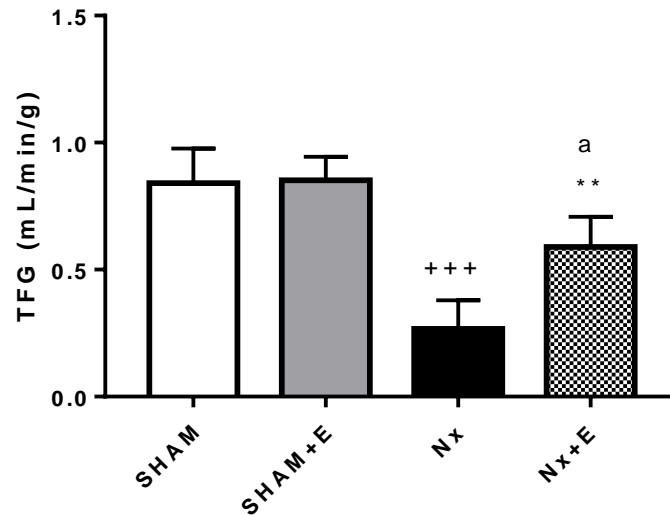
5.4 Avaliação de parâmetros de função renal

5.4.1 Função glomerular

No intuito de avaliar a função glomerular (tabela 2), foram determinados os níveis de creatinina no soro e na urina dos animais, com o intuito de estipular a taxa de filtração glomerular (TFG).

Foi observada uma acentuada queda na TFG induzida pela nefrectomia 5/6. A figura 13 mostra o enalapril atenuou a queda da TFG nos animais com doença renal. Dessa forma, o tratamento com enalapril representa uma alternativa eficaz para a melhora na dinâmica glomerular, retardando a progressão da doença.

Figura 13: Efeito do tratamento com enalapril na TFG em animais com DRC experimental

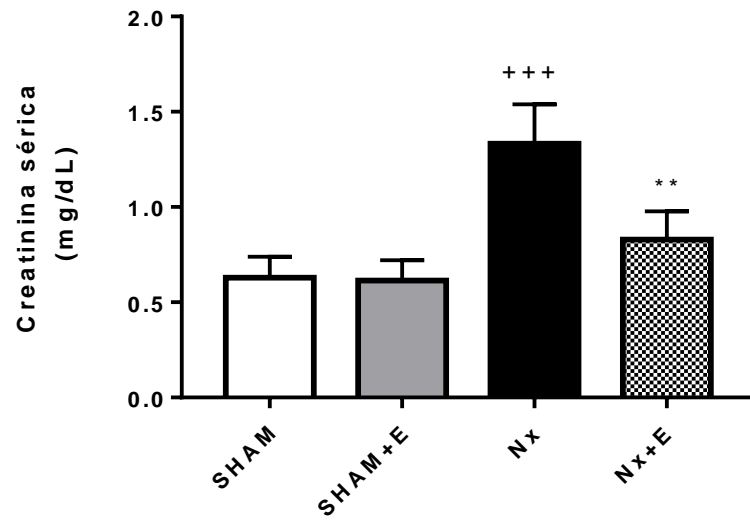


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da taxa de filtração glomerular (TFG) nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: Nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A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

O modelo experimental abordado neste estudo mostrou-se eficaz em induzir aumento significativo dos níveis de creatinina na circulação, o que corrobora com os resultados da DRC observados na clínica. O tratamento oral com enalapril atenuou os níveis elevados de creatinina em relação ao grupo lesado, conforme observado na figura 14.

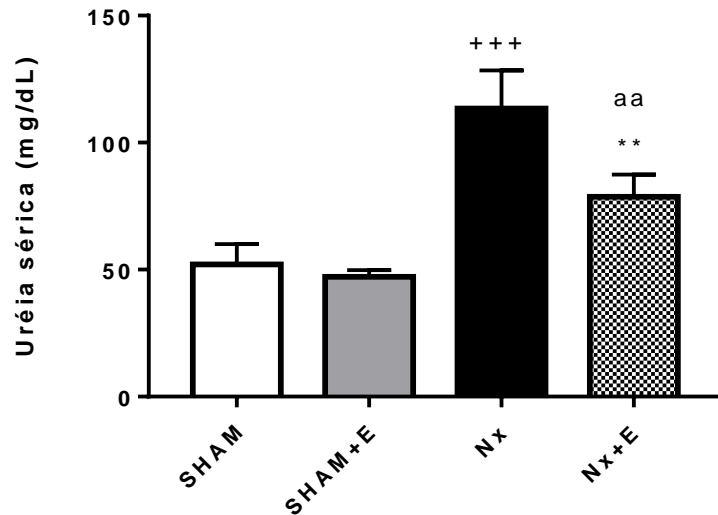
A nefrectomia 5/6 provocou um aumento significativo de uréia nos níveis séricos dos animais, reforçando o achado de uremia na DRC. O grupo tratado com enalapril apresentou menores níveis de uréia quando comparados ao grupo doente renal sem tratamento, conforme observado na figura 15.

Figura 14: Efeito do tratamento com enalapril nos níveis de creatinina sérica em animais com DRC experimental



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

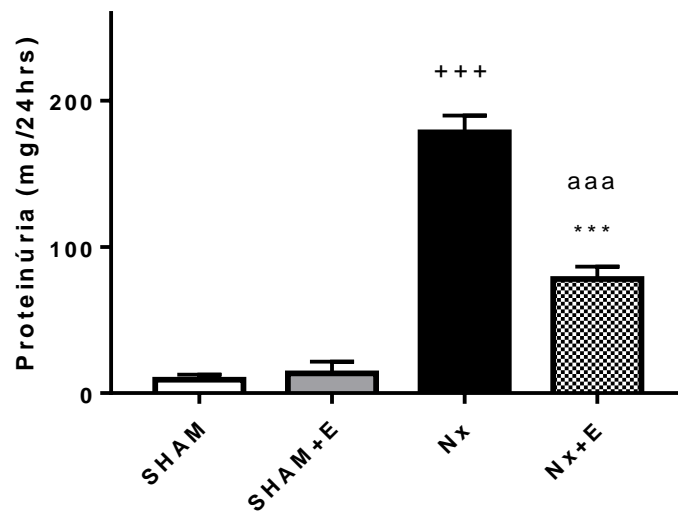
Figura 15: Níveis de uréia sérica em ratos submetidos à nefrectomia 5/6



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

Foi constatado um aumento acentuado dos níveis de proteínas na urina no grupo Nx em relação ao grupo SHAM, conforme observado na figura 16. Essa diferença reflete a injúria ocasionada nos componentes estruturais do glomerulo observada na progressão da DRC. Este estudo demonstrou uma expressiva reversão da proteinúria induzida pelo enalapril, reforçando o papel antiproteinúrico dos inibidores da ECA. A tabela 2 mostra os valores quantitativos dos parâmetros de função glomerular dos grupos em estudo.

Figura 16: Efeito do enalapril na proteinúria em animais submetidos a nefrectomia 5/6



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

Tabela 2: Parâmetros de função glomerular nos diferentes grupos experimentais

Parâmetros	SHAM	SHAM+ E	Nx	Nx+E
TFG (mL/min/g de rim)	0.84±0.07	0.86±0.02	0.25 ± 0.04 ⁺⁺⁺	0.60 ± 0.07 ^{**a}
Creatinina (mg/dL)	0.63±0.05	0.62±0.04	1.33±0.16 ⁺⁺⁺	0.83±0.08 ^{*aaa}
Uréia (mg/dL)	52.19±3.12	49.80±2.23	113.37±6.45 ⁺⁺⁺	78.71±4.08 ^{**}
Proteinúria (mg/24h)	9.22±1.02	13.60±1.89	178.54±20.1 ⁺⁺⁺	78.15±8.18 ^{***aaa}

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

5.4.2 Função tubular

A fração de excreção de sódio (FENa⁺) representa o percentual de sódio filtrado pelo glomérulo que não é reabsorvido a nível tubular. O grupo submetido a retirada de 5/6 da massa renal apresentou maior FENa⁺ em relação aos grupos SHAM e SHAM+E. Enquanto isso, o tratamento oral com enalapril no grupo nefrectomizado resultou em redução da FENa⁺ em relação ao Nx.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de sódio no soro dos animais dos diferentes grupos em estudo. A tabela 3 apresenta os valores dos parâmetros de sódio sérico e urinário, além da FENa⁺.

Tabela 3: Processamento do sódio nos diferentes grupos experimentais

Parâmetros	SHAM	SHAM+ E	Nx	Nx+E
FENa⁺	1.49 ±0.16	1.75±0.19	3.65±0.56 ⁺⁺	2.11±0.33 ^{* a}
Na⁺ sérico (µmol/mL)	139.46 ± 0.89	145.0±5.99	138.00±0.78	135.43±2.11
Na⁺ urinário (µmol/mL)	133.4±10.90	115.07±1.88	114.35±8.19	115.06±7.39

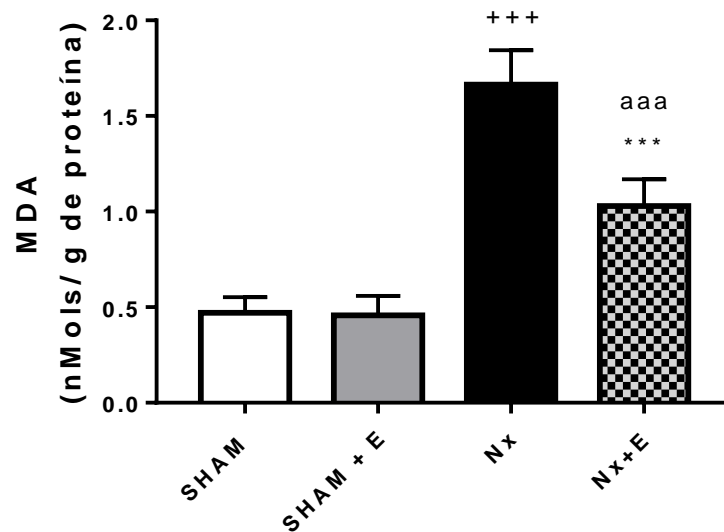
Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da fração de excreção de sódio (FENa⁺), sódio sérico e sódio urinário nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia 5/6 tratados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

5.5 Avaliação do estresse oxidativo em tecido renal

5.5.1 Quantificação de malonaldeído em tecido renal

O grupo nefrectomizado apresentou aumento significativo de MDA, refletindo disfunção altos níveis de peroxidação lipídica induzida pelo modelo de nefrectomia 5/6. Enquanto isso, o grupo nefrectomizado tratado com enalapril foi eficaz em reduzir os níveis de MDA induzidos pela DRC, conforme mostrado na figura 17.

Figura 17: Quantificação do molondealdeido em tecido renal

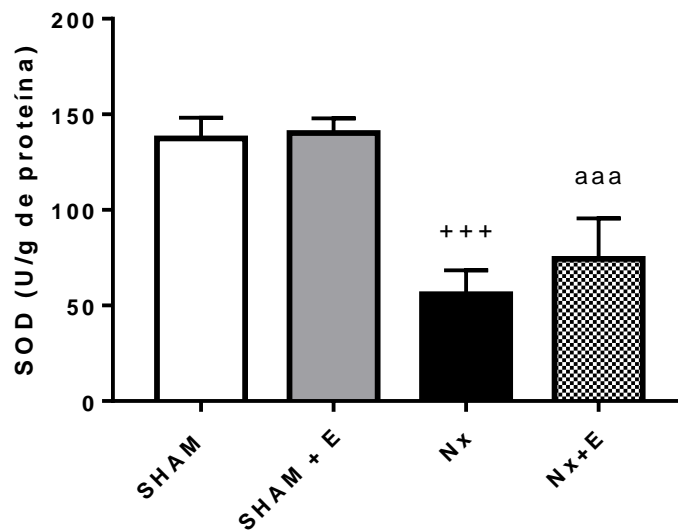


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M dos níveis renais de molondealdeido (MDA) nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.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

5.5.2 Avaliação da atividade da superóxido dismutase em tecido renal

Os grupos nefrectomizados tratado e não tratado com enalapril apresentaram queda significativa da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), indicando redução na defesa antioxidante induzida pela DRC. Não houve proteção por parte do enalapril neste parâmetro em relação ao grupo não tratado, conforme observado na figura 18.

Figura 18: Determinação da atividade da superóxido dismutase em tecido renal

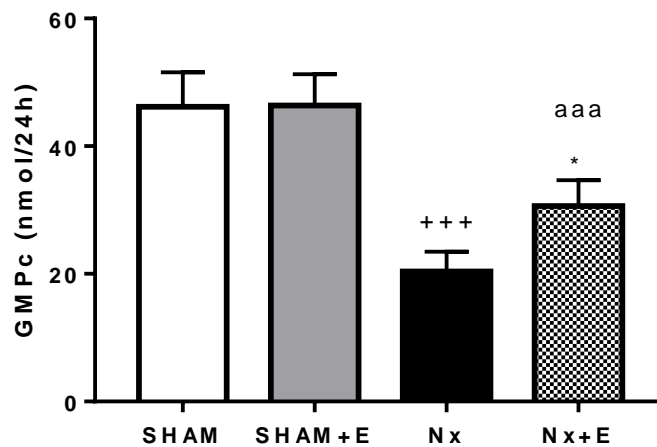


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da atividade da superóxido dismutase nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado; SHAM+E: controle operado tratado com enalapril (10mg/kg) v.o.; Nx: nefrectomia 5/6; Nx+E: nefrectomia5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. A análise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

5.6 Quantificação urinária de GMPc

Os níveis urinários de GMPc encontraram-se reduzidos dos animais com DRC, quando comparados ao grupo falso operado. O grupo com DRC tratado com enalapril apresentou valores de GMPc urinários elevados em relação ao grupo Nx, conforme observado na figura 19.

Figura 19: Quantificação de GMPc na urina



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

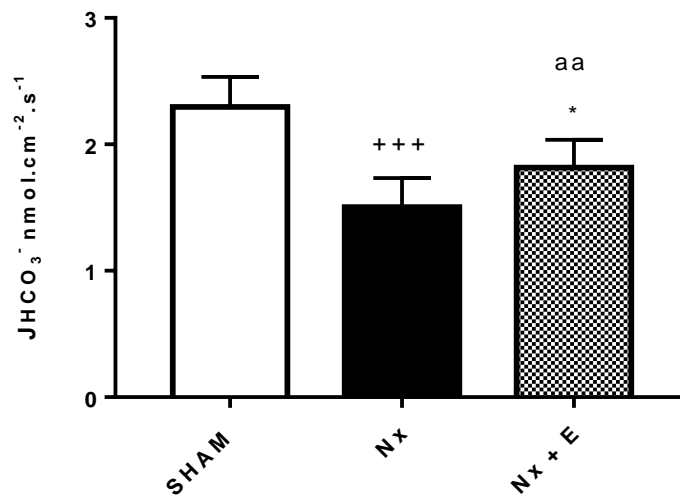
5.7 Avaliação do comportamento do túbulo proximal pela técnica de microperfusão estacionária

5.7.1 Efeito da DRC sobre o túbulo proximal

Através da realização dos experimentos de microperfusão estacionária *in vivo*, foi constatado uma redução do fluxo de reabsorção de bicarbonato (JHCO_3^-) nos animais submetidos à nefrectomia 5/6, quando comparado ao grupo controle conforme observado na figura 20. Além disso, observou-se que o enalapril atenuou a queda do JHCO_3^- induzida pela DRC.

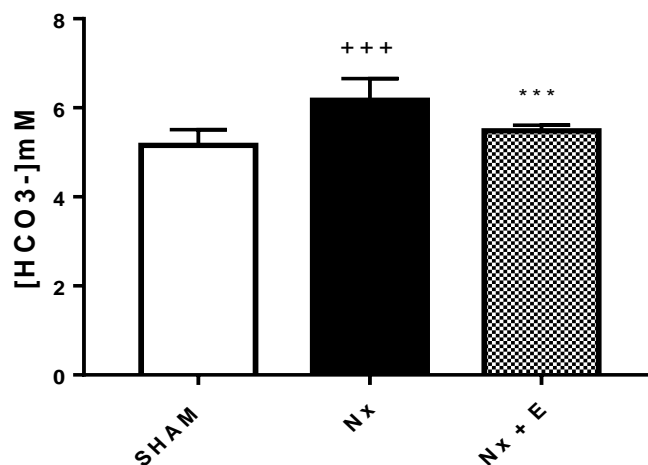
O bicarbonato estacionário [HCO_3^-], isto é, a concentração de bicarbonato no túbulo proximal, encontrou-se aumentada em relação ao grupo SHAM, conforme visto na figura 21. O grupo tratado com enalapril, por sua vez, apresentou [HCO_3^-] menor que o grupo nefrectomizado.

Figura 20: Efeito da DRC sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do fluxo de reabsorção de bicarbonato (JHCO₃⁻) nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado (n=9); Nx: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. (n=10). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos; Nx vs SHAM (+++P<0,001); Nx + E vs SHAM (aaP<0,01) Nx+E vs Nx (*P<0,05).

Figura 21: Efeito da DRC sobre o bicarbonato estacionário no túbulo proximal

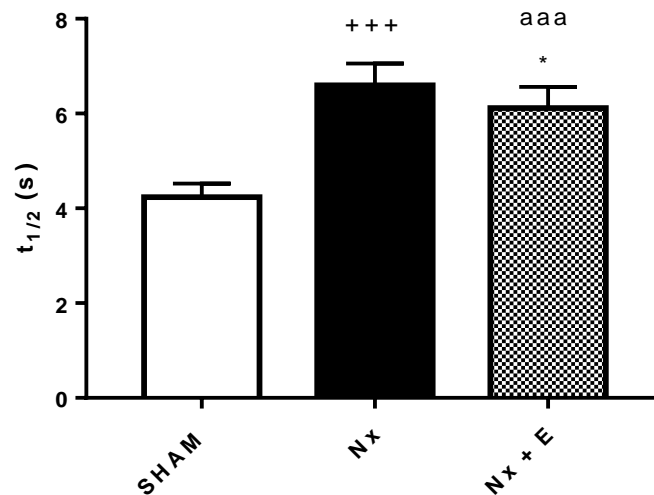


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do bicarbonato estacionário [HCO₃⁻] nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado (n=9); Nx: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. (n=10). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos; Nx vs SHAM (++P<0,01); Nx+E vs Nx (***P<0,001).

Outra variável avaliada neste estudo foi a meia-vida reacidificação tubular ($t_{1/2}$) no túbulo proximal. Nesse sentido, observou-se aumento do $t_{1/2}$ nos animais submetidos a nefrectomia 5/6. Paralelamente, o enalapril atenuou esse aumento induzido pela doença renal, conforme observado na figura 22.

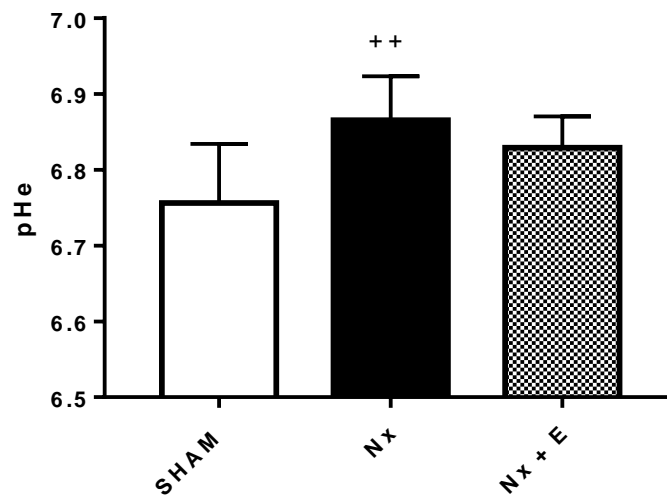
Por fim, foi calculado o potencial hidrogeniônico estacionário (pHe) intratubular no túbulo proximal (figura 23). O pHe foi maior no grupo Nx comparado ao grupo SHAM. Nenhuma outra diferença adicional foi encontrada.

Figura 22: Meia-vida de reacidificação tubular no túbulo proximal



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do tempo de meia-vida de reacidificação tubular ($t_{1/2}$) nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado (n=9); Nx: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. (n=10). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos; Nx vs SHAM (+++P<0,001); Nx+E vs SHAM (aaaP<0,001); Nx+E vs Nx (*P<0,05).

Figura 23: Potencial hidrogeniônico estacionário no túbulo proximal

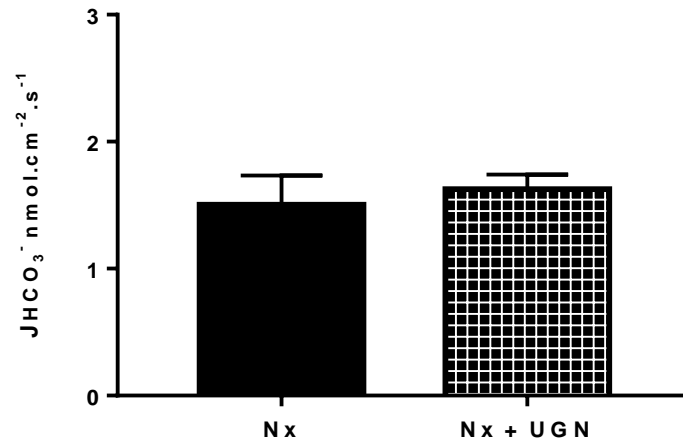


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do potencial hidrogeniônico estacionário (pHe) no túbulo proximal nos diferentes grupos experimentais. Grupos: SHAM: controle operado (n=9); Nx: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (10mg/kg) v.o. (n=10). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos; Nx vs SHAM ($^{++}P < 0,01$).

5.7.2 Efeito da infusão de uroguanilina no túbulo proximal de ratos com DRC

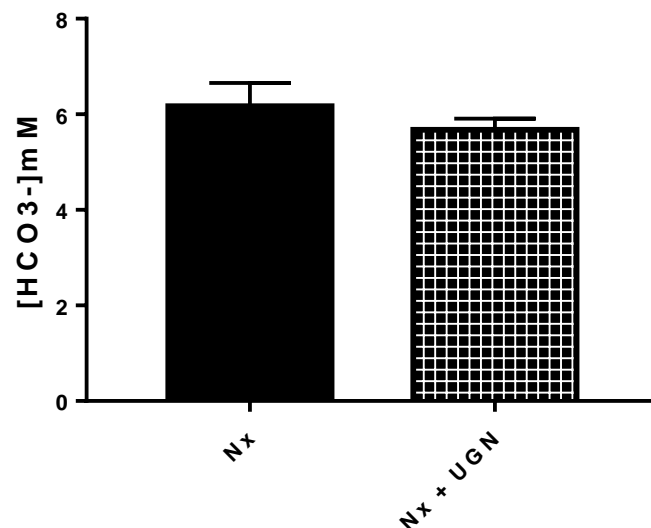
No presente estudo, foi observado que infusão de UGN no túbulo proximal de animais submetido à nefrectomia 5/6 não foi capaz de promover resposta em nenhum dos parâmetros avaliados na técnica de microperfusão estacionária *in vivo*, conforme verificado nas figuras 24 à 27.

Figura 24: Efeito da uroguanilina sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do fluxo de reabsorção de bicarbonato (JHCO₃⁻). Grupos: Nx: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+UGN: nefrectomia 5/6 com infusão de uroguanilina (1 μ M) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão (n=8). A análise estatística foi realizada por teste t de student. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

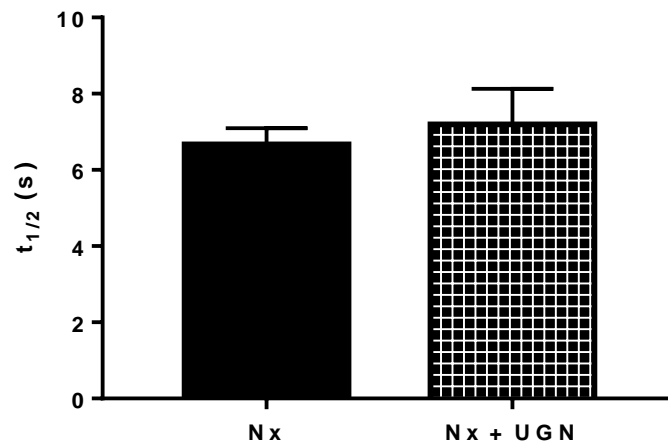
Figura 25: Efeito da uroguanilina sobre o bicarbonato estacionário [JHCO3-] no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do bicarbonato estacionário [JHCO₃⁻]. Grupos: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+UGN: nefrectomia 5/6 com infusão de uroguanilina (1 μ M) no túbulo proximal durante o experimento

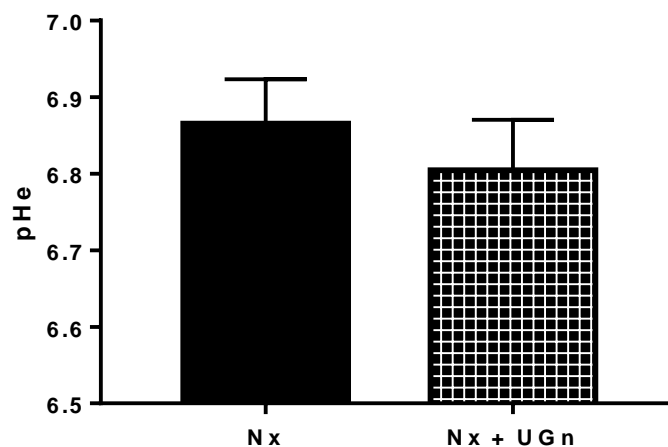
de microperfusão (n=8). A análise estatística foi realizada por teste t de student. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 26: Efeito da uroguanilina sobre a meia-vida de reacidação no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da meia-vida de reacidação tubular ($t_{1/2}$). Nx: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+UGN: nefrectomia 5/6 com infusão de uroguanilina ($1\mu\text{M}$) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão (n=8). A análise estatística foi realizada pelo teste t de student. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 27: Efeito da uroguanilina sobre o potencial hidrogeniônico estacionário no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6



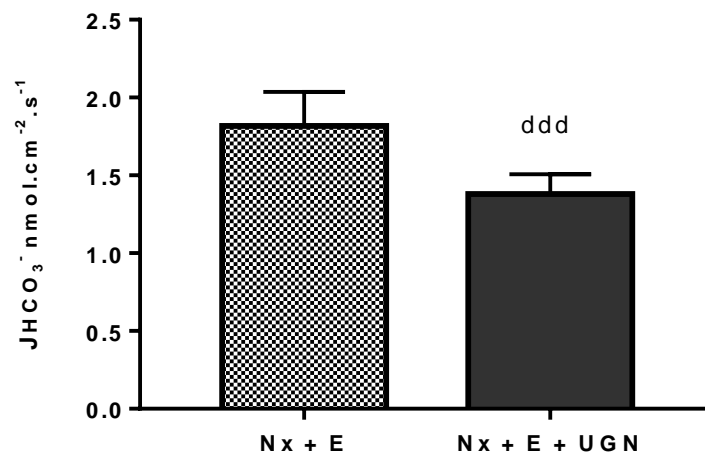
Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M potencial hidrogeniônico estacionário (pHe). Grupos: Nx: nefrectomia 5/6 (n=9); Nx+UGN: nefrectomia 5/6 com infusão de uroguanilina ($1\mu\text{M}$) no túbulo proximal durante

o experimento de microperfusão (n=8). A análise estatística foi realizada pelo teste t de student. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

5.7.3 Efeito da infusão de uroguanilina no túbulo proximal de ratos com DRC tratados com enalapril

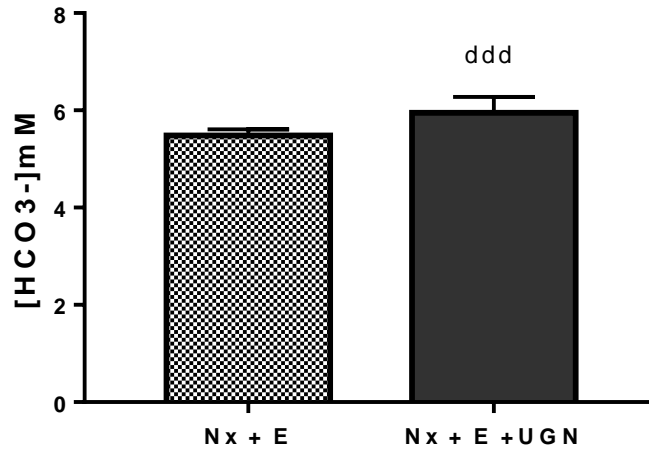
Ao contrário dos animais com DRC não tratados, os animais tratados com enalapril passam a responder à infusão de UGN no túbulo proximal. Dessa forma, o grupo Nx + E + UGN apresentou o fluxo de reabsorção de bicarbonato (JHCO_3^-) reduzido quando comparado ao grupo Nx + E, conforme observado na figura 28. Ademais, o bicarbonato estacionário ($[\text{JHCO}_3^-]$) foi aumentado no grupo Nx + E + UGN versus o grupo Nx + E (figura 29).

Figura 28: Efeito da uroguanilina sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do fluxo de reabsorção de bicarbonato (JHCO_3^-). Grupos: Nx + E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (n=10); Nx+ E + UGN: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril com infusão de uroguanilina (1 μ M) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão (n=7). A análise estatística foi realizada pelo teste t de student. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos: Nx + E + UGN vs Nx + E (^{ddd}P<0,001).

Figura 29: Efeito da uroguanilina sobre o bicarbonato estacionário no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril

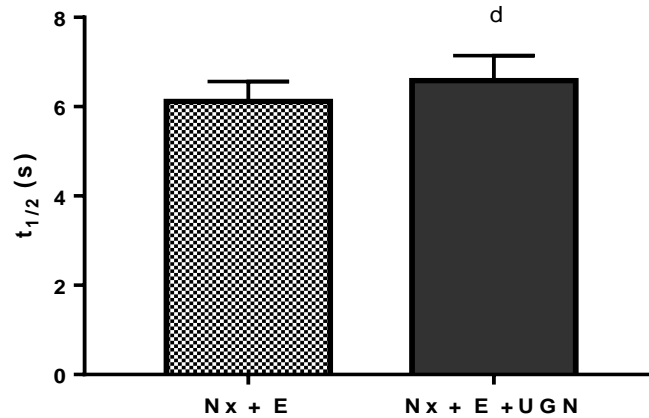


Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do bicarbonato estacionário $[HCO_3^-]$. Grupos: Nx + E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (n=10); Nx+ E + UGN: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril com infusão de uroguanilina (1 μ M) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão (n=7). A análise estatística foi realizada pelo teste t de student. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos: Nx + E + UGN vs Nx + E (^{ddd}P<0,001).

De acordo com a figura 30, não houveram diferenças estatísticas entre os dois grupos estudados. Por outro lado, verificou-se aumento do pH estacionário no grupo Nx + E + UGN quando comparado ao grupo Nx + E, conforme visto na figura 31.

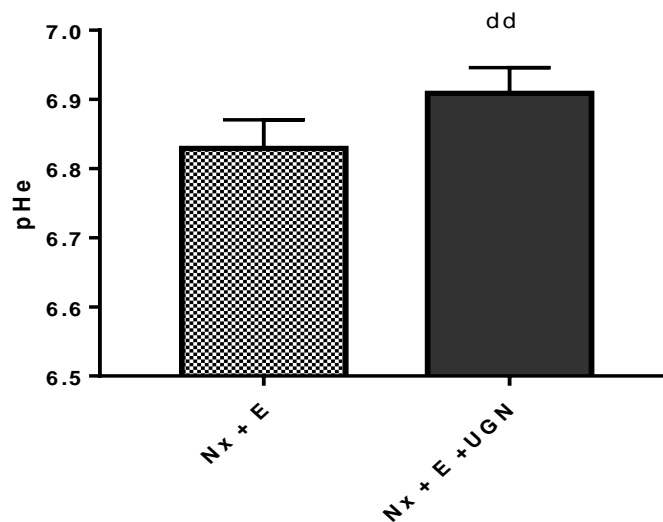
Finalmente, os valores numéricos de todos os grupos estudados na microperfusão estacionária encontram-se na tabela 4.

Figura 30: Efeito da uroguanilina sobre a meia-vida de reacidação no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M da meia-vida de reacidação tubular. Grupos: Nx + E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (n=10); Nx + E + UGN: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril com infusão de uroguanilina (1 μ M) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão (n=7). A análise estatística foi realizada por teste t de student. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 31: Efeito da uroguanilina sobre o potencial hidrogeniônico estacionário no túbulo proximal de ratos submetidos à nefrectomia 5/6 tratados com enalapril



Os valores da figura expressam a média \pm E.P.M do potencial hidrogeniônico estacionário [pHe]. Grupos: Nx + E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril (n=10); Nx + E + UGN: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril com infusão de uroguanilina (1 μ M) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão (n=7). A análise estatística foi

realizada por teste t de student. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos: Nx + E + UGN vs Nx + E (^{dd}P<0,01).

Tabela 4: Valores numéricos dos grupos estudados na técnica de microperfusão estacionária in vivo.

Parâmetros	SHAM	SHAM+UGN	Nx	Nx+UGN	Nx+E	Nx+E+UGN
JHCO₃⁻ (nmol.cm ⁻² .s ⁻¹)	2.30 ± 0.16	1.31 ± 0.15 ^{###}	1.50 ± 0.11 ⁺⁺⁺	1.63 ± 0.17	1.82 ± 0.20 ^{aa*}	1.38 ± 0.12 ^{ddd}
[JHCO₃⁻] mM	5.16 ± 0.14	5.93 ± 0.31 ^{###}	6.17 ± 0.21 ⁺⁺⁺	5.78 ± 0.10	5.49 ± 0.08 ^{***}	5.95 ± 0.13 ^{ddd}
t_{1/2} (s)	4.23 ± 0.18	7.54 ± 0.12 ^{###}	6.59 ± 0.29 ⁺⁺⁺	7.20 ± 0.39	6.12 ± 0.33 ^{aaa*}	6.58 ± 0.19 ^d
pHe	6.76 ± 0.10	6.90 ± 0.05 ^{###}	6.87 ± 0.06 ⁺⁺	6.80 ± 0.07	6.83 ± 0.05 ⁺⁺	6.91 ± 0.05 ^{dd}

Os valores da figura expressam a média ± E.P.M do fluxo de reabsorção de bicarbonato (JHCO₃⁻), bicarbonato estacionário ([JHCO₃⁻]), meia-vida de reacidificação tubular (t_{1/2}) e potencial hidrogeniônico estacionário (pHe). Grupos: SHAM: controle operado; Nx: nefrectomia 5/6; Nx + UGN: nefrectomia 5/6 com infusão de uroguanilina (10⁻⁵ Mm) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão; Nx + E: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril; Nx+ E + UGN: nefrectomia 5/6 tratado com enalapril com infusão de uroguanilina (1µM) no túbulo proximal durante o experimento de microperfusão. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos: SHAM+UGN vs SHAM (^{###}P<0,001) Nx vs SHAM (⁺⁺P<0,01, ⁺⁺⁺P<0,001); Nx+E vs Nx (^{*}P<0,05, ^{***}P<0,001); Nx+E vs SHAM (^{aa}P<0,01, ^{aaa}P<0,001); Nx+E+UGN vs Nx+UGN (^dP<0,05, ^{dd}P<0,01, ^{ddd}P<0,001).

6 DISCUSSÃO

A doença renal crônica (DRC) evolui normalmente de forma lenta até atingir a fase terminal, quando há perda significativa das funções do rim. A capacidade de reserva renal torna o rim apto a manter a homeostase por longos períodos, apesar da progressão da doença. Contudo, o rim “paga um preço” no intuito de garantir tal margem adaptativa, através de um mecanismo conhecido por “trade-off” (troca ou barganha). Dessa forma, os rins ajustam-se de forma eficiente à perda crônica de néfrons (TAAL; BRENNER, 2012).

No intuito de estudar a fisiopatologia e farmacologia relacionada à DRC, o modelo cirúrgico de nefrectomia 5/6 (nx 5/6) tem sido o mais utilizado na literatura, já que simula os mecanismos de “trade-off” renal comuns às espécies de seres humanos e em roedores. A técnica de infarto aqui utilizada mostra-se superior em relação à técnica de ressecção dos polos renais seguida por eletrocauterização (MA; FOGO, 2003). Tal fato é evidenciado por uma ativação mais eficaz do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) quando se opta pelo modelo de infarto (EDDY et al., 2012). Hirose e colaboradores (2010), em um estudo com animais submetidos à nx 5/6, através bloqueio de ramos da artéria renal, observou aumento dos receptores de renina no rim remanescente, reforçando o papel desta via na DRC. Sabe-se que hiperatividade simpática, evidenciada pelo aumento nos níveis sanguíneos de hormônios do SRAA, constitui um fenômeno intrínseco à fisiopatologia da DRC (SLEE, 2012).

Respostas hemodinâmicas glomerulares à perda de néfrons são observadas tanto neste modelo de ablação renal em ratos como na doença em humanos (GHOSH et al., 2009). Estudos mostram um aumento de 50% na taxa de filtração glomerular (TFG) de um único néfron após 8 dias da cirurgia. Esta adaptação se consolida após cerca de 16 dias decorrentes da nx 5/6, quando há um aumento de 300% na filtração em cada néfron remanescente (TAAL; BRENNER, 2012).

Este aumento no trabalho dos néfrons é proveniente de alterações adaptativas nas resistências das arteríolas aferente e eferentes, resultando em elevação da pressão hidráulica no capilar glomerular (P_{CG}). Mediadores desse processo de ajuste do rim à redução no número de néfrons incluem angiotensina II (AngII), endotelinas, eicosanoides, óxido nítrico e peptídeos natriuréticos (VEJAKAMA et al., 2017).

Apesar da ação positiva desses componentes no que concerne o aumento compensatório da filtração de cada néfron remanescente, há um “preço” que o rim deve pagar no intuito de manter suas funções homeostáticas normais: o da hipertensão intraglomerular, da hipertrofia e da ativação do processo inflamatório e do aumento do estresse oxidativo no rim

(HOSTETTER, 1995). Algumas evidências experimentais sugerem que um aumento na tensão na parede glomerular, devido ao aumento de P_{CG} , pode ser prejudicial às três camadas presentes no glomérulo: endotélio, membrana basal e podócitos (CORTES et al., 1996). Esse estresse constante promove a glomeruloesclerose, em virtude da ativação contínua do processo inflamatório (AKINLOYE, 2018). Nesse sentido, constatou-se em estudo histopatológico prévio de nosso grupo de pesquisa uma indução significativa de glomeruloesclerose após 10 semanas decorridas da nx 5/6 (COSTA, 2015).

Além das modificações na dinâmica glomerular, algumas alterações são observadas também na função tubular. Esse processo adaptativo é responsável por manter constante os níveis sanguíneos de eletrólitos, como o sódio e o potássio, e é ainda mais drástico quando comparado ao que ocorre ao nível glomerular. A região tubular mais afetada morfológica e funcionalmente constituiu o túbulo proximal. Em resposta à ablação renal, observou-se uma elevação em 17% no diâmetro luminal e 35% no comprimento dessa região do túbulo, estando esse processo relacionado aos danos à região túbulo-intersticial do néfron (HAYSLETT; KASHGARIAN; EPSTEIN, 1968).

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

Quanto ao fármaco utilizado, escolheu-se o maleato de enalapril para o estudo da modulação do SRAA. Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), ao contrário dos antagonistas dos receptores de angiotensina II, não são fotossensíveis, e apresentam maior estabilidade em água, tornando-os mais adequados para um tratamento prolongado, o que justifica sua escolha no presente trabalho. Ademais, o enalapril, dentre os IECA, constitui um pró-fármaco hidrolisado por esterases no fígado, produzindo um ácido dicarboxílico ativo, o enalaprilate, um inibitor altamente potente da ECA. O enalaprilate apresenta também uma meia-vida de eliminação mais prolongada do que a maioria dos fármacos desta classe (DANDAN, 2012).

No presente estudo, observou-se durante o decorrer do protocolo experimental, redução do peso corpóreo induzido pela nefrectomia. Este resultado está de acordo com o encontrado por Li e colaboradores (2012), onde a nx5/6 provocou uma queda na massa corpórea em todas as semanas analisadas após a cirurgia.

Foi verificado também aumento do peso do rim nos animais Nx em relação ao SHAM, o que caracteriza uma hipertrofia renal em resposta à sobrecarga imposta aos néfrons no período

de 10 semanas. Este achado pode estar relacionado à presença de acentuada inflamação dos néfrons remanescentes descritos em alguns estudos com nx 5/6 (FLECK et al., 2006). A chamada hipertrofia renal, inclui tanto a hiperplasia (aumento no número de células) e a própria hipertrofia (aumento no volume celular) em resposta ao processo inflamatório (FOGO, 2003). Nesse sentido, o tratamento com enalapril atenuou o aumento do peso renal, conforme visto no grupo Nx+E, o que reforça o papel do enalapril como fármaco nefroprotetor (RUIZ-ORTEGA et al., 1995).

Em relação à função glomerular aqui estudada, observou-se uma redução em 70,9 % na TFG nos animais do grupo Nx comparado ao SHAM. Essa escala na queda na função renal se aproxima à encontrada em estudos prévios, onde a função renal também foi avaliada 10 semanas decorridas da ablação de 5/6 da massa renal (KUNCOVÁ et al., 2009; COSTA, 2015)

Vários estudos que utilizaram modelos de ablação de massa renal têm demonstrado que os néfrons remanescentes são capazes de aumentar suas filtrações glomerulares individuais em virtude das alterações adaptativas, como o aumento do fluxo sanguíneo glomerular. Apesar deste fato, está claro que o aumento da P_{CG} leva à lesão da parede capilar glomerular, ocasionando inflamação, disfunção endotelial e estresse oxidativo, com consequente perda de néfrons e queda global da TFG. Todos esses efeitos são intensificados pelas ações da angiotensina II (Ang II) na hemodinâmica renal e no remodelamento vascular (SNIVELY et al., 2004).

Neste estudo, o tratamento oral com enalapril na dose de 10 mg/kg/dia mostrou-se eficaz em atenuar a queda da TFG induzida pela ablação cirúrgica de massa renal. Este fármaco age reduzindo a formação de AngII, ao inibir a ECA. Atualmente, sabe-se que a Ang II constitui um hormônio central na progressão da DRC. As ações deste peptídeo acarretam injúria ao rim, tanto de etiologia hemodinâmica, ao contribuir para o aumento de P_{CG} , como não hemodinâmica, aumentando a proteinúria, ativando o processo inflamatório, acentuando o stress oxidativo e elevando os níveis de aldosterona, o que contribui para a retenção de sódio (VEJAKAMA et al., 2017). Em virtude da elucidação destes mecanismos, o tratamento com inibidores do SRAA constitui atualmente a estratégia terapêutica padrão ouro no controle do avanço da perda de função renal na DRC.

Semelhante ao ocorrido com a creatinina, o grupo Nx apresentou níveis séricos de uréia elevados em relação ao SHAM. Nesse sentido, a queda da TFG induzida pela nx 5/6 constitui um fator determinante para a retenção dessas excretas. Além dessa observação, o enalapril mostrou-se eficaz em reduzir significativamente os níveis de uréia sérica. Este achado está de acordo com a reversão dos níveis de uréia por parte do enalapril no modelo de nx 5/6 observado por Ghosh e colaboradores (2012).

A sobrecarga imposta aos néfrons remanescentes em resposta à nx5/6, através da hipertensão glomerular, conhecida por causar alterações morfológicas e funcionais em componentes da barreira de filtração, provocou aumento intenso de proteinúria em relação ao SHAM. Este resultado corrobora com a proteinúria encontrada por Li e colaboradores (2012). Estudos têm descrito que essas alterações levam a uma elevação da filtração de proteínas plasmáticas de médio e alto peso molecular, ocasionada pelo aumento no tamanho de poros não seletivos (FRANCO et al., 1998). Além de inicialmente ser consequência da DRC, a proteinúria é capaz de contribuir para a queda da TFG nessa patologia. O excesso de proteínas filtradas leva a uma toxicidade glomerular e tubular, acentuando a lesão nestes locais (FRANCO et al., 1998).

No presente estudo, verificou-se que o tratamento oral com enalapril reduziu significativamente os níveis de proteinúria causada pela nefrectomia 5/6. Um estudo prospectivo em ratos, demonstrou que, dependendo da extensão da lesão renal antes do início do tratamento, os efeitos antiproteinúricos dos IECA podem ser prejudicados ou até mesmo abolidos (KRAMER et al., 2003).

No que concerne o estresse oxidativo, constatou-se níveis elevados de malonaldeído (MDA) intrarenal no grupo com ablação renal comparado ao SHAM, o que evidencia elevados níveis de peroxidação lipídica induzidos pelo modelo de nx 5/6. Atualmente, sabe-se que o excesso de peroxidação de membranas celulares resulta em comprometimento significativo da integridade estrutural e funcional da célula, ocasionando em alterações na permeabilidade da membrana (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Nessa perspectiva, o aumento do estresse oxidativo está relacionado a uma deficiência no transporte de eletrólitos pelas células tubulares renais (HANSELL et al., 2013).

O enalapril, por sua vez, atenuou esse aumento de MDA nos animais nefrectomizados, o que reforça o papel deste fármaco na redução do estresse oxidativo. Nesse sentido, é sabido que a AngII é responsável pelo aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial devido a hiperativação da NADPH oxidase mitocondrial por este hormônio, principal enzima formadora do anion superóxido (O_2^-) (HANSELL et al., 2013).

Outro parâmetro estudado foi a quantificação da atividade da superóxido dismutase (SOD), enzima que constitui um componente essencial do sistema de defesa endógeno do organismo (BIRBEN et al., 2012). Neste ensaio, constatou-se que a SOD em tecido renal foi reduzida pela DRC crônica experimental. É fato que a nx5/6 é capaz de reduzir os níveis de SOD no tecido renal, gerando lesão renal, conforme descrito na literatura (ASKARI et al., 2018). Além de diminuir os mecanismos de defesa antioxidante por aumentar os níveis de

peroxidação lipídica e reduzir a concentração celular da SOD, as espécies reativas de oxigênio (EROs), induzidas pela hipóxia renal gerada pela nx5/6, diminuem a atividade da SOD.

Apesar da diminuição da peroxidação lipídica renal induzida pelo enalapril, este fármaco não resultou em aumento da atividade da SOD, como era de se esperar. Entretanto, este resultado corrobora com um estudo em que animais submetidos à nx 5 /6 foram tratados com enalapril ou candesartan, dois inibidores do SRAA, quando também não houve elevação na atividade da SOD em tecido renal pelo uso destes fármacos (SUGIMOTO et al., 1999).

Atualmente, sabe-se que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenha papel central no contexto da fisiopatologia em diferentes nefropatias. O aumento nos níveis locais do anion superóxido no rim via hiperativação da NAPH oxidase pela Ang II leva ao sequestro do NO. A redução na biodisponibilidade do NO culmina em vasoconstrição e retenção de sódio e progressão da doença renal (KOPKAN; CERVENKA, 2009).

Adicionalmente, as EROs agem ativando a proteína desacetiladora-2 (UCP-2) do sistema mitocondrial, que contribui para a hipóxia renal (LAI et al., 2012). Por sua vez, a redução na concentração de oxigênio induz o aumento do fator de transcrição-1 α induzido por hipóxia (HIF-1 α). Ao mesmo tempo, um maior transporte de sódio induzido pela AngII leva a um maior gasto energético pelas células tubulares proximais, culminando em maior demanda de O₂ e maior liberação de HIF-1 α (MIKUSIC et al., 2014). Como forma de contraregulação dos efeitos deletérios da AngII, o aumento nos níveis de HIF-1 α estimulam a síntese e liberação de peptídeos natriuréticos, que apresentam diferentes efeitos nefroprotetores: vasodilatadores, natriuréticos, antioxidantes e antiinflamatórios (KIEMER; FURST; VOLLMAR, 2005; MIKUSIC et al., 2014).

Outro parâmetro quantificado neste trabalho foram os níveis de GMPc urinário. Nesse aspecto, verificou-se que a nx 5/6 reduziu os níveis de GMPc na urina dos animais, o que denota disfunção endotelial. Este resultado corrobora com um estudo onde ratos submetidos a ablação renal também apresentavam baixa quantidade de GMPc na urina (RODRIGUEZ-ITURBE et al., 2005). Conforme explanado anteriormente, os níveis elevados de EROs, particularmente o anion superóxido, diminui os níveis de NO, resultando em menor ativação dessa via no organismo. Entretanto, deve-se considerar que o GMPc também é produto final da via de diferentes peptídeos natriuréticos, inclusive das guanilinas. Dessa forma, este achado pode presumir redução da natriurese induzida pela UGN.

No intuito de investigar os efeitos renais diretos do hormônio natriurético uroguanilina (UGN) na DRC tratada e não tratada, utilizou-se a técnica de microperfusão estacionária *in vivo*, que permite estudar a atividade do permutador sódio/hidrogênio (NHE3) no túbulo

proximal, localizado mais especificamente na borda em escova tubular. Este método possibilita a medição do pH luminal de forma contínua, assim como a diferença de potencial transepitelial, e permite o cálculo da concentração de bicarbonato luminal. Esses dados permitem calcular a taxa, através da qual, a concentração da solução injetada, inicialmente com concentração de bicarbonato semelhante a do plasma (25mM), se altera em direção ao nível estacionário. Este valor é dado em termos de meia-vida ($t_{1/2}$) desta alteração da concentração do valor inicial em direção ao seu nível estacionário. A partir dos valores de $t_{1/2}$, as concentrações luminiais estacionárias e o diâmetro dos túbulos perfundidos são calculados os valores de fluxo de reabsorção de bicarbonato (MALNIC; MELLO AIRES, 1971; VESTRI; MALNIC,1990).

A microperfusão estacionária renal constitui uma técnica essencial de estudo, pois, através dela, tem-se acesso ao lúmen tubular, e, portanto, à membrana apical das células tubulares. Dessa forma, a partir da atividade do íon hidrogênio, pode-se calcular e inferir a atividade do permutador NHE3, assim como a reabsorção de sódio nos segmentos tubulares. Além disso, a microperfusão é uma técnica a ser destacada por ser realizada *in vivo*, possibilitando o estudo das alterações renais *in situ*.

No presente trabalho foram estudados os túbulos proximais renais de animais submetidos à ablação de 5/6 da massa renal. Os túbulos foram perfundidos com solução isotônica, em comparação ao plasma, contendo 25 mM de bicarbonato (HCO_3^-), enquanto um microeletrodo, contendo resina de troca iônica sensível a hidrogênio, captava as alterações nos valores de pH.

Os primeiros resultados deste estudo permitem constatar que os transportes tubulares de bicarbonato e de sódio do grupo Nx encontraram-se inibidos quando comparados ao SHAM. Este resultado justifica o aumento da fração de excreção de sódio (FENa^+) verificado no grupo submetido à nx 5/6. Assim, observou-se que o fluxo de reabsorção tubular de bicarbonato (JHCO_3^-) encontrou-se reduzido na DRC, confirmado por um maior tempo de meia-vida de reacidificação ($t_{1/2}$) em Nx comparado ao SHAM. Em consequência, observou-se aumento do bicarbonato estacionário ($[\text{HCO}_3^-]$), isto é, da concentração do ânion bicarbonato no túbulo proximal em Nx comparativamente ao SHAM. Ademais, o pH estacionário foi aumentado nos túbulos dos animais nefrectomizados.

No contexto da DRC, é sabido que os túbulos renais sofrem algumas adaptações no intuito de compensar a função dos néfrons não funcionantes. Num estudo prévio, constatou-se redução nos níveis totais de NHE3 e Na^+/Pi apicais e na Na^+/K^+ ATPase basolateral duas semanas após a nx5/6 no túbulo proximal. No entanto, as densidades por néfron destes transportadores não foram significativamente alteradas nos rins remanescentes, apesar da

extensa hipertrofia dos néfrons remanescentes (KWON et al., 1999). Dessa forma, a capacidade de reabsorção de alguns solutos no túbulo proximal é diminuída em consequência dessas alterações adaptativas, contribuindo para a manutenção o balanço de sódio. Nesse processo, participam o óxido nítrico (NO), prostaglandinas vasodilatadoras e hormônios da família dos peptídeos natriuréticos (ZATZ, 2012).

Diversos estudos apontam para um papel crucial dos peptídeos natriuréticos cardíacos na queda da reabsorção tubular de sódio, em especial no túbulo proximal. Nesse sentido, verifica-se aumento nos níveis plasmáticos de ANP e BNP, mesmo na ausência de disfunção cardíaca (ZHANG et al., 1994). O ANP é o peptídeo com ações mais conhecidas reportadas na literatura, seja de forma direta sobre os túbulos renais, seja pela ação inibitória, ao inibir a secreção renal de renina e a liberação de aldosterona pelo córtex adrenal, contribuindo assim para seus efeitos natriuréticos na DRC (MIKUSIC et al., 2014). No rim, o gene do ANP é também expresso em túbulos distais, onde é sintetizado a urodilatina, hormônio com ações predominantemente distais (JORGE et al., 2018).

Além dos hormônios natriuréticos de origem cardíaca, peptídeos da família das guanilinas, com destaque para UGN, constituem importantes efetores da resposta natriurética frente a ingestão de sal, contribuindo de forma crucial para o controle do balanço de sódio (JORGE et al., 2018). Apesar das ações conhecidas frente ao alto consumo de cloreto de sódio na dieta, o papel das guanilinas na DRC é ainda muito pouco conhecido, sendo por isso o principal alvo de estudo deste trabalho.

Além da compreensão do comportamento tubular renal em animais com DRC experimental, o estudo no modelo de microperfusão estacionária *in vivo* permitiu também avaliar o papel do tratamento crônico com enalapril em túbulos proximais de ratos submetidos à $\text{Nx } 5/6$. Nesse sentido, a administração oral deste fármaco provocou um aumento de JHCO_3^- quando comparados os grupos Nx+E versus Nx , havendo por isso, um menor $t_{1/2}$ nos animais tratados com enalapril, o que representa menor inibição em Nx+E , do que Nx , em relação ao grupo falso operado. Estes resultados justificam a redução na FENa^+ no grupo Nx+E versus o grupo Nx observada nos experimentos deste trabalho.

No contexto da DRC, é sabido que os inibidores do SRAA atenuam a inflamação induzida pela ativação de AT_1R pela AngII tanto em modelos experimentais animais, como em seres humanos. Ademais, estes estudos têm demonstrado redução na FENa^+ em indivíduos com DRC tratados com fármacos que reduzem a progressão dessa patologia (COSTA et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Nesse sentido, o enalapril é bem conhecido pela redução da sobrecarga aos néfrons remanescentes induzidos pela AngII, diminuindo a inflamação e a hipertrofia renal,

o que parece gerar uma menor resposta às forças natriuréticas por parte do túbulo proximal, já que nos animais tratados com enalapril a TFG é menos reduzida no grupo Nx+E em relação a Nx, bem como o aumento da $FENa^+$ é atenuado.

No intuito de estudar a sensibilidade do rim à UGN na DRC, foi injetada solução perfusora contendo UGN ($1\mu M$) diretamente no túbulo proximal de ratos submetidos à nx 5/6. Os resultados mostraram ausência de resposta do rim frente a este hormônio, já que não houveram quaisquer modificações nos parâmetros estudados na microperfusão estacionária. Dessa forma, ao contrário do que ocorre em animais não doentes, quando verifica-se redução no fluxo tubular de bicarbonato, e portanto, diminuição na reabsorção de sódio, conforme observado por Amorim e colaboradores (2006), o túbulo proximal encontrou-se insensível à uroguanilina em animais com DRC experimental.

Uma hipótese plausível para essa constatação seria uma possível hiperativação da via das guanilinas na DRC, conforme sugerido por alguns estudos prévios que mostraram aumento dos níveis plasmáticos de UGN em seres humanos submetidos ao tratamento dialítico (FUKAE et al., 2000). Além disso, um estudo recente do nosso grupo de pesquisa constatou elevação da expressão de RNAm para guanilina e UGN tanto ao nível intestinal quanto renal (COSTA et al. 2015). Dessa forma, o excesso de agonista pode interferir na sensibilidade aos hormônios da família das guanilinas, resultando em perda da resposta a esta quantidade exógena administrada no presente estudo.

Finalmente, verificou-se que o tratamento oral com enalapril nos animais submetidos à nx 5/6 modulou a resposta do rim à UGN, já que, ao contrário do grupo Nx+UGN, o grupo Nx+E+UGN apresentou inibição do fluxo de reabsorção bicarbonato, confirmado por um maior tempo de meia-vida de reacidificação, e portanto, uma inibição do trocador NHE-3. Dessa forma, o principal achado no ensaio de microperfusão estacionária *in vivo* foi o aumento da sensibilidade à UGN no contexto da inibição crônica do SRAA.

7 CONCLUSÕES

- A nx 5/6 realizada no presente estudo provocou aumento nos níveis de peroxidação lipídica, e o enalapril atenuou este aumento induzido pela ablação renal, reforçando o papel do bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) na modulação do estresse oxidativo.

- Observou-se uma redução nos níveis de GMPc urinário nos animais com DRC, indicando disfunção endotelial e possivelmente resposta reduzida aos peptídeos natriuréticos. O enalapril atenuou tal redução induzida pela nefrectomia 5/6.

- Na DRC, houve uma inibição do permutador Na^+/H^+ (NHE3) no túbulo proximal, evidenciado por uma diminuição do fluxo de reabsorção de bicarbonato nos animais submetidos à nx 5/6.

- Os túbulos proximais dos animais com DRC não foram responsivos à uroguanilina (UGN), sugerindo uma redução na sensibilidade do seu receptor frente ao excesso deste hormônio nessa condição.

- Nos animais com DRC tratados com enalapril, a UGN apresentou efeito inibitório sobre o NHE3. Dessa forma, sugere-se que a modulação do SRAA na DRC parece modificar a sensibilidade do receptor GC-C à UGN a nível renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, H.; HENRICH, W. L. Stage IV Chronic Kidney Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.362, n.1, p.56-65, 2010.

AIELLO, S.; NORIS, M.; TODESCHINI, M.; ZAPPELLA, S.; FOGLENI, C.; BENIGNI, A.; CORNA, D.; ZOIA, C.; CAVALLOTI, D.; REMUZZI, G. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. **Kidney International**, v.52, n.1, p.171-81, 1997

ALPERS, C. E. O Rim. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 999-1065.

ALVES, L. F.; ABREU, T. T.; NEVES, N. C. S.; MORAIS, F. A.; ROSIANY, I. L.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. V.; PINTO, S. W. L.; OTONI, A. Prevalence of chronic kidney disease in a city of southeast Brazil. **Brazilian Journal of Nephrology**, v.39, n.2, 2017.

AMMANN, D.; LANTER, F.; STEINER, R.A.; SCHULTHESS, P.; SHIJO, Y.; SIMON, W. Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular studies. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 2267-2269, 1981.

AMORIM, J. B.; MUSA-AZIZ, R.; LESSA, L. M.; MALNIC, G.; FONTELES MC. Effect of uroguanylin on potassium and bicarbonate transport in rat renal tubules. **Can J Physiol Pharmacol.**, v84, n.9, 2006.

ARAÚJO, C. S.; ALBUQUERQUE JR, R. R.; RODRIGUES, M. M.; COELHO, T. H.; SANTOS, J. Q.; FARIA, B.; MAIA, B. S.; MOREIRA, A. F. L.; PESTANA, M. Local modulation of the natriuretic peptide system in the rat remnant kidney. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.24, n.6, p.1774-82, 2009.

ASKARI, H.; SEIFI, B.; KADKHODAEI, M.; KADKHODAEI, M.; SANADGOL, S.; ELSHIEKH, M.; RANJBARAN, M.; AHGHARI, P. Protective effects of hydrogen sulfide on chronic kidney disease by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Excli J.**; v.17, p.14-23, 2018.

ATKINS; R. C.; The epidemiology of chronic kidney disease. **International Society of Nephrology**, v.67, sup.94, p.14-18, 2006.

BADAL, S. S.; DANESH, F. R. New Insights Into Molecular Mechanisms of Diabetic Kidney Disease. **American Journal Kidney Disease**, v.62, n.2, suppl.2, p.63-83, 2014.

BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v.86, n.6, p.615-21, 2008.

BAGDASARIAN, N.; HEUNG, M.; MALANI, P. N. Infectious Complications of Dialysis Access Devices. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.26, n.1, p.127-41, 2012.

- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. S. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.6, p.940-50, 2008.
- BASTOS, M. G. Biomarcadores de função renal na DRC. In: ABENSUR, H. **Biomarcadores na nefrologia. Sociedade Brasileira de Nefrologia**. São Paulo: Roche 2011. cap.1, p.7-18.
- BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.33, n.1, p.74-87, 2011.
- BASU, N.; ARSHAD, N.; VISWESWARIAH, S. S. Receptor guanylyl cyclase C (GC-C): regulation and signal transduction. **Molecular and cellular Biochemistry**, v.334, n.1-2, p.67-80, 2010.
- BATISTA, F. J. A.; PERUCHETTI, D. B.; ABREU, T. P.; NASCIMENTO, N. R.; MALNIC, G.; NEVES, C. C. Uroguanylin modulates (Na+K+)ATPase in a proximal tubule cell line: Interactions among the cGMP/protein kinase G, cAMP/protein kinase A, and mTOR pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.1431-38, 2016.
- BAYLIS, C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. **American Journal of Physiology**, v.294, n.1, p. 1-9, 2008.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ J**, v.5, n.1, p.9-19, 2012.
- BOLIGNANO, D.; ZOCCALI, C. Effects of weight loss on renal function in obese CKD patients: a systematic review. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.28, supl.4, p. iv82-98, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p.248-254, 1976.
- BRENNER, B. M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.12, n.6, p. 1315-25, 2001.
- BROWN, S. A.; FINCO, D. R.; CROWELL, W. A.; CHOAT, D. C.; NAVAR, L. G.
- BRUNINI, T.M.C., DEMÉZIO DA SILVA, C., SIQUEIRA, M.A.S., MOSS, M.B., SANTOS, S.F.F., MENDES-RIBEIRO, A.C. Uremia, atherothrombosis and malnutrition: the role of L-arginine-nitric oxide pathway. **Cardiovascular & Hematological Disorders**, v.6, n.2, p.133-140, 2006.
- BRUNTON L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012. 2112p.
- BUCHARLES, S. G. E.; PERCOITS-FILHO, R. Doença Renal Crônica: Mecanismos da Progressão e Abordagem Terapêutica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.31, supl.1, p.6-12, 2009.

- CAREY, R. M.; SMITH, J. R.; ORTT, E. M. Gastrointestinal control of sodium excretion in sodium-depleted conscious rabbits. **American Journal of Physiology**, v.230, n.6, p.1504-8, 1976.
- CARRITERS, S. L.; OTT, C. E.; HILL, M.J.; JOHNSON, B. R., CAI, W.; CHANG, J. J.; SHAH, R. G.; SUN, C.; MANN, E. A.; FONTELES, M. C.; FORTE, L. R.; JACKSON, B. A.; GIANNELLA, R. A.; GREENBERG, R. N. Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. **Kidney International**, v.65, n.1, p.40-53, 2004.
- CARRITHERS, S. L.; TAYLOR, B.; CAI, W. Y.; JOHNSON, B. R.; OTT, C. E.; GEENBERG, R. N.; JACKSON, B. A. Guanylyl cyclase-C receptor RNAm distribution along the rat nephron. **Regulatory peptides**, v.95, n.1, p.65-74, 2000.
- CHÂTEL, R.; MAKÓ, J.; TÓTH, M.; BARNA, I.; LANG, R. E. Atrial natriuretic peptide (ANP) in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. **International Urology and Nephrology**, v.23, n.2, p.177-83, 1991.
- CHEN, S. C.; HUNG, C. C.; KUO, M. C.; LEE, J. J.; CHIU, Y. W.; CHANG, J. M.; HWANG, S. J.; CHEN, H. C. Association of dyslipidemia with renal outcomes in chronic kidney disease. **Plos One**, v.8, n.2, p.1-6, 2013.
- CHOW K.M.; LIU, Z.C.; CHANG, T.M.S.; Animal Remnant Kidney Model of Chronic Renal Failure Revisited. **Hong Kong Journal of Nephrology**, v.5, n.2, p.57-64, 2003.
- collecting duct independent of guanylate cyclase C. **Kidney International**, v.68, n.3, p.1008-1017, 2005.
- COMINI, L.; BACHETTI, T.; CARGNONI, A.; BASTIANON, D.; GITTI, G.L.; CECONI, C.; FERRARI, R. Therapeutic modulation of the nitric oxide: all ace inhibitors are not equivalent. **Pharmacology Research**, v.56, n.1, p.42-8, 2007
- CORESH, J. ; SELVIN, E.; STEVENS, L.A.; MANZI, J.; KUSEK, J. W.; EGGERS, P.; VAN LENTE, F.LEYEEY, A.S. Prevalence of Chronic Kidney Diseases in the United States. **The Journal of the America Medical Association**, v.298, n.17, p. 2038-2047, 2007.
- CORTES, P.; ZHAO, X.; RISER, B. L. et al. Regulation of glomerular volume in normal and partially nephrectomized rats. **Am J Physiol.**, v.270, p.356-370, 1996.
- COSTA, A. F. N.; PEREIRA, L. P. M.; FERREIRA, M. L.; SILVA, P. C.; CHAGAR, V. L. A.; SCHANAIDER A. Modelo cirúrgico de insuficiência renal crônica. Estudo em coelhos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.36, n.1, p.78-84, 2009.
- CURRIE, M. G.; FOK, K. T.; KATO, J; MOORE, R. J.; HAMRA, F. K.; DUFFIN, K. L.; SMITH C. E. Guanylin, an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.3, p.947-951, 1992.
- D'SOUZA, S. P.; DAVIS, M.; BAXTER, G. F. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. **Pharmacology & Therapeutics**, v.101, n.2, p.113-29, 2004.

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

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

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

DING, W.; WANG B.; ZHANG, M.; GU, Y. Tempol, a Superoxide Dismutase-Mimetic Drug, Ameliorates Progression of Renal Disease in CKD Mice. **Cell Physiol Biochem**, v.36, n.6, p.2170-82, 2015.

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

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

E. Y. Lai, Z. Luo, M. L. Onozato et al. Effects of the antioxidante drug tempol on renal oxygenation in mice with reduced renal mass. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v.303, n.1, p.64-74, 2012.

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

ELITSUR, N.; LORENZ, J. N.; HAWKINS, J. A.; RUDOLPH, J. A.; WITTE, D.; YANG, L. EL.; MCDONOUGH, A. A.; COHEN, M. B. The proximal convoluted tubule is a target for the uroguanylin-regulated natriuretic response. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.43, suppl.1, p.74-81, 2006.

FERENBACH, D. A.; BONVENTREA, J. V. Kidney tubules: intertubular, vascular, and glomerular cross-talk. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v.25, n.3, p.194-202, 2016.

FIELD, M. GRAF, L. H.LAIRD, W. J.; SMITH, P. L. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.75, n.6, p.2800-4, 1978.

FINK, H. A.; ISHARI, A.; TAYLOR, B. C.; GREER, N. L.; DONALD, R. D.; ROSSINI, D.; SADIG, S.; LANKIREDDY, S.; KANE, R. L. WILT, T. J. Screening for, Monitoring, and Treatment of Chronic Kidney Disease Stages 1 to 3: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force and for an American College of Physicians Clinical Practice Guideline. **Annals of Internal Medicine**, v.156, n. 8, p. 570-581, 2012.

FLECK, C.; APPENROTH, D.; JONAS, P.; KOCH, M.; KUNDT, G.; NIZZE, H., STEIN, G. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats--influence of sex, strain, and surgical procedure. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.57, n.3, p.195-205, 2006.

FOGO, A. B. Animal Models of FSGS: Lessons for Pathogenesis and Treatment. **Seminars in Nephrology**, v.29, n.2, p.161-71, 2003.

FONTELES, M. C.; GREENBERG, R. N.; MONTEIRO, H. S.; CURRIE, M. G.; FORTE, L. R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **American Journal of Physiology**, v.275, n.2, p.191-7, 1998

FORTE, L.R. Guanylin regulatory peptides: structures, biological activities mediated by cyclic GMP and pathobiology. **Regulatory peptides**, v.81, n.1, p.29-39, 1999.

FRANCO, R. J. S. F. Proteção renal durante o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina. **HiperAtivo**, v.5, n.2, p.110-19, 1998.

FUJIHARA, C. K.; SENA, C. R.; MALHEIROS, D. M.; MATTAR, A. L.; ZATZ, R Short-term nitric oxide inhibition induces progressive nephropathy after regression of initial renal injury. **American Journal of Renal Physiology**, v.290, n.3, p.632-40, 2005.

FUJIHARA, C. K.; VELHO, M.; MALHEIROS, D. M. A. C.; ZATZ, R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney International*, v.67, n.5, p.1913-24, 2005.

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

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

GANSEVOORT, R.T.; CORREA-ROTTER, R.; HEMMELGARN, B. R.; JAFAR, T. H.; HEERSPINK, H. J.; MANN, J. F. et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. **Lancet.**, v.382, n.9889, p.339-52, 2013.

GEHR, T. W. B. Curcumin and enalapril ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5/6 nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. **American Journal of Physiology**, v.302, n.4, p.39-45, 2012.

GHOSH, S. S.; KRIEG, R.; MASSEY, H. D.; SICA, D. A.; FAKHRY, I.; GHOSH, S.; GEHR, T. W. Curcumin and enalapril ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5/6 nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.302, n.4, p.439-54, 2012.

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

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

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

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

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

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

HAMZAOUI, M.; GUERROT, D.; DJERADA, Z.; DUFLOT, T. RICHARD, V.; BELLIEU. [Cardiovascular consequences of chronic kidney disease, impact of modulation of epoxyeicosatrienoic acids]. **Ann Cardiol Angeiol (Paris)**, v.67, n.3, p.141-48, 2018.

HANSELL, P; WELCH, W. J.; BLANTZ, R. C.; PALM, F. Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.40, n.2, p.123-37, 2013.

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

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

HAYSLETT, J. P.; KASHGARIAN, M.; EPSTEIN, F. H. Functional correlates of compensatory renal hypertrophy. **J Clin Invest.**, v.47, p. 774-782, 1968.

HERNAK, J.; PAULIS, L.; FEDOR, S. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology, **Int J Mol Sci.** , v.17, n.7, 2016.

HILL, N. R.; FATOSA, S. T.; OKE, J. L., et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One**, v.11, n.7, 2016.

HILL, N. R; FATOBA, S. T.; OKE, J. L; HIRST, J. A.; O'CALLAGHAN, C. A.; LASSERSON, D. S.; HOBBS, F. D. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One.**, v.11, n.7, 2016.

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

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

HOSTETTER, T. H. Progression of renal disease and renal hypertrophy. **Annu Ver Physiol.**, v.57, p.263-78, 1995.

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

IGHODAROAB, O.M.; AKINLOYEB, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v.54, n.4, p.287-93, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

JORGE, A. R. C.; COSTA, P.H. S.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. High Salt Intake Promotes Different Responses to Urodilatin and Uroguanylin in the Isolated Rat Kidney. **Horm Metab Res.**, v.50, n.2, p.152-9, 2018.

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

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

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

KIEMER, A. K.; FURST, R.; VOLLMAR, A. M. Vasoprotective actions of the atrial natriuretic peptide. **Current Medicinal Chemistry: Cardiovascular and Hematological Agents**, v.3, n.1, p.11-21, 2005.

KIKUCHI, M.; FUJIMOTO, S.; FUKAE, H.; KINOSHITA, H.; KITA, T.; NAKASATO, M. ETO, T. Role of uroguanylin, a Peptide with natriuretic activity, in rats with experimental nephrotic syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.16, n.2, p.392-7, 2005.

KIM, S. W.; LEE, J.; PAEK, Y. W.; KANG, D. G. CHOI, K. C. Decreased nitric oxid synthesis in rats with kidney renal failure. **Journal of Korean Medical Science**, v.15, p.425-30, 2000.

KOBORI, H.; NANGAKU, M.; NAVAR, L. G.; NISHIYAMA, A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacological Reviews**, v.59, n.3, p.251-87, 2007.

KOPKAN, L.; CERVENKA, L. Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: implications in the pathophysiology of salt-sensitivity and hypertension. **Physiol Res.**, v.58, suppl. 2, p.55-67, 2009.

KRAMER, A. B.; LAVERMAN, G. D.; VAN GOOR, H.; NAVIS, G. Inter-individual differences in anti-proteinuric response to ACEi in established adriamycin nephrotic rats are predicted by pretreatment renal damage. **The Journal of Pathology**, v.201, n.1, p.160-7, 2003.

KRIKKEN, J. A.; LAVERMAN, G. D.; NAVIS, G. Benefits of dietary sodium restriction in the management of chronic kidney disease. **Currenty Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.18, n.6, p. 531-8, 2009.

KUNCOVÁ, J.; SVÍGLEROVÁ, J.; KUMMER, W.; RAJDL, D.; CHOTTOVÁ-DVORÁKOVÁ, M.; TONAR, Z.; NALOS, L. STENGL, M. Parasympathetic regulation of heart rate in rats after 5/6 nephrectomy is impaired despite functionally intact cardiac vagal innervation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.24, n.8, p.2362-70, 2009.

KURJAL, P.; VERNEROVÁ, Z. [5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number]. **Cesk Fysiol.**, v.57, n.4, p.104-9, 2008.

KWON, T. H.; FROKIAER, J.; FERNÁNDEZ-LLAMA, P; MAUNSBACH, A. B.; KNEPPER, M. A.; NIELSEN, S. Altered expression of Na transporters NHE-3, NaPi-II, Na-K-ATPase, BSC-1, and TSC in CRF rat kidneys. **Am J Physiol.**, v.277, n.2, p.257-70, 1999.

LAI, E. Y.; LUO, Z.; ONOZATO, M. L.; RUDOLPH, E. H.; SOLIS, G.; JOSE, P. A.; WELLSTEIN, A.; ASLAM, S.; QUINN, M. T.; GRIENGLING, K.; LE, T.; LI, P.; PALM, F.; WELCH, W. J.; WILCOX, C. S. Effects of the antioxidant drug tempol on renal oxygenation in mice with reduced renal mass. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v.303, n.1, p. 64-74, 2012.

LAUTNER, R. Q.; VILLELA, D. C.; FRAGA-SILVA, R. A.; SILVA, N.; VERANO-BRAGA, T.; COSTA-FRAGA, F.; JANKOWSKI, J.; JANKOWSKI, V.; SOUSA, F.; ALZAMORA, A. Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. **Circ. Res.**, v.112, p.1104-1111, 2013.

LAUTRETTE, A.; LI, S.; ALILI, R. SUNNARBORG, S. W.; BURTIN, M. LEE, D. C.; FRIEDLANDER, G.; TERZI, F. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. **Nature Medicine**, v.11, n.8, p.867-74, 2005.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.6, n.1, p.1-10, 2009.

LEITMAN, D. C.; AMDRESEN, J. W.; KUNO, T.; KAMISAKI, Y.; CHANG, J. K.; MURAD, F. Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.25, p.11650-5, 1986.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MENDOZA-TORRES, E.; OYARZÚN, A.; MONDACA-RUFF, D.; AZOCAR, A.; CASTRO, P. F.; JALIL, J. E.; CHIONG, M.; LAVANDERO, S.; OCARANZA, M. P. ACE2 and vasoactive peptides: Novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. **Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.**, v.9, n.4, p.217-37, 2015.

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

MOLLNAU, H.; WENDT, M. SZÖCS, K.; LASSÈGUE, B. SCHULZ, E.; OELZE, M.; LI, H.; BODENSCHATZ, M. AUGUST, M. KLESCHYOV, A. L.; TSILIMINGAS, N.; WALTER, U.; FÖRSTERMANN, U.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; MÜNDEL, T.

Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circulation Research**, v.90, n.8, p.58-65, 2002.

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

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

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

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

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

PELUSO, A. A. B.; SANTOS, R. A. S.; UNGER, T.; STECKELINGS, U. M. The angiotensin type 2 receptor and the kidney. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.26,n.1, p.36-42, 2017.

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

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

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

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

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

RAZMARIA, A. A. Chronic kidney disease **JAMA**, v.350, n.20, p.2248-2248, 2016.

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

- REMUZZI, G.; PERICO, N.; MACIA, M.; RUGGENENTI, P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. **Kidney International**, v.98, supl.99, p.57-65, 2005.
- RIELLA, M. C.; PECOITS-FILHO, R. Insuficiência Renal Crônica Toxinas Urêmicas. *In*: RIELLA, M.C. **Princípios de nefrologia e equilíbrio hidroeletrólítico** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.827-844.
- RIGATTO, K. V.; BÖHLKE, M. IRIGOUYEN, M. C. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: da Fisiologia ao Tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n.3, p.1-5, 2004.
- RODRIGUEZ-ITURBE, B.; FERREBUZ, A.; VANEGAS, V.; QUIROZ, Y.; ESPINOZA, F.; PONS, H.; VARIZI, N. D. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. **Kidney International**, v.68, p. 2131-2142, 2005.
- ROSARIO, R. F.; WESSON, D. E. Primary hypertension and nephropathy. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.15, n.2, p.130-4, 2006.
- ROSENBERG, M. E.; SMITH, L. J.; CORREA-ROTTER, R.; HOSTETTER, T.H. The paradox of the renin-angiotensin system in chronic renal disease. **Kidney International**, v.45, n.2, p.403-10, 1994.
- ROY, N.; GURUPRASAD, M. R.; KONDAIAH, P.; MANN, E. A.; GIANNELLA, R. A.; VISWESWARIAH, S. S. Protein kinase C regulates transcription of the human guanylate cyclase C gene. **European Journal of Biochemistry**, v.268, n.7, p.2160-71, 2001.
- RUIZ-ORTEGA, M.; GONZÁLEZ, S.; SERÓN, D.; CONDOM, E.; BUSTOS, C.; LARGO, R. GONZÁLEZ, E.; ORTIZ, A.; EGIDO, J. ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis. **Kidney International**, v.48, n.6, p.1778-91, 1995.
- RUIZ-ORTEGA, M.; RUPÉREZ, M.; ESTEBAN, V.; RODRÍGUEZ-VITA, J.; SÁNCHEZ-LOPEZ, E.; CARVAJAL, G.; EGIDO, J. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, n.1, p.16-20, 2006.
- RÜSTER, C.; WOLF, G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.17, p.2985-2991, 2006.
- SARAN, R.; ROBINSON, B.; ABBOTT, K. C. et al. US Renal Data System 2017 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. **Am J Kidney Dis.**, v.71, n.3, supl.1, 2018.
- SCHLUETER, N.; STERKE, A.; WILLMES, D. M.; SPRANGER, J.; JORDAH, J.; BIRKENFELD, A. L. Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. **Pharmacology & Therapeutics**, v.144, n.1, p.12-27, 2014
- SCHULZ, S.; GREEN, C. K.; YUEN, P. S. T.; GABERS, D. L. Guanylate cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. **Cell Press**, v.63, n.5, p.941-948, 1990.

SESSO, R. C. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. M.; BURDMANN, E. A. Censo Brasileiro de Diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.32, n.4, p.380-84, 2009.

SESSO, R.; GORDAN, P.; Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil, 2007. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.29, n.1, p.9-12, 2007.

SILVA, A. C. S.; PINHEIRO, S. V. B.; SANTOS, R. A. S. Peptídeos e interação coração-rim. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.15, n.3, p.134-143, 2008.

SINDIC, A. Current Understanding of Guanylin Peptides Actions. **International Scholarly Research Notices Nephrology**, Id. 813648, 2013.

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

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

SINDIC, A.; VELIC, A.; 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 International**, v.68, n.3, p.1008-17, 2005.

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

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

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

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

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

SOI, V.; YEE, J. Sodium Homeostasis in Chronic Kidney Disease. **Adv Chronic Kidney Dis**. V.24, n.5, p.325-331.

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

- SOUZA, L. L.; COSTA-NETO, C. N. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. **Journal of Cellular Physiology**, v.227, n.5, p.2117-22, 2012.
- STRIPPOLI, G. F.; NAVANEETHAN, S. D.; JOHNSON, D. W.; PERKOVIC, V.; PELLEFRINI, F.; NICOLUCCI, A.; CRAIG, J. C. Effects of statins in patients with chronic kidney disease: meta-analysis and meta-regression of randomised controlled trials. **British Medical Journal**, v.336, n.7645, p.645-51, 2008.
- SUGIMOTO, K.; TSURUOKA, S.; MATSUSHITA, K; FUJIMURA, A Effects of candesartan cilexetil on oxidative state and renal function in 5/6 nephrectomized rats **Journal of Human Hypertension**, v.13, supl.1, p.S62, 1999.
- SUNG, C. C.; HSU, Y. C.; CHEN, C. C.; LIN, Y. F.; WU, C. C. Oxidative estresse and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Id. 301982, 2013.
- SUZUKI, Y., RUIZ-ORTEGA, M. GOMEZ-GUERRERO, C.; TOMINO, Y.; EGITO, J. Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, n.8, p.1423-6, 2003.
- TAAL, M. W.; BRENNER, B. M. Adaptation to Nephron Loss and Mechanisms of Progression in Chronic Kidney Disease. In: **Brenner & Rector's The Kidney**. 9ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p1918-1971.
- TAKIZAWA, T.; TAKASAKI, I.; SHIONOIRI, H.; ISHII, M. Progression of glomerulosclerosis, renal hypertrophy, and an increased expression of fibronectin in the renal cortex associated with aging and salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. **Life Sci.**, v.61,n.16, p.1553-8, 1997.
- TENG, B.; DUONG, M.; TOSSIDOU, I.; YU, X.; SCHIFFER, M. Role of proteinkinase C in podocytes and development of glomerular damage indiabetic nephropathy. **Front Endocrinol.**, v.5, p.1-6, 2014.
- TERRA, F. S.; COSTA, A. M. D. D.; FIGUEIREDO, E. T.; MORAIS; COSTA, R. D. As principais complicações apresentadas pelos pacientes renais crônicos durante as sessões de hemodiálise. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.8, n.3, p.187-92, 2010.
- THOMAS, M. C.; COOPER, M. E.; ZIMMET, P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. **Nat Rev Nephrol.**, v.12, n.2, p.73-81, 2016.
- TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. **Pharmacological Review**, v.59, n.1, p.54-87, 2007.
- VEJAKAMA, P.; INGSATHIT, A.; MCKAY, G. J.; et al. Treatment effects of renin-angiotensin aldosterone system blockade on kidney failure and mortality in chronic kidney disease patients. **BMC Nephrol.**, v18, n.1, 2017.

VERZOLA, D.; BERTOLOTTI, M. B.; VILLAGGIO, B. et al. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. **J Am Soc Nephrol.**, v.15, p.85-87, 2004.

VILLELA, D.C.; PASSOS-SILVA, D.G.; SANTOS, R.A. Alamandine: A new member of the angiotensin family. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 23, p. 130–134, 2014.

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

VOS, T. et al. Global Burden of Disease Study C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: asystematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet.**, v.22, n.386, p.743-800, 2015.

WEBSTER, A. A.; NAGLER, E. V.; MORTON, R. L.; MASSON, P. Chronic Kidney Disease. **Lancet**, v.389, n.25, p.1238-52, 2017.

YARIBEYGI, H.; FARROKHI, F. R.; REZAEI, R.; SAHEBKAR, A. Oxidative stress induces renal failure: A review of possible molecular pathways. **J Cell Biochem.**, v.119, n.4, p.2990-8, 2018.

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

YOON, C. Y.; NOH, J.; LEE J, et al. High and low sodium intakes are associated with incident chronic kidney disease in patients with normal renal function and hypertension. **Kidney Int.**, v.93, n.4, p.921-31, 2018.

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

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

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

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

ZHANG, F.; LIU, H.; LIU, D.; LIU, Y.; LI, H.; TAN, X.; LIU, F.; PENG, Y.; ZHANG H. Effects of RAAS Inhibitors in Patients with Kidney Disease. **Curr Hypertens Rep.**, v.19, n.9, 2017.