

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**FUNÇÃO RENAL EM RATOS COM NECROSE TUBULAR  
AGUDA INDUZIDA POR GENTAMICINA SOB A INFUSÃO DE  
ANGIOTENSINA-(1-7)**

**Lílian Fernanda Pacheco Moreira de Souza**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Maria Aparecida Ribeiro Vieira**

**Belo Horizonte  
2009**

**Lílian Fernanda Pacheco Moreira de Souza**

**FUNÇÃO RENAL EM RATOS COM NECROSE TUBULAR AGUDA INDUZIDA POR  
GENTAMICINA SOB A INFUSÃO DE ANGIOTENSINA-(1-7)**

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências, na área de concentração de Fisiologia, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Maria Aparecida Ribeiro Vieira.

Belo Horizonte  
2009

"Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pequena".

*Fernando Pessoa*

À Minha adorada mãe e ao meu amado Sérgio pelo  
incentivo e encorajamento, além do mais importante:

O amor que demonstram por mim.



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Fisiologia e Farmacologia



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 142 DE LILIAN FERNANDA PACHECO MOREIRA DE SOUZA**

Às 13:30 horas do dia 27 do mês de novembro de 2009, na Sala Prof. Wilson Teixeira Beraldo, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de LILIAN FERNANDA PACHECO MOREIRA DE SOUZA. A presidência da sessão coube a Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, orientadora. Inicialmente a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho, Centro de Ciências Biológicas/UFSC; Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP; Prof. Dr. Miguel José Lopes, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG; Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG e Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira, orientadora. Em seguida a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada "FUNÇÃO RENAL EM RATOS COM NECROSE TUBULAR AGUDA INDUZIDA POR GENTAMICINA SOB INFUSÃO DE ANGIOTENSINA-(1-7)". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Banca reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar APROVADA a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de novembro de 2009.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Terezila Machado Coimbra

Jamil Assreuy Filho

Miguel José Lopes

Robson Augusto Souza dos Santos



## **Agradecimentos**

Gostaria, sinceramente, de agradecer às pessoas que participaram da elaboração deste trabalho ou ainda àquelas que tornaram este feito mais agradável.

À professora, Maria Aparecida Ribeiro Vieira, minha orientadora, pela oportunidade de realizar este trabalho e por ter me aceitado de prontidão para a realização do mesmo;

À minha família pelo apoio incondicional;

Aos meus amigos de laboratório, Ana, Lúcio, Vivi, Gustavo, principalmente pela paciência, mas também pela convivência sempre agradável e pela ajuda constante;

Às alunas Laíse e Walquíria pela ajuda e amizade;

À minha maravilhosa amiga Cibelle que foi e sempre será um exemplo de determinação a ser seguido;

Ao meu querido amigo Pesquero, pelo incentivo, pelas conversas, mas principalmente pela tenra amizade;

Aos meus amigos e amigas, Kátia Daniela, Gustavo (Neuro), Priscila, Ivan, Dayse e Taquinho, pelos momentos de alegria e de risos;

Às alunas do laboratório de Hipertensão: Nívea, Renata, Antonella, Sílvia e aos alunos, Juninho, Serginho pelas pacientes acolhidas;

À Marilene, Zezé e Rose que em muitos momentos me salvaram ao atenderem os meus pedidos;

Aos técnicos e secretárias do departamento de Fisiologia e Biofísica, pelo auxílio e desprendimento;

À professora Cidinha, por tão gentilmente ter me recebido e me ajudado em seu laboratório;

Ao professor Giovanni, pela confecção e interpretação das lâminas histológicas;

Aos professores Robson Augusto, Miguel Lopes, Júlio Cambraia, pelas sugestões para a execução deste trabalho.

## Sumário

	Páginas
<b>1. Introdução .....</b>	<b>01</b>
1.1 Insuficiência Renal Aguda.....	01
1.2 Nefrotoxicidade induzida pela gentamicina.....	02
1.3 Necrose Tubular Aguda .....	03
1.4 Sistema Renina Angiotensina .....	05
1.5 Angiotensina (1-7).....	07
1.6 Necrose Tubular Aguda (NTA) e o SRA.....	09
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>15</b>
3.1 Animais.....	
3.2 Grupos Experimentais.....	15
3.3 Procedimentos Analíticos.para avaliação da função renal .....	22
3.3.1 Dosagem de creatinina.....	22
3.3.2 Dosagem de Inulina .....	24
3.3.3 Dosagem de PAH.....	25
3.3.4 Dosagem de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> .....	27
3.3.5 Determinação da Osmolalidade.....	27
3.4 Pressão arterial sistólica.....	28
3.5 Proteinúria.....	28
3.6 Gama glutamil transferase.....	29
3.7 Conteúdo renal de RNA mensageiro que codifica componentes do SRA.....	29
3.7.1 Sequência de RNAm das proteínas estudadas .....	29
3.7.2 Seleção dos pares de primers.....	30
3.7.3 Preparação das amostras para o PCR em tempo real.....	31
Extração do RNA mensageiro.....	31
Transcrição Reversa.....	33
PCR em tempo real.....	33
3.8 Análise Estatística.....	34
<b>4. Resultados.....</b>	
4.1 Validação e caracterização do modelo de NTA induzida pela gentamicina em ratos.....	35
4.1.1 Peso corporal, peso dos rins e ingestão de água.....	35
4.1.2 Gentamicina e pressão arterial sistólica.....	37

4.1.3 Gentamicina e função renal.....	37
4.1.3.1 Creatinina plasmática e RFG.....	37
4.1.3.2 Fluxo urinário e fração de excreção de água.....	38
4.1.3.3 Proteinúria e enzima gama-GT urinária.....	40
4.1.3.4 Sódio, Potássio, Osmolalidade e Água livre.....	41
4.1.3.5 Gentamicina e aspecto morfológico renal.....	45
4.2 Função renal em ratos com NTA induzida pela GT sob infusão de Ang(1-7).....	47
4.2.1 Angiotensina (1-7) e função renal em ratos com NTA induzida pela gentamicina.....	47
4.2.1.1 Fluxo Plasmático Renal.....	47
4.2.1.2 Ritmo de Filtração Glomerular.....	47
4.2.1.3 Fração de Filtração.....	49
4.2.1.4 Fluxo Urinário.....	50
4.2.1.5 Fração de Excreção de Água.....	51
4.2.1.6 Fração de Excreção de sódio.....	52
4.2.1.7 Fração de Excreção de potássio.....	53
4.2.1.8 Clearance Osmolar.....	54
4.2.1.9 Clearance de água livre.....	55
4.3 Expressão renal de RNAm que codifica componentes dos SRA em ratos com NTA induzida pela gentamicina.....	57
4.3.1 Angiotensinogênio e renina renais.....	57
4.3.2 ECA 1 e ECA2 renais.....	58
4.3.3 Receptores AT1 e Mas renais.....	59
<b>5. Discussão.....</b>	<b>60</b>
5.1 Validação do Modelo de necrose tubular aguda (NTA) induzida pela gentamicina em ratos.....	60
5.1.1 Gentamicina e parâmetros não-renais.....	60
5.1.2 Gentamicina e parâmetros renais.....	61
5.2 Função renal em ratos anestesiados com NTA .....	62
5.3 Função renal em ratos anestesiados e com necrose tubular aguda sob infusão se Ang(1-7).....	64
5.4 Efeito da GT sobre os níveis renais de RNA mensageiro que codifica componentes do SRA.....	68
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

A779 - Antagonista seletivo de Angiotensina – (1-7); (D-alanina<sup>7</sup>- Ang(1-7))

ADH – Hormônio Antidiurético;

Ang - Angiotensina;

Ang II – Angiotensina II

Ang - (1-7) – Angiotensina –(1-7);

AQPs- Aquaporinas

AQP1- Aquaporina tipo 1

AQP2- Aquaporina tipo 2

CEBIO - Centro de Bioterismo;

$C_{H_2O}$  – *Clearance* de água livre;

$C_{osm}$  – *Clearance* osmolar;

CP - carboxipeptidase;

CTL- Controle

ECA - enzima conversora de angiotensina (tipo 1);

ECA2 - enzima conversora de angiotensina (tipo 2);

EROS - Espécies reativas de oxigênio;

DPEc - Dimetil pirocarbonato;

FE - Fração de Excreção;

$FE_{H_2O}$  - Fração de excreção de água;

FF - Fração de Filtração;

FPR - Fluxo Plasmático Renal;

FR - Fração de Reabsorção;



FU - Fluxo Urinário;

$\gamma$ -GT – Enzima Gama Glutamil Transferase;

GT- Gentamicina;

Ip – Intraperitoneal;

IRA - Insuficiência Renal Aguda;

NEP - endopeptidase neutra;

NTA - Necrose Tubular Aguda;

PAH - Para-Amino-Hipurato de Sódio;

PCR - “polimerase chain reaction”;

PCP, prolil-carboxipeptidase;

PEP - prolil-endopeptidase;

QE - Quantidade Excretada;

QR - Quantidade Reabsorvida;

RFG - Ritmo de Filtração Glomerular;

Sc – Subcutâneo

SOD - Superóxido dismutase

SRA - Sistema Renina-Angiotensina;

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01-** Estrutura química da gentamicina.

**Figura 02-** Sistema renina-angiotensina, mostrando a formação de peptídeos a partir do angiotensinogênio através de enzimas conversoras (ECA e ECA2) e ações dos receptores (AT1, AT2 e Mas) destes peptídeos.

**Figura 03-** Detalhamento do protocolo de indução de NTA (Período experimental) pelo uso de gentamicina.

**Figura 04-** Curva dose-resposta para o efeito da angiotensina(1-7) sobre o fluxo urinário em ratos normais.

**Figura 05** - Protocolo para avaliar o efeito de diferentes substâncias sobre a função renal em ratos com NTA pelo uso de gentamicina.

**Figura 06** - Peso corporal e peso dos rins direito e esquerdo de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 07** - Ingestão diária de água em ratos durante 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 08** - Pressão arterial sistólica (PAS) em ratos tratados com gentamicina durante 5 dias.

**Figura 09-** Concentração plasmática de creatinina e ritmo de filtração glomerular em ratos durante 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 10** - Fluxo urinário em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 11** - Fração de excreção de água em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 12** - Proteinúria em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 13**- Razão proteína/creatinina urinárias (UP:C) ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 14** - Excreção urinária da enzima gama-glutamil-transferase ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 15** - Fração de excreção de sódio (A) e de potássio (B) ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 16** - Corte histológico de rins de ratos CTL (aumento 20 e 60 vezes) e de ratos tratado com gentamicina (aumento 20 e 60 vezes).

**Figura 17** - Efeito da angiotensina(1-7) sobre o fluxo plasmático renal em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 18** - Efeito da angiotensina(1-7) sobre o ritmo de filtração glomerular em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 19** - Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de filtração em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 20** - Efeito da angiotensina(1-7) sobre o fluxo urinário em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 21** - Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de excreção de água em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 22.-** Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de excreção de sódio em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 23 -** Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de excreção de potássio em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 24 -** Efeito da angiotensina(1-7) sobre o *clearance* osmolar em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 25 -** Efeito da angiotensina(1-7) sobre o *clearance* de água livre em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 26 -** RNA mensageiro que codifica renina e angiotensinogênio em rins de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 27-** RNA mensageiro que codifica ECA e ECA 2 em rins de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 28-** RNA mensageiro que codifica os receptores AT1 e Mas em rins de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Figura 29 -** Possíveis efeitos que o aumento dos níveis renais de RNAM que codifica a enzima ECA e o receptor AT1 poderia desencadear em ratos com NTA induzida por gentamicina.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Proteínas e suas respectivas referências, na base de dados NCBI, onde a seqüência do RNA mensageiro foi pesquisada.

**Tabela 2-** Seqüência de DNA dos pares de “primers” utilizados para amplificação do cDNA das proteínas avaliadas neste estudo.

**Tabela 3-** Concentração plasmática e urinária de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , osmolalidades urinária e plasmática, concentrações plasmática e urinária de creatinina e relação U/P de creatinina em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

**Tabela 4-** Razões  $\text{UPNa}^+$ ,  $\text{UPK}^+$ ,  $\text{UPNa}^+/\text{UP}_{\text{creatinina}}$  e  $\text{UPK}^+/\text{UP}_{\text{creatinina}}$ , em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

## LISTA DE QUADRO

**Quadro 1** – Grupos experimentais após tratamento com Gentamicina e infundidos com diferentes substâncias

## RESUMO

A gentamicina (GT), um fármaco da família dos aminoglicosídeos, é comumente usada na clínica médica, por ser efetiva no combate às infecções causadas por bactérias Gram-negativas. No entanto, seu uso é restrito, já que induz nefrotoxicidade caracterizada por necrose tubular, principalmente, no túbulo proximal. Alguns autores tem tentado relacionar a lesão renal induzida pela gentamicina a vários fatores, tais como formação de espécies reativas de oxigênio, síntese de endotelinas, formação excessiva de óxido nítrico (NO) ou ainda pela ativação da via vasoconstritora do sistema renina angiotensina (SRA). A Ang(1-7) é um peptídeo vasoativo do SRA e diversas evidências mostram que esse peptídeo apresenta características importantes que lhe conferem um papel chave na fisiologia do SRA, contrarregulando as ações da Ang II. Nesse sentido, este trabalho visa avaliar os parâmetros da função renal, em ratos com necrose tubular aguda (NTA) induzida pela GT sob a infusão de Ang(1-7). Para tanto, ratos Wistar machos, foram mantidos em gaiolas metabólicas (GM) e receberam GT (80 mg/Kg/dia, sc, n=30), por 5 dias ou receberam NaCl 0,9% (CTL, 1ml/Kg/dia, sc, n=33). A GT induziu lesão renal caracterizada pela queda do RFG, aumento da creatinina plasmática, proteinúria, aumento da excreção urinária da gama-GT e da fração de excreção de  $K^+$  com redução da concentração plasmática desse íon. A histologia confirmou a necrose tubular. Ao término do tratamento, os ratos foram divididos em 8 grupos: a) CTL-CTL, ratos normais infundidos com salina (n=7); b) CTL-Ang(1-7) ratos normais infundidos com Ang(1-7) (100pmoles/100g/min, n=10); c) CTL-A779, ratos normais infundidos com A779 (1nmol/100g/min, n=7); d) CTL-Ang(1-7) - A779, ratos normais infundidos com a combinação de Ang(1-7) + A779 (n= 6); e) GT-CTL, ratos com NTA infundidos com salina (n=7); f) GT-Ang(1-7), ratos com NTA infundidos com Ang(1-7) (100pmoles/100g/min; n=10); g) GT-A779, ratos com NTA infundidos com A779 (1nmol/100g/min; n=8); h) GT-Ang(1-7)-A779, ratos com NTA infundidos com a combinação de Ang(1-7) + A779 (n=8). Os ratos foram anestesiados (tiopental, 40 mg/Kg), os vasos femorais e a bexiga foram canulados. As substâncias foram infundidas a uma taxa de 30  $\mu$ l/min, por 1h. Amostras de urina (20 min cada) e de plasma foram coletadas. Os parâmetros renais avaliados foram FPR, RFG, FF, FU, FEH<sub>2</sub>O, FENa<sup>+</sup>, FEK<sup>+</sup>, C<sub>osm</sub>, CH<sub>2</sub>O. Nos animais normais a Ang(1-7) promoveu aumento apenas da FF, do FU e da FEH<sub>2</sub>O. Em ratos com NTA, a Ang(1-7) reduziu o FPR. O A779 promoveu queda do RFG e aumento da FEH<sub>2</sub>O e da FEK<sup>+</sup> nos ratos CTL, mas não afetou nenhum parâmetro renal nos animais GT. A análise da expressão renal de componentes do SRA, nos animais com NTA, revelaram aumento da expressão tecidual do RNAm para a ECA e para o AT1, mas não houve aumento da expressão gênica para a ECA<sub>2</sub>, para o receptor Mas, nem para a renina. Estes resultados indicam exacerbação da via vasoconstritora do SRA em animais com NTA induzida por gentamicina e que a infusão da Ang(1-7), quando a NTA já está instalada, exibe apenas efeito hemodinâmico, pouco interferindo nos parâmetros tubulares renais, nesse modelo de lesão renal aguda.

## ABSTRACT

Gentamicin (GT), an aminoglycoside is often used against Gram-negative bacteria-induced infections. However, its use is restricted due to nephrotoxicity which is characterized by tubular necrosis mainly at proximal tubular level. Some authors have attempted to relate the GT-induced renal injury to factors, such as formation of reactive species of oxygen, synthesis of endotelins, release of nitric oxide (NO) and the activation of the vasoconstrictor axis of the renin angiotensin system (RAS.). Ang(1-7) is a vasoactive peptide of RAS. Some evidences have shown that Ang(1-7) has important features as a key in the physiology of RAS, counterregulating the actions of Ang II. The aim of this study was to evaluate the renal parameters in rats with GT-induced acute tubular necrosis (ATN) under Ang (1-7) infusion. Male Wistar rats were kept in metabolic cages and received GT (80 mg/Kg/day, sc, n=30), for 5 days or NaCl 0.9% (CTL, 1ml/Kg/day, sc, n=33). GT- induced renal injury was characterized by GFR decrease, plasma creatinine increase, proteinuria and increase in the urinary excretion of gama-GT and fractional excretion of  $K^+$  with a concomitant reduction in the plasma  $K^+$ . Histological analysis confirmed the tubular necrosis. At the end of treatment, rats were divided into 8 groups: ) CTL CTL, normal rats were infused with NaCl 0.9% (n=7); b) CTL Ang(1-7), normal rats were infused with Ang(1-7) (100pmoles/100g/min, n=10); c) CTL A779, normal rats were infused with A779 (1nmol/100g/min, n=7); d) CTL Ang(1-7) A779, normal rats were infused with a combination of Ang(1-7) + A779 (n= 6); e) GT CTL, rats with NTA were infused with NaCl 0.9% (n=7); f) GT Ang(1-7), rats with NTA were infused with Ang(1-7) (100pmoles/100g/min; n=10); g) GT A779, rats with NTA were infused with A779 (1nmol/100g/min; n=8); h) GT Ang (1-7) + A779, rats with NTA were infused with a combination of Ang(1-7) + A779 (n=8). Rats were anesthetized (tiopental, 40 mg/Kg), the femoral vessels and the bladder were cannulated. Substances were infused at rate of 30  $\mu$ l/min, for 1h. Samples of urine (20 min each) and of plasma were collected. The renal parameters evaluated were: RPF, GFR, FF, UF, FEH<sub>2</sub>O, FENa<sup>+</sup>, FEK<sup>+</sup>, Cosm, CH<sub>2</sub>O. In the normal rats, Ang(1-7) produced an increase only FF, UF and FEH<sub>2</sub>O. In the rats with ATN, Ang(1-7) reduced RPF. A779 decreased the RFG and increased FEH<sub>2</sub>O and FEK<sup>+</sup> in normal rats and had no effect on renal parameter in animals GT. Analysis of the renal expression of components of RAS showed an increase in the renal expression of ACE and AT1 receptors messenger RNA that in the rat with ATN. Any change in the renal expression of ACE2, Mas receptor and renin messenger RNA was detectable. Our results indicate that may occur an exacerbation of the vasoconstrictor axis of RAS, ACE-ANG II-AT1 in the GT-induced NTA and that Ang(1-7) after ATN installation would not greatly affect renal parameters in this model of acute renal injury.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Insuficiência Renal Aguda

Os rins exercem inúmeras funções, as quais incluem eliminação de produtos metabólicos, regulação do balanço hidroeletrólítico, do equilíbrio ácido-básico e da pressão sanguínea. Quando os rins diminuem sua atividade ou mesmo param de funcionar, é desencadeado um quadro denominado insuficiência renal. A insuficiência renal aguda (IRA) caracteriza-se por uma redução rápida da função renal, resultando na incapacidade dos rins em exercer suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostase hidroeletrólítica do organismo (Brenner e cols., 2000).

A IRA é reversível independentemente da etiologia e leva ao acúmulo de substâncias nitrogenadas (uréia e creatinina) acompanhado ou não de diminuição da diurese (Conger, 1998). A redução abrupta do ritmo de filtração glomerular (RFG) e do fluxo sanguíneo renal (FSR) decorrente, entre outros, da intensa vasoconstrição intrarenal, é o ponto crucial da IRA (Nissensson, 1998). Este autor relatou, portanto esses fatores como sendo os mais importantes no início e na manutenção da IRA: queda da permeabilidade do capilar glomerular, *back-leak* do filtrado glomerular, obstrução tubular e vasoconstrição intrarrenal. Mas, os mecanismos pelos quais muitas alterações observadas na IRA ocorrem, ainda não foram esclarecidos.

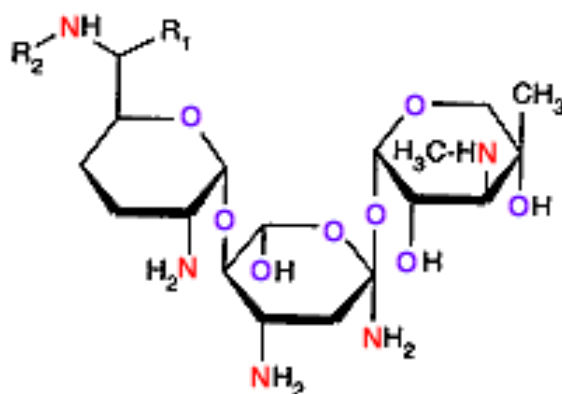
Diante da dificuldade de se investigar, em humanos, os mecanismos pelos quais a insuficiência renal se instala e evolui, diversos pesquisadores têm desenvolvido e empregado modelos experimentais, utilizando animais, com o objetivo de se reproduzir um quadro de insuficiência renal (Chen e cols., 2003; Zhou e cols., 2000). Dentre os modelos utilizados, inclui-se a IRA induzida por antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina. O nome aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central. Os aminoglicosídeos são altamente solúveis em água, estáveis em pH 6 a 8 e possuem estrutura polar catiônica, o que impede a sua



absorção oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular ou através da barreira hematoencefálica (Oliveira e cols., 2006).

## 1.2 Nefrotoxicidade induzida Pela Gentamicina

A gentamicina (Fig. 1), dentre outros efeitos, apresenta ação nefrotóxica levando ao desenvolvimento de insuficiência renal (Kadkhodaei e cols., 2007; Kadkhodaei e cols., 2005; Bledsoe e cols., 2006; Ghaznavi e cols., 2005; Rogers e cols., 1987 e Watson e cols., 1987).



**Figura 1.** – Estrutura química da gentamicina ( $C_{21}H_{43}N_5O_7$ ).

O efeito nefrotóxico da gentamicina é maior quando a droga é administrada de forma fracionada do que quando usada em dose única (Oliveira e cols., 2001). Além disso, Nakano e Ogawa (1982), observaram maior nefrotoxicidade em camundongos quando a gentamicina foi administrada no período de repouso, do que no período de atividade. O grupamento amina é que confere a toxicidade do aminoglicosídeo, de modo que quanto maior o número de aminas maior a toxicidade do antibiótico. A gentamicina quando comparada a outros aminoglicosídeos apresenta maior nefrotoxicidade em relação, por exemplo, à netilmicina e à trobamicina (Cojocel e cols. 1984).

### 1.3 Necrose Tubular Aguda

A lesão renal induzida pela administração aguda de gentamicina é caracterizada pela necrose tubular aguda (NTA) localizada principalmente no túbulo proximal (Parsons e cols., 2000). Esta lesão é uma das alterações estruturais mais comuns associadas ao desenvolvimento da IRA. Algumas alterações decorrentes do uso da gentamicina são indicadores de lesão renal das células tubulares. Por exemplo, o nível plasmático aumentado de creatinina e a presença enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) na urina são fortes indicadores de NTA (Stoycova e cols., 1983; Hofmeister e cols., 1986; Cuzzocrea e cols., 2002; Ekor e cols., 2006), sendo a detecção de  $\gamma$ -GT urinária um marcador precoce da lesão tubular. Uma redução na concentração plasmática de  $K^+$  (Silan e cols., 2007), bem como um aumento na fração de excreção de  $Na^+$  (Volpini e cols. 2004; Cuzzocrea e cols., 2002; De-Barros-e-Silva e cols. 1992) e também de  $K^+$  (Volpini e cols. 2004; De-Barros-e-Silva e cols. 1992), têm sido relatados em ratos tratados com gentamicina. As causas para o desenvolvimento da lesão renal induzida pela gentamicina podem ser várias. Por exemplo, tem sido proposto que espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ser os agentes causadores da morte celular em diferentes estágios patológicos da insuficiência renal (Fantone e Ward, 1982; Weiss e Lobuglio; 1982; Halliwell e Gutteridge, 1990). A evolução de EROS pode, ainda, estimular a ativação ou expressão de mediadores proinflamatórios o que contribuiria para o desenvolvimento progressivo da lesão renal induzida pela gentamicina (Park e cols., 2009).

Aumento cortical de fosfolipidose, causado pela inibição de enzimas responsáveis pelo metabolismo de fosfolipídios (Laurent e cols. 1982), inibição ou perda da integridade da enzima  $Na^+-K^+$  ATPase (Fukuda e cols., 1991), alterações das enzimas lisossomais e lesão das mitocôndrias, ativação do SRA (Hishida e cols., 1994), assim como o aumento da síntese de tromboxano  $A_2$  (Papanikolaou e cols, 1992) e de prostaglandina (Assael e cols. 1985) também tem sido sugeridos como mecanismos responsáveis pela toxicidade renal causada pela gentamicina.

A resposta inflamatória e fibrogênica associada ao aumento dos níveis do fator de crescimento tumoral (TGF)-  $\beta$ , endotelina e angiotensina II, durante o tratamento com

gentamicina foram implicados na progressão da necrose tubulointersticial (Park e cols., 2009). A indução apoptótica, pelo uso da gentamicina também tem sido proposta como um importante mecanismo citotóxico nos túbulos proximais e nas células mesangiais em animais tratados com este antibiótico (El Mouedden e cols., 2000). Espécies reativas de oxigênio são importantes mediadores da apoptose induzida pela gentamicina (Ali, 2003).

Na doença renal progressiva incluindo a nefropatia induzida pela gentamicina, a inflamação renal caracterizada pela infiltração de células tais como monócitos/macrófagos e miofibroblastos, tem sido associado ao processo de evolução das doenças renais (Schlondorff, 2008).

A partir do conhecimento dos possíveis mecanismos que induzem a nefrotoxicidade pelo uso de gentamicina mais de 200 trabalhos já foram publicados, cujo foco principal é a avaliação do efeito renoprotetor de diversas substâncias. Grande parte desses trabalhos leva em consideração o mecanismo de indução da lesão renal pela formação de radicais livres e nesse sentido usam substâncias antioxidantes como a L-carnitina (Kopple e cols. 2002), o resveratrol (Silan e cols., 2007), o curcumin (Farombi e Ekor, 2006), aminoguanidina (Polat e cols., 2006), o ebselen, um composto derivado do selênio (Dhanarajan e cols., 2006), N-acetylcysteine (Mazzon e cols. 2001), ácido caféico éster-fenetil (Vardi e cols., 2005), carnosina (Soliman e cols., 2007), ou ainda a co-administração de vitaminas E e C que reduz a nefrotoxicidade induzida por gentamicina, preservando o RFG e prevenindo o aumento na excreção urinária da  $\gamma$ -GT (Kadkhodae e cols., 2005). Além do uso direto de substâncias antioxidantes, alguns autores tem usado drogas que mimetizam a enzima superóxido dismutase, neutralizando as ações dos radicais livres. Essa substância chamada M40403 atenua os efeitos colaterais da gentamicina (Cuzzocrea e cols. 2002). Há trabalhos sugerindo que a formação do óxido nítrico (NO), com sabida, ação vasodilatadora, também apresenta efeito renoprotetor (Can e cols., 2000; Sen e cols. 2000; Ghaznavi e cols., 2005; Seçilmiş e cols., 2005; Ghaznavi e Kadkhodae, 2007;). Alguns estudos fornecem evidências de que a atividade de eNOS leva à restauração da função renal após a lesão (Ghaznavi e Kadkhodae, 2007). Por outro lado, a ativação de iNOS, durante a lesão renal causa citotoxicidade e agrava a insuficiência renal. De modo que, o aumento na formação do peroxinitrito, nitração da proteína tirosina e aumento na produção de radicais hidroxila podem

contribuir para a evolução de lesões renais induzidas pela gentamicina (Klahr, 1998), indicando que em altas concentrações o NO pode apresentar um efeito maléfico para os rins.

Além desses compostos com ação renoprotetora, Singh e cols. (2009) verificaram que o extrato aquoso de *Andrographis paniculata*, uma planta asiática com ação antiinflamatória, apresentou efeito renoprotetor em ratos com NTA induzida por gentamicina.

#### 1.4 O Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema importante na regulação central e periférica da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico. A ativação do SRA culmina com a formação de peptídeos ativos como a angiotensina II (Ang II) e a angiotensina(1-7) (Ang(1-7)). Esse sistema é formado por uma cascata de reações enzimáticas (Fig. 2), onde a enzima renina hidrolisa o angiotensinogênio formando o decapeptídeo, angiotensina (Ang I) que, por sua vez, sofre proteólise limitada pela enzima conversora de angiotensina I (ECA), altamente expressa no endotélio vascular pulmonar, formando o octapeptídeo Ang II (Dostal e Baker, 1999). A ECA é expressa também, em células endoteliais do sistema cardiovascular e do sistema reprodutor. Assim, podemos considerar como principais componentes do SRA, o angiotensinogênio, a renina, a Ang I, a ECA, a Ang II e, face aos achados recentes, a Ang-(1-7). A Ang II exerce ações fisiológicas importantes como vasoconstrição, liberação de aldosterona, aumento da reabsorção tubular renal e aumento da secreção de vasopressina, (Timmermans e cols., 1993). Recentemente, uma outra enzima, a ECA2, uma homóloga da ECA, foi caracterizada em humanos. Essa enzima é uma carboxipeptidase que remove um aminoácido (Leu) da Ang I gerando a angiotensina(1-9) (Ang(1-9)) e degrada a Ang II em Ang(1-7). Essa carboxipeptidase parece ser essencial na regulação da função cardíaca e também está implicada em doenças cardiovasculares (Coates, 2003; Oudit e cols., 2003). Pela ação de carboxipeptidases, da catepsina A e da ECA2, a Ang I também pode ser degradada em Ang(1-9) que, por sua vez, pode ser degradada em Ang(1-7). Uma vez formada, a Ang II pode originar basicamente três peptídeos, ou

seja, pela proteólise por aminopeptidases, ela pode gerar angiotensina(2-8) (Ang III) e angiotensina(3-8) (Ang IV) e pelas ações da prolil-endoropeptidase, prolilcarboxipeptidase e ECA2, a Ang II pode gerar o heptapeptídeo Ang(1-7) (Fig. 2) (Chappel e cols., 1998; Santos e cols., 2000).

Existem dois subtipos principais de receptores para a Ang II farmacologicamente definidos e clonados: receptores AT1, e receptores AT2, caracterizados inicialmente por Whitebread e cols. (1989) e Chiu e cols. (1989). Esses receptores, com sete domínios transmembranas são acoplados à proteína G sendo a ligação do receptor AT2 fraca, quando comparada à ligação do receptor AT1 (Touyz e Berry, 2002; Campbell, 2003). Ações fisiológicas importantes da Ang II são mediadas por esses receptores, os quais predominam no controle de diversos efeitos induzidos por esse peptídeo (Matsusaka e Ichikawa, 1997). Entre esses, pode-se citar vasoconstrição, liberação de aldosterona, aumento da reabsorção tubular renal, aumento da secreção de vasopressina, aumento da frequência cardíaca, crescimento e proliferação celular, aumento da contratilidade cardíaca, facilitação da liberação de catecolamina da terminação nervosa e absorção renal de sódio e água (Timmermans e cols., 1993). O receptor AT1 está amplamente distribuído em tecidos de vasos sanguíneos, coração, rim, glândula adrenal, fígado, cérebro e pulmão. Antagonistas dos receptores AT1, como o losartan e valsartan são fármacos anti-hipertensivos que atuam inibindo o SRA. (Jerkic e cols., 2004, Ortiz e cols., 2001).

A segunda maior isoforma de receptor de Ang II, o AT2, é normalmente expressa em altos níveis nos tecidos fetais e diminui rapidamente após o nascimento. Ao contrário dos receptores AT1, as funções dos receptores AT2 não estão bem esclarecidas podendo, quando ativados pela Ang II, desempenhar funções que se contrapõem às do receptor AT1, tal como promover vasodilatação. O receptor AT2 também pode ser afetado, em adultos, por danos vasculares e cardíacos e durante processos de cicatrização e obstrução renal, o que sugere o envolvimento desses receptores no remodelamento, crescimento e desenvolvimento tecidual. De Souza e cols. (2004) relataram que a Ang II e a Ang(1-7) inibem a atividade da enzima  $\text{Na}^+$ , ATPase por uma via acoplada ao receptor AT2. Em adultos, o receptor AT2 está presente no pâncreas, coração, rim, adrenais, miométrio, ovário e cérebro.

## 1.5 Angiotensina (1-7)

A primeira evidência demonstrando a ação biológica da Ang(1-7) foi feita por Schiavone e cols. (1988), que verificaram que a Ang(1-7) é equipotente à AngII, quanto à liberação central de vasopressina. A Ang(1-7) é um heptapeptídeo biologicamente ativo (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro), do SRA e que pode ser formada pela quebra da ligação Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> da Ang I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, através da ação de enzimas como a prolil-endopeptidase (PEP) descrita por Greene e cols. (1982) , pela endopeptidase neutra (NEP), ou ainda por uma nova via no qual a Ang 1-7 é formada a partir da enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2) descoberta por Donaghue e cols., (2000) e Tipnis e cols. (2000). A sequência genômica dessa enzima apresentou várias semelhanças estruturais com o gene da ECA humana, por isso, foi denominada ECA2 (Fig2). A ECA2 difere da ECA por atuar como uma carboxipeptidase (CP) e não como dipeptidilcarboxipeptidase (ECA) e por não ser bloqueada pelo uso de inibidores convencionais da ECA (Rice e cols. 2004). Em animais intactos (Chappell e cols., 2004) verificaram que a inibição da ECA ou bloqueio do receptor AT1 aumentaram os níveis plasmáticos e cardíacos da ECA2.

A ECA2 pode degradar diretamente a Ang II em Ang-(1- 7) e converter Ang I em angiotensina-(1-9), que pode ser clivada pela ECA em Ang-(1-7) ou pela ação de outras peptidases (Rice e cols., 2004).

Assim, a Ang II pode ser convertida diretamente em Ang (1-7) pela ação da ECA2 e também pela enzima prolilendopeptidases (PEP) e pela prolilcarboxipeptidase (PCP). Estudos têm demonstrado, que em rim de ratos o RNA mensageiro da ECA2 foi detectado em quase todos os segmentos do néfron, estando ausente apenas na porção ascendente fina da alça de Henle, com altos níveis no túbulo proximal (Li e cols., 2005). A Ang-(1-7) pode ser hidrolizada pela ECA formando a angiotensina-(1-5) e a angiotensina-(1-3). Esta parece ser uma importante via de inativação da Ang- (1-7) circulante e possivelmente também da forma tecidual desse peptídeo (Yamada e cols., 1998). Diversas evidências mostram que a Ang(1-7) apresenta características importantes que lhe conferem um papel chave na fisiologia do SRA podendo contraregular as ações da Ang II (Santos e cols., 2000). Os efeitos da Ang(1-7) são mediados

pelo receptor Mas (Van't Veer e cols., 1993; Villar e Pedersen, 1994, Santos e cols., 2006). Este receptor foi descrito inicialmente em células tumorais (Young e cols., 1986) e encontra-se acoplado à proteína G (Santos e cols., 2003). A ativação *in vitro* do receptor Mas exibe propriedades antagônicas diretas do receptor de AngII, o AT1 (Kostenis e cols. 2005). As ações desencadeadas pela ativação do receptor Mas são semelhantes às aquelas apresentadas pela ativação do receptor AT2 de Ang II (Fig. 2). Na ausência ou bloqueio do receptor Mas, vários efeitos da Ang(1-7) são abolidos (Ferreira e cols., 2007, Castro e cols., 2006; Santos e Ferreira, 2006, Santos e Baracho, 1992). Em ensaios com radioligantes verificou-se que o antagonista específico da Ang-(1-7), o D-alanina<sup>7</sup>-Ang(1-7), chamado de A779, apresenta baixa afinidade pelos receptores de Ang II (AT1 e AT2) (Santos e cols., 1994). Handa (2000) ao analisar tecido hepático e de medula da adrenal em ratos, reafirmou em seus experimentos a baixa afinidade do A779 tanto para o receptor AT1 quanto para o AT2. E que, nestes tecidos, a Ang (1-7) apresenta afinidade pelos receptores AT1 e AT2 apenas em altas concentrações micromolares.

Estudos sugerem que a Ang-(1-7) tem efeito vasodilatador tanto em tecido intrarrenal quanto em tecidos extrarrenais. Exercendo este efeito pela produção de óxido nítrico, de prostaglandinas ou ainda de fatores de relaxamento endotélio-dependente (Brosnihan e cols., 1996; Heitsch e cols., 2001). Pode ainda, inibir a proliferação celular muscular e a trombogênese, (Rajendran e cols., 2005; Kucharewicz e cols., 2002). Além dessas, a Ang (1-7) age potencializando o efeito vasodilatador da bradicinina (Brosnihan e cols., 1996; Lima e cols., 1997; Heitsch e cols., 2001; Rajendran e cols., 2005;). O efeito vasodilatador da Ang (1-7) foi abolido em linhagens de camundongos *knockout* para a ECA2 que apresentaram aumento significativo da pressão sanguínea, na ausência dessa enzima (Gurley e cols., 2006). Desse modo, a ECA2, por favorecer o efeito vasodilatador pela formação de Ang(1-7) pode apresentar ações protetoras tanto da função renal quanto da função cardíaca, além de contrarregular as ações da AngII (Ingelfinger, 2009). A descoberta da ECA2 e a geração de genes “*knockouts*” para esta enzima e para o receptor Mas despertaram o interesse do papel de Ang(1-7) na patofisiologia renal (Santos e cols., 2006; Dilauro e Burns, 2009).

Análise de rim de ratos demonstrou que injeções intraperitoneais de Ang (1-7) nas doses de 20 e 50 nmol/kg induziram a formação de espécies reativas de oxigênio (Eros), pela redução da atividade tanto da superóxido dismutase (SOD) quanto na atividade da glutathione peroxidase (Gonzales e cols., 2002).

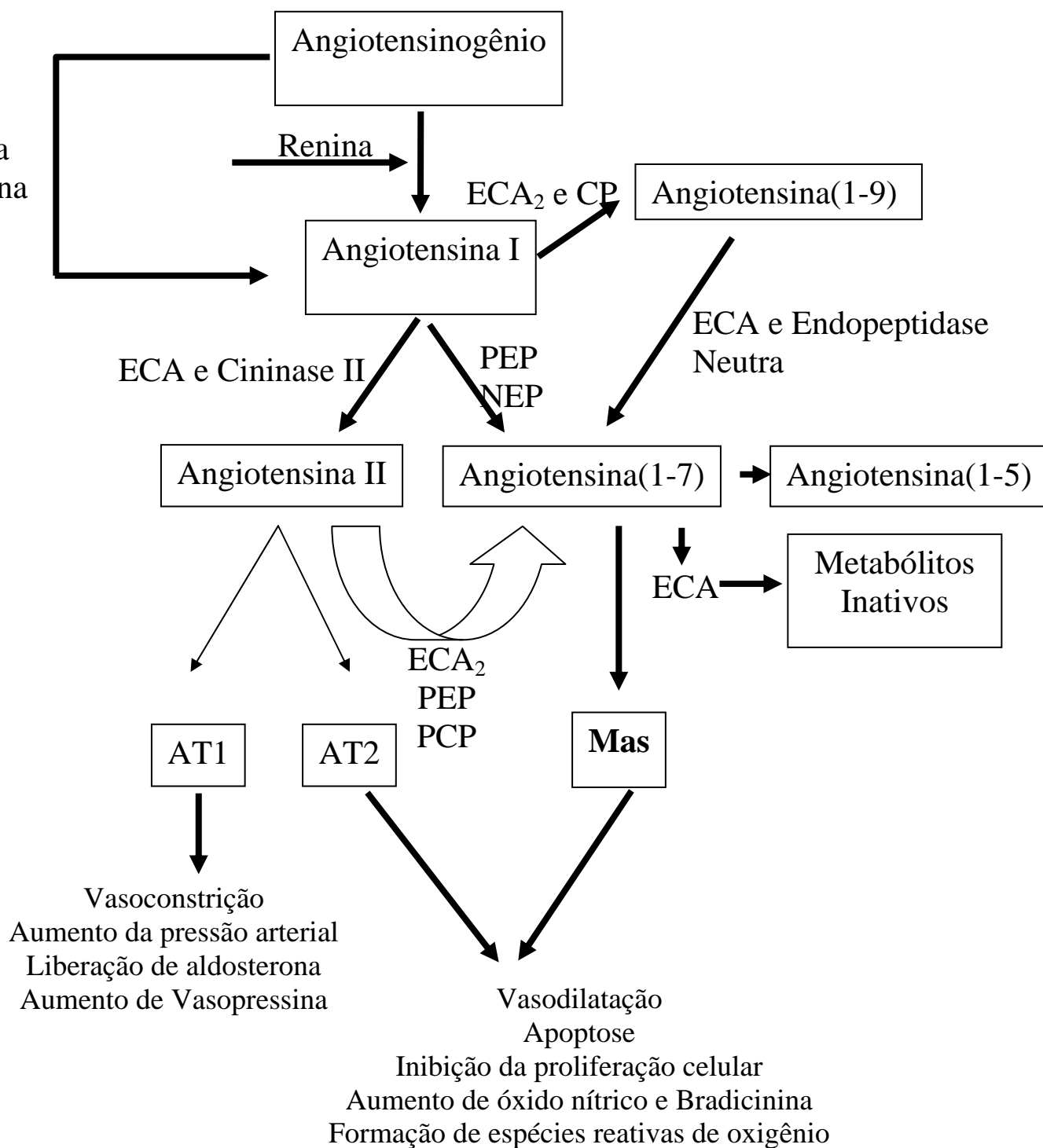
Quanto ao equilíbrio hidroeletrolítico, a Ang(1-7) promoveu diurese seguida de natriurese em ratos anestesiados (Handa e cols 1996), mas Santos e Baracho (1992) descreveram efeito antidiurético desse peptídeo em ratos acordados e com sobrecarga hídrica, resultados estes confirmados pelo uso de antagonista seletivo de Ang(1-7), o A779 que aumentou a diurese em animais com sobrecarga hídrica (Santos e cols., 1996; Simões e Silva e cols.1998). Joyner e cols. (2008a) verificaram que a Ang (1-7) produziu antidiurese associada à “*upregulation*” de AQP1, enquanto em ratas lactantes a Ang(1-7) causou diurese com “*dowregulation*” de AQP1. Nesse sentido, a Ang(1-7) pode promover diurese ou antidiurese, apresentando efeito bifásico na absorção de fluidos no túbulo proximal (Garcia e Garvin, 1994).

## 1.6 Necrose Tubular Aguda (NTA) E O Sistema Renina Angiotensina

O SRA tem um importante papel na progressão de lesões renais, mas o seu envolvimento na NTA é pouco conhecido (Harris e Martinez-Maldonado, 1995). Além disso, poucos trabalhos relatam algum tipo de envolvimento do SRA com a NTA, induzida por gentamicina.

Ortega e cols. (2005) tentaram mostrar uma correlação ente SRA e NTA induzida pela gentamicina . Nesse aspecto, eles mostraram que a diminuição na função renal e o aumento na expressão da proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), que é um fator mitogênico de células renais, observados na NTA induzida por gentamicina, depende do SRA. Esses efeitos foram abolidos pelo bloqueador de receptor AT1 de Ang II, o losartan. Foi também observado que a afinidade da Ang II pelo receptor AT1 do glomérulo não era afetada pelo tratamento com gentamicina, embora a densidade do receptor tenha sido menor no glomérulo dos ratos tratados com o antibiótico (Esquerro e cols., 1995).





**Figura 2.** Vias enzimáticas do sistema renina-angiotensina mostrando a formação de peptídeos, a partir do angiotensinogênio, através de enzimas conversoras (ECA e ECA2 e ações dos receptores (AT1, AT2 e Mas) destes peptídeos. CP, carboxipeptidase; ECA, enzima conversora de angiotensina I; ECA2, enzima conversora de angiotensina (tipo 2); NEP, endopeptidase neutra; PCP, prolilcarboxipeptidase; PEP, prolilendopeptidase.

Também, a atividade de renina no glomérulo não foi afetada pelo tratamento com gentamicina. Blantz (1980) demonstrou que a Ang II, participa na regulação ativa do RFG através da capacidade de influenciar e regular o fluxo plasmático renal e reduzir o Kf. Este dado sugere uma importante participação do SRA na patogênese da NTA (Thureau e cols. 1976) já que a redução do Kf está relacionada à redução do RFG. Assim, entender a participação do SRA no processo de instalação e manutenção da NTA tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores.

Em relação à liberação de renina em animais com NTA induzidas por gentamicina Nakajima e cols., (1994) relataram aumento significativo desta enzima no córtex renal quando administraram gentamicina 40 mg/Kg/dia, por 13 dias. Neste mesmo ano, no entanto, resultados obtidos por Fernández-Repollet e Fantauzzi, sugerem que a gentamicina (4mg/Kg/dia) tem efeito inibidor sobre a liberação de renina glomerular. Altas doses de gentamicina (120mg/Kg/dia) produziram aumento significativo da atividade da renina plasmática e uma simultânea redução do RFG em ratos (Luft e Evan, 1980). Esses autores atribuíram a queda do RFG às alterações morfológicas na barreira de ultrafiltração observadas neste modelo experimental de indução de NTA.

Estudos têm demonstrado, que o bloqueio da AngII, pelo uso do antagonista do receptor AT1, losartan, causa uma melhora significativa da função renal após indução de IR pela gentamicina em ratos (Ortega e cols., 2005).

Alguns estudos têm demonstrado que o uso de substâncias que suprimem a atividade do SRA podem melhorar a função renal em ratos que desenvolveram NTA pelo uso da gentamicina. A enzima conversora de Angiotensina (ECA) tem importante papel no SRA, pois participa não apenas, na formação de AngI, que será convertida na sua forma ativa vasoconstritora, a AngII, mas também é responsável pela degradação de bradicinina, que tem reconhecida ação vasodilatadora. O uso de captropil, um bloqueador da ECA tem efeito benéfico pelo aumento deste potente vasodilatador renal, bem como pela inibição do efeito vasoconstritor da Angiotensina II (Luft e cols., 1982). Schor e cols (1981) demonstraram que o uso deste mesmo bloqueador de ECA melhorou tanto a redução do RFG quanto a redução do Kf induzidas pela administração de gentamicina na dose de 40mg/kg/dia em ratos Wistar. Além desses, o uso de outros

inibidores como Perindopril, um potente inibidor específico da ECA inibiu o desenvolvimento da NTA pelo uso deste antibiótico (Morin e cols., 1989) e o acetato de desoxycorticosterona (DOCA) mais ingestão de salina, também atenuou a queda do RFG, mas não reduziu a severidade da necrose tubular causada pela gentamicina (Yamada e cols, 1992; Hishida e cols., 1994).

Além do bloqueio do SRA outros sistemas parecem estar envolvidos na manutenção ou proteção das complicações decorrentes do uso de gentamicina. Estudos têm mostrado que agentes vasodilatadores, tais como metabólitos do ácido araquidônico (AA) e agentes vasodilatadores como algumas prostaglandinas (PGs), tem importante papel no desenvolvimento (AA) ou prevenção (PGs) da NTA induzida por esse aminoglicosídeo (Papinokolau e cols., 1992).

Como já mencionado anteriormente, a nefrotoxicidade da gentamicina parece estar relacionada à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células renais (Reiter e cols., 2002; Al-Majed e cols., 2002). As EROs produzem lesão celular e necrose por vários mecanismos, incluindo peroxidação das membranas lipídicas, denaturação de proteínas e lesão do DNA (Dean e cols., 1991). Conforme citado anteriormente, a Ang(1-7) induz a formação de EROs, em rim de rato, pela redução da atividade tanto da superóxido dismutase (SOD), como da glutational peroxidase (Gonzales e cols., 2002).

Pelo exposto, fica evidente o envolvimento de elementos do eixo vasoconstritor do SRA e de EROs na NTA encontrando a participação, tanto da renina, quanto da Ang II nas lesões renais já bem descritas.

Neste estudo, a NTA induzida pelo antibiótico gentamicina, foi o modelo de escolha. Esse modelo apresenta as seguintes vantagens: i) o processo de indução da NTA não é invasivo; ii) para a investigação de possíveis efeitos agudos sobre a função renal, de componentes do SRA, os animais são submetidos a apenas um procedimento cirúrgico; iii) as alterações observadas na NTA induzida pela gentamicina são bastante reprodutíveis e iv) a gentamicina é um fármaco de baixo custo e de fácil manuseio.

Com relação ao envolvimento do eixo vasodilatador do SRA, Ang(1-7)-Mas, na instalação e desenvolvimento da NTA induzida por gentamicina, nenhum relato foi

encontrado na literatura. Por isso, o foco principal de investigação, do nosso trabalho, é o efeito da infusão de Ang(1-7) sobre a função renal em ratos com NTA induzida pela gentamicina.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar o efeito da infusão aguda de Angiotensina (1-7) sobre os parâmetros renais em ratos com necrose tubular aguda induzida pela gentamicina.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Implantar e validar o modelo de necrose tubular aguda induzida por gentamicina;
- b) Determinar parâmetros da função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida pela gentamicina, sob a infusão aguda de Ang(1-7) na presença e ausência do antagonista de receptor Mas, o A779;
- c) Determinar através de PCR em tempo real, o conteúdo renal de RNA mensageiro que codifica elementos de SRA: renina, angiotensinogênio, enzimas ECA e ECA2 e receptores de angiotensinas, AT1 e Mas, em rins de ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina;

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos procedentes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com peso variando entre 250 e 300g. Desde o nascimento, os animais foram mantidos sob um ciclo de claridade - escuridão sendo, 14 horas de claridade e 10 h de escuridão, recebendo água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 180/08).

#### 3.2 Grupos Experimentais

Este trabalho foi desenvolvido seguindo basicamente três protocolos experimentais:

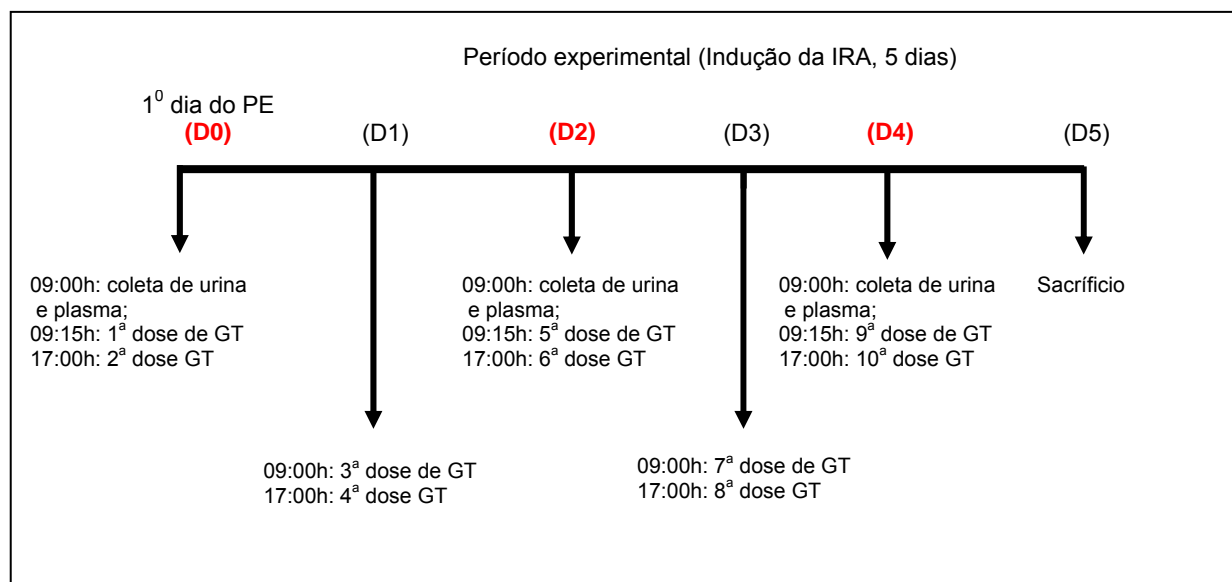
**Protocolo I.** Indução de NTA pela gentamicina em ratos.

**Protocolo II.** Avaliação da função renal em ratos com NTA induzida pela gentamicina sob a infusão aguda de Ang(1-7), na ausência ou na presença do antagonista específico de receptores de Ang(1-7), o A779.

**Protocolo III.** Avaliação dos níveis renais de RNAm que codificam elementos do SRA em ratos com NTA induzida pela gentamicina.

O **Protocolo I** teve por objetivo induzir NTA em ratos pela gentamicina de acordo com o protocolo de Appel e cols., (1981). Para a realização deste protocolo, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas durante oito dias. Os três primeiros dias foram destinados à aclimação. Em seguida, os ratos foram tratados com gentamicina (Gentatec®, 80 mg/Kg/dia, 0,1 ml/100g de peso corporal da solução

40 mg/ml), por cinco dias consecutivos. Durante os períodos de aclimação e de tratamento (oito dias ao todo), o volume de urina, a ingestão de água e o peso dos animais foram medidos diariamente. Para análises posteriores, uma alíquota de urina (1 ml) foi coletada em tubos de microcentrifuga (eppendorf) e armazenada a -20 °C. No 3º dia após a aclimação (dia zero, D0), os animais receberam gentamicina subcutaneamente (sc), duas vezes ao dia sendo, a primeira dose, às 09:00h da manhã e a segunda, às 17:00h. Os ratos do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento recebendo, no entanto, NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal). O tratamento foi feito por cinco dias (dia zero a dia quatro, D0 a D4). Nos dias 0 (D0), 2 (D2) e 4 (D4) do período experimental, antes da administração da GT, aproximadamente, 1 ml de sangue foi coletado de uma veia da cauda para determinação posterior de creatinina, osmolalidade,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  plasmáticos. Nestes mesmos dias, amostras de urina foram coletadas para a medida desses mesmos elementos e também da enzima  $\gamma$  - GT (Figura 3).



**Figura 3-** Protocolo de indução de NTA pelo uso de gentamicina utilizado nesse trabalho.

Para analisar as alterações morfológicas decorrentes instalação da NTA, ao término dos cinco dias de tratamento, os animais foram anestesiados com tiopental

sódico (40 mg/Kg, ip) e colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa. Uma incisão longitudinal no abdome foi realizada e as vísceras abdominais foram deslocadas de modo que o rim direito ficasse exposto. Com auxílio de uma tesoura, o rim direito foi removido e decapsulado e o órgão foi colocado em solução de formol tamponado a 10%. Os rins foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG, onde foram submetidos às técnicas convencionais de coloração (eosina-hematoxilina) para análise histológica dos mesmos.

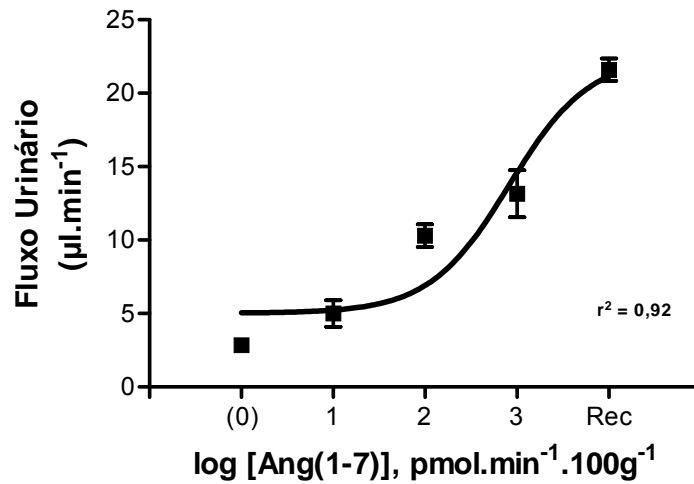
O **Protocolo II** teve como objetivo avaliar o efeito da infusão aguda de Ang(1-7) em ratos com NTA induzida por gentamicina.

Inicialmente, no entanto, tornou-se necessário determinar a dose de angiotensina(1-7) [Ang(1-7)] a ser usada em nossos experimentos. Para isso, doses crescentes desse peptídeo foram infundidas diretamente na veia femoral direita de ratos normais (controles) anestesiados com solução tiopental (40mg/Kg). A infusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão calibrada para 30  $\mu$ l/min. O FU urinário foi o parâmetro renal medido. A curva dose-resposta cumulativa foi feita com as doses de 10, 100 e 1000 pmoles/100g/min de Ang(1-7) sendo, cada dose, infundida por 30 min. O FU foi medido, por gravimetria, a cada intervalo de 10 min. No período de recuperação os ratos foram infundidos apenas com solução salina (NaCl 0,9%).

A Figura 4 mostra a curva dose-resposta obtida, onde se pode observar que a Ang(1-7) aumenta o FU de forma dose-dependente. Baseados nessa curva, 100 pmoles.min<sup>-1</sup>.100g<sup>-1</sup> foi a dose de escolha para os estudos do efeito da Ang(1-7) sobre a função renal em ratos tratados com GT, por não se tratar nem da dose de efeito mínimo nem a de efeito máximo.

Assim, para se avaliar o efeito da Ang(1-7) e de seu antagonista, o A779, sobre a função renal em ratos com NTA induzida pela gentamicina, os animais foram divididos em oito grupos detalhados no Quadro 1.





**Figura 4.** Curva dose-resposta para o efeito da angiotensina(1-7) sobre o fluxo urinário em ratos normais.

#### Quadro 1

Grupos experimentais	Procedimento durante a indução da NTA	Procedimento durante a infusão
CTL-CTL	Salina (NaCl 0,9%)	Salina (NaCl 0,9%)
CTL-ANG	Salina (NaCl 0,9%)	Ang(1-7)
GT-CTL	Gentamicina (80mg/Kg/dia)	Salina (NaCl 0,9%)
GT-ANG	Gentamicina (80mg/Kg/dia)	Ang(1-7)
CTL-A779	Salina (NaCl 0,9%)	A779
CTL- ANG- A779	Salina (NaCl 0,9%)	Ang(1-7) + A779
GT- A779	Gentamicina (80mg/Kg/dia)	A779
GT- ANG-A779	Gentamicina (80mg/Kg/dia)	Ang(1-7) + A779

Nestes grupos experimentais, os ratos foram submetidos ao mesmo procedimento, descrito no **Protocolo I**, para indução de NTA. Ao final dos cinco dias de tratamento, tanto os ratos controle (receberam NaCl 0,9% quando na gaiola metabólica), quanto os ratos tratados (receberam gentamicina quando na gaiola metabólica) foram

submetidos a procedimentos cirúrgico e experimental para avaliação da função renal. Para a execução deste protocolo experimental, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/Kg), intraperitonealmente (ip), e colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa com temperatura mantida em, aproximadamente, 36 °C. Após a tricotomia da região abdominal, foram feitas duas incisões laterais: uma do lado direito e outra do lado esquerdo, de modo que as veias femorais direita e esquerda ficassem expostas. Uma cânula de polietileno (PE-50) heparinizada foi, então, colocada na veia femoral direita para injeção de eventuais doses adicionais de anestésico. Uma outra cânula, também heparinizada, foi introduzida na veia femoral esquerda para infusão ou de solução salina (NaCl 0,9%) ou da substância a ser estudada (Ang(1-7) ou A779 ou Ang(1-7)+A779). Após a canulação dos vasos femorais, a bexiga urinária foi exposta através de uma incisão longitudinal na linha média da superfície ventral. A porção apical da bexiga urinária foi cauterizada e uma cânula de polietileno (PE-240) foi introduzida e firmemente amarrada. A urina foi coletada em intervalos de 20 min, em tubos de microcentrifuga (eppendorff) e seu volume foi determinado por gravimetria. Além da cânula de polietileno (PE-50) colocada na veia femoral direita para a infusão de soluções e injeção de eventuais doses adicionais de anestésico, uma outra cânula (PE-50) heparinizada foi colocada na artéria femoral esquerda para coleta de sangue. Imediatamente após a canulação da veia femoral, iniciou-se, com auxílio de uma bomba de infusão, um período chamado período de hidratação onde os ratos receberam NaCl 0,9%, por 60 min a uma taxa de 51µl/min. Após este período, uma injeção (*bolus*) de 200 µl/100g de peso corporal de inulina a 10% e de paraminohipurato de sódio (PAH) a 1,2%, em NaCl a 0,9%, foi administrado nos ratos. Em seguida, por um período de 60 min a uma taxa de 30 µl/min, os ratos receberam NaCl 0,9% contendo inulina a 5% e PAH a 0,6%. Após esse período, procede-se à infusão das substâncias sob estudo, conforme a seguir:

Grupo **CTL-CTL**: os ratos receberam injeção de NaCl 0,9% (sc) na gaiola metabólica e durante a infusão receberam NaCl 0,9% contendo apenas inulina a 5% e PAH a 0,6%;

Grupo **CTL-ANG**: os ratos receberam injeção de NaCl 0,9% (sc) na gaiola metabólica e, durante a infusão, receberam NaCl 0,9% contendo inulina a 5%, PAH a 0,6% e Ang(1-7) (100 pmol/100g/min);

Grupo **GT-CTL**: os ratos receberam injeção de gentamicina (GT, sc) na gaiola metabólica e, durante a infusão, receberam NaCl 0,9% contendo apenas inulina a 5% e PAH a 0,6%;

Grupo **GT-ANG**: os ratos receberam injeção de gentamicina (GT, sc) na gaiola metabólica e, durante a infusão, receberam NaCl 0,9% contendo inulina a 5%, PAH a 0,6% e Ang(1-7) (100 pmol/100g/min);

Grupo **CTL-A779**: os ratos receberam injeção de NaCl 0,9% (sc) na gaiola metabólica e, durante a infusão, receberam NaCl 0,9% contendo inulina a 5%, PAH a 0,6% e A779 (1 nmol/100g/min);

Grupo **CTL-ANG-A779**: os ratos receberam NaCl 0,9% (sc) na gaiola metabólica e, durante a infusão, receberam NaCl 0,9% contendo inulina a 5%, PAH a 0,6%, Ang(1-7) (100 pmol/100g/min) e A779 (1 nmol/min);

Grupo **GT-A779**: os ratos receberam injeção de gentamicina (GT, sc) na gaiola metabólica e, durante a infusão, receberam solução de NaCl 0,9% contendo inulina a 5%, PAH a 0,6% e A779 (1 nmol/100g/min);

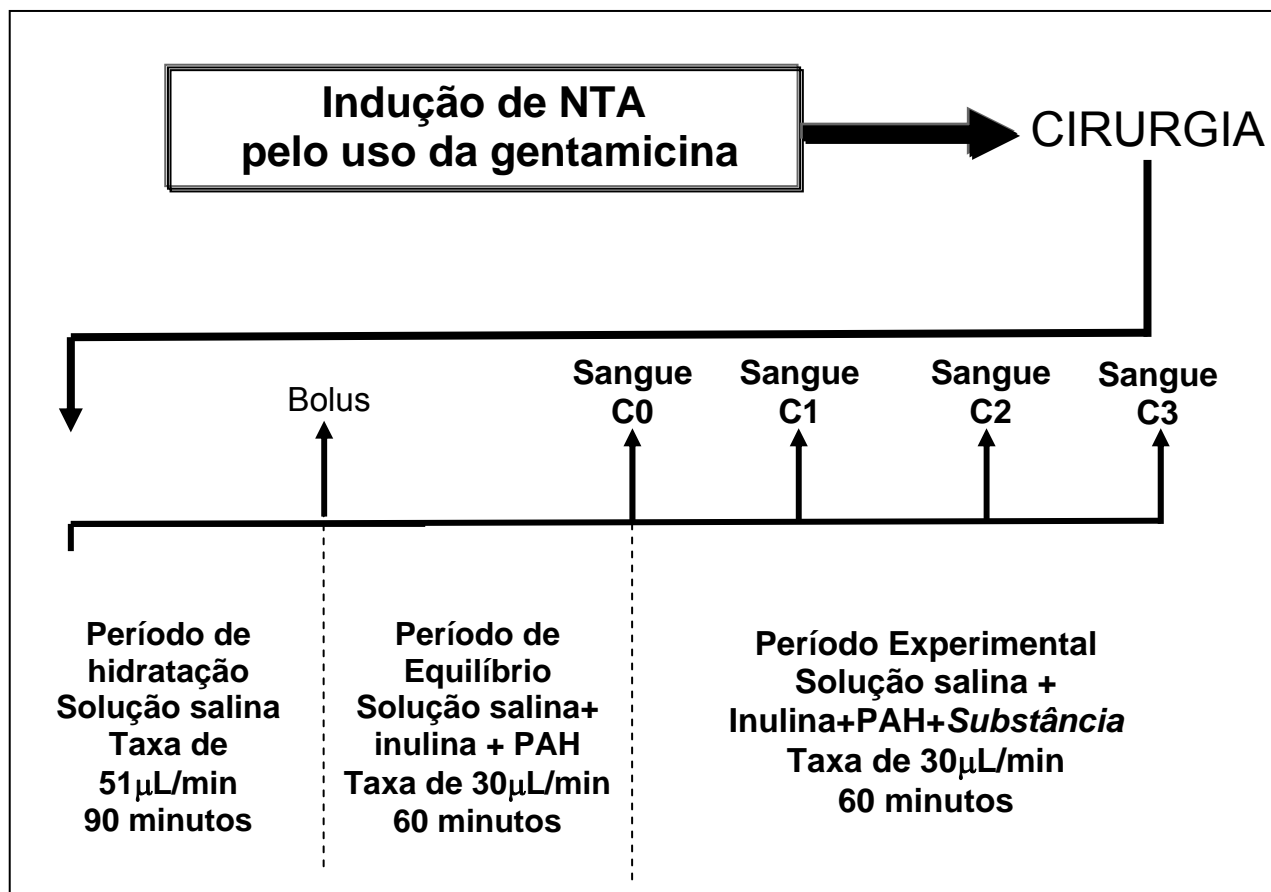
Grupo **GT-ANG-A779**: os ratos receberam injeção de gentamicina (GT, sc) na gaiola metabólica e, durante a infusão, receberam NaCl 0,9% contendo inulina a 5%, PAH a 0,6%, Ang(1-7) (100 pmol/100g/min) e A779 (1 nmol/min).

Durante a infusão, quatro períodos de '*clearances*' foram feitos (Fig.05). Para isto, quatro amostras de urina, de 20 min cada, foram coletadas sendo, o C0 (*clearance* 0) obtido nos últimos 20 minutos da infusão com NaCl 0,9% apenas ('*clearance*' controle). Os outros três períodos de '*clearances*' (C1, C2 e C3) foram feitos aos 20, 40 e 60 min após o início da infusão com as substâncias em estudo, de acordo com o grupo experimental pré-estabelecido. Uma amostra de sangue foi coletada na metade do período de coleta de cada amostra de urina, ou seja, 10 min após o início de cada

coleta de urina. Cada amostra de sangue (0,4 ml) foi coletada em um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 ml contendo 30 µl de heparina a 5000 UI/ml.

Para se obter o plasma, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm à temperatura ambiente, durante 5 min, imediatamente após sua coleta.

As respostas obtidas representam a média dos 3 períodos ( $C1+C2+C3/3$ ) de *clearances*.



**Figura 5-** Protocolo para avaliar o efeito de diferentes substâncias sobre a função renal em ratos com NTA pelo uso de gentamicina utilizado nesse trabalho.

O **Protocolo III** objetivou determinar o nível de expressão renal de componentes do SRA (renina, angiotensinogênio, enzimas ECA e ECA2 e receptores Mas, AT1) em ratos com NTA induzida pela gentamicina. Para isso, os ratos foram submetidos ao

procedimento de indução da NTA de acordo com o Protocolo I, descrito anteriormente. Em seguida os ratos foram anestesiados com solução tiopental (40 mg/Kg) e através de uma incisão longitudinal o rim direito foi retirado e destinado ao estudo morfológico. A seguir a artéria renal esquerda foi dissecada. Com o auxílio de uma agulha sem bisel colocada nessa artéria, o rim esquerdo foi lavado com NaCl 0,9% (solução estéril) contida em uma seringa de 10 ml. Antes de exsanguinar o rim, um corte foi feito na veia renal esquerda para dar vazão à solução de lavagem do rim. Após a lavagem, o rim esquerdo foi removido e cortado, transversalmente, na região do hilo. Uma fatia de, aproximadamente, 100 mg foi separada com lâmina de bisturi e colocada em um tubo Falcon (capacidade para 10 ml) contendo 1 ml de solução de Brazol. Imediatamente após a coleta do tecido, o tubo Falcon contendo o tecido fatiado, foi imerso em nitrogênio líquido e em seguida armazenado a -80 °C. Essa fatia de rim foi submetida à extração de RNA para análise posterior por RT-PCR (“real time - polimerase chain reaction”, reação em cadeia da polimerase em tempo real).

### 3.3 Procedimentos Analíticos para Avaliação da Função Renal

#### 3.3.1 Dosagem de creatinina

O RFG, enquanto os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas, foi determinado, colorimetricamente, através do ‘clearance’ de creatinina, pelo método modificado de Jaffé. A dosagem foi feita utilizando o kit Bioclin (Quibasa), conforme instruções do fornecedor, que se fundamenta na reação da creatinina com a solução de picrato, em meio alcalino. O RFG foi determinado utilizando a equação abaixo:

$$\text{RFG (ml/24h)} = ([\text{Creatinina}_{\text{urina}}] \text{ (mg\%)}) / [\text{Creatinina}_{\text{plasma}}] \text{ (mg\%))} \times \text{Fluxo urinário (ml/24h)}$$

- Reagentes:

Solução Padrão de creatinina (3mg/dl), Ácido pícrico (60 mmol/l), Solução Alcalina (com NaOH (110mmol/l),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 mmol/l) e surfactante) e Solução ácida de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (12,25 mol/l).

- Preparo das amostras de urina: Em um tubo de ensaio foram adicionados, 100  $\mu\text{l}$  de urina diluída (1:25), 800  $\mu\text{l}$  de solução alcalina e 200  $\mu\text{l}$  de ácido pícrico. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37 °C, por 10 min. Após zerar o aparelho com água, o branco, os padrões e as amostras de urina foram lidas, todas em duplicata. O comprimento de onda utilizado para a leitura do padrão e da amostra foi de 510 nm.

- Preparo das amostras de plasma: Em um tubo de ensaio foram adicionados, 100  $\mu\text{l}$  de plasma, 800  $\mu\text{l}$  de solução alcalina e 200  $\mu\text{l}$  de ácido pícrico. As amostras são homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37°C, por 10 min. Após zerar o aparelho com água, o branco e as amostras de plasma foram lidas em 510 nm. Esta primeira leitura das amostras do plasma é denominada de A1.

Após esta leitura, foi adicionado 40  $\mu\text{l}$  do reagente ácido nas amostras de plasma e no branco, homogeneizou os tubos e aguardou por 5 minutos entre 15°C e 30°C. Após 5 minutos foram realizadas as leituras das amostras de plasma (A2) e do branco em 510 nm.

A concentração de creatinina no plasma, em mg/dl, foi calculada a partir da seguinte fórmula: Creatinina (mg/dl)= (A1-A2/absorbância padrão) x 3 ou usando o fator de calibração: Creatinina no plasma (mg/dl) = (A1-A2) x fator de calibração. Sendo o FC= concentração do padrão / absorbância do padrão.

### 3.2.3 Dosagem de inulina pelo método de antrona

O RFG nos estudos com infusão foi determinado através do 'clearance' da inulina, dosada pelo método da antrona (Fuhr e cols., 1955). O RFG, em cada período de coleta, foi determinado de acordo com a equação:

$$\text{RFG (ml/min)} = ([\text{Inulina}_{\text{urina}}] \text{ (mg/ml)} / [\text{Inulina}_{\text{plasma}}] \text{ (mg/ml)}) \times \text{Fluxo urinário (ml/min)}$$

- Reagentes

Ácido sulfúrico concentrado (PA), antrona em pó (PA), ácido perclórico a 5%, água deionizada, inulina (PA).

- Preparo do reagente de antrona

*Diluição do ácido sulfúrico*

Em uma proveta (200 ml) imersa em água fria, foram colocados 50 ml de H<sub>2</sub>O deionizada, em seguida, com auxílio de um béquer de 200 ml, 125 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram adicionados lentamente à proveta, em quantidades fracionadas de modo a não aquecê-la, até atingir o volume de 175 ml (50 ml de H<sub>2</sub>O + 125 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);

*Dissolução da antrona*

A antrona (200 mg) foi colocada em um béquer com capacidade para 10 ml. Em seguida, colocou-se lentamente o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> previamente diluído no béquer e transferiu aos poucos para um balão volumétrico até o béquer ficasse sem antrona. A solução de antrona já dissolvida foi transferida para um balão volumétrico com capacidade para 100 ml e completado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A solução foi homogeneizada até que o líquido ficasse translúcido.

▪ Preparo das amostras de plasma:

Em um tubo de ensaio, 0,30 ml de ácido perclórico a 5%, foi adicionado a 0,03 ml de plasma. Esse tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,125 ml do sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 1,5 ml de antrona. A leitura da reação para a inulina nas amostras de plasma foi feita contra um branco que se constituiu de uma solução contendo 0,013 ml de água destilada, 0,112 de ácido perclórico e 1,5 ml de antrona.

▪ Preparo para amostras de urina

Amostras de urina foram submetidas a duas diluições sucessivas, sendo a 1ª diluição de 1:200 (5 µl de urina + 1000 µl de água destilada). A 2ª diluição feita a partir da primeira foi de 1:10 (200 µl de urina diluída 1:200 + 1800 µl de água destilada). A dosagem de inulina foi feita em tubo de ensaio onde 0,075 ml de ácido perclórico, 0,050 ml de urina diluída (1:2000) e 1,5 ml de antrona foram adicionados. A leitura da reação para a inulina nas amostras de urina foi feita contra um branco que se constituiu de uma solução contendo 0,050 ml de água destilada, 0,075 ml de ácido perclórico e 1,5 ml de antrona. Todos os tubos foram colocados em banho-maria a 52°C, por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram imediatamente resfriados, em banho de água fria. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 578 nm.

### 3.3.3. Dosagem de PAH

O FPR foi determinado através do 'clearance' do PAH, por método colorimétrico (Smith e cols., 1945). O FPR, em cada período de coleta, foi determinado pela equação:

$$\text{FPR(ml/min)} = ([\text{PAH}_{\text{urina}}] (\mu\text{g/ml}) / [\text{PAH}_{\text{plasma}}] (\mu\text{g/ml})) \times \text{Fluxo urinário (ml/min)}$$



- Reagentes:

HCl a 1,2 N, NaNO<sub>2</sub> a 100 mg%, sulfato de amônio a 500mg%, N-Naftil a 100 mg%.

- Preparo das amostras de plasma

Para desproteinização do plasma, em um tubo de ensaio, foram adicionados 1,275 ml de água deionizada e 0,075 ml de plasma. Em seguida foram adicionados, lentamente 0,075 ml de ZnSO<sub>4</sub> a 10 % e 0,075 ml de NaOH a 0,5 N. Essa mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota de 0,5 ml do sobrenadante foi tomada para dosagem do PAH

- Preparo das amostras de urina

Amostras de urina foram submetidas a duas diluições sucessivas, sendo a 1ª de 1:200 e a 2ª diluição foi feita a partir da 1ª foi de 1:4000. A alíquota na qual o PAH foi dosado foi tomada da urina 1:4000.

- Dosagem do PAH

Para cada série experimental foi feita uma curva padrão de PAH (dados não mostrados). Em tubos de ensaio devidamente identificados foram colocados 0,5 ml de amostra (urina ou plasma), ou 0,5 ml de solução padrão ou 0,5 ml de água deionizada (branco). A cada tubo foi acrescentado, rigorosamente, nesta ordem e respeitando o intervalo de tempo indicado: 0,1 ml da solução de HCl (1,2 N); 0,1 ml de NaNO<sub>2</sub> (100 mg%). A mistura foi homogeneizada em agitador magnético. Entre 3 e 5 minutos, após a agitação, 0,1 ml de sulfato de amônio (500mg%) foi adicionado. Entre 3 e 5 minutos, adicionou-se 0,1 ml de N-Naftil (100mg%), os tubos foram agitados e após 15 minutos as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm.

### 3.3.4 Dosagem de sódio e potássio

As concentrações de sódio e de potássio, nas amostras de urina e plasma, foram determinadas por fotometria de chama (CELM, FC180), usando padrão contendo 140 mEq/l de  $\text{Na}^+$  e 5 mEq/l de  $\text{K}^+$  preparado em água deionizada.

Todas as amostras foram diluídas 200 vezes em água deionizada. Para isso, alíquotas de 15  $\mu\text{l}$  foram diluídas em 3 ml de água destilada, sendo a dosagem de cada amostra feita em duplicata.

Conhecendo-se as concentrações plasmática e urinária de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , alguns parâmetros podem ser quantitativamente avaliados, conforme as equações:

$$\begin{aligned} \text{FE}_{\text{Na}^+} (\%) &= (\text{QE}_{\text{Na}^+} / \text{QF}_{\text{Na}^+}) \times 100 & // & \quad \text{FE}_{\text{K}^+} (\%) = (\text{QE}_{\text{K}^+} / \text{QF}_{\text{K}^+}) \times 100 & // \\ \text{FR}_{\text{Na}^+} (\%) &= 100 - \text{FE}_{\text{Na}^+} & & \quad \text{FR}_{\text{K}^+} (\%) = 100 - \text{FE}_{\text{K}^+} \end{aligned}$$

QF, quantidade filtrada; QE, quantidade excretada; FE, fração de excreção; FR, fração de reabsorção.

### 3.3.5 Determinação das Osmolalidades plasmática e urinária

A determinação das osmolalidades plasmática e urinária foi feita em osmômetro de ponto de congelamento (Microsmette, Advanced Instruments) usando padrões com osmolalidades apropriadas para as amostras de urina e plasma (100, 290 e 500 mOsm/Kg). Conhecendo-se as osmolalidades plasmática e urinária, alguns parâmetros podem ser quantitativamente avaliados, conforme as equações:

$$\text{C}_{\text{osm}} (\text{ml/min}) = ([\text{Osmolalidade}_{\text{urina}} (\mu\text{Osm/ml}) / \text{Osmolalidade}_{\text{plasmática}} (\mu\text{Osm/ml})] ) \times \text{FU} (\text{ml/min})$$

$$\text{C}_{\text{H}_2\text{O}} (\text{ml/min}) = \text{FU} (\text{ml/min}) - \text{C}_{\text{osm}} (\text{ml/min}).$$

C. 'clearance'; osm, osmolar.

▪ Outros parâmetros renais avaliados:

A fração de excreção de água ( $FE_{H_2O}$ ) e a fração de filtração (FF) foram avaliadas segundo as equações que se seguem:

\*  $FE_{H_2O} (\%) = (FU/RFG) \times 100$ , sendo FU= fluxo urinário e RFG = Ritmo de filtração glomerular, ambos em ml/min.

\*  $FF = RFG/FPR$ , sendo RFG = Ritmo de filtração glomerular e FPR = Fluxo plasmático renal, ambos em ml/min.

### 3.4 Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida nos ratos acordados e registrada diariamente durante a aclimação e durante o período experimental, sempre às 14:00h, usando método não invasivo através do pletismógrafo de cauda (RTBP 2000, Kent Scientific). Três medidas da pressão sistólica foram obtidas em cada sessão e a média foi calculada para obter o valor final da pressão arterial sistólica.

### 3.5 Proteinúria

Para se determinar a proteinúria, amostras de urina (24h) foram coletadas diariamente e armazenadas a  $-20^{\circ}C$  para posterior análise. A dosagem foi feita pelo kit comercial SensiProt para análise (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil). A reação se dá pela reação entre o vermelho de pirogalol e o molibdato de sódio que, quando combinado com a proteína presente na amostra, em meio ácido, desenvolve um cromóforo de cor azul. A cor formada é quantificada a 600nm, sendo proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

Os valores foram calculados com base no fator de calibração e a concentração da proteína foi expressa em mg/dl

**Fator de calibração**= concentração do padrão/absorbância do padrão

**Proteínas urinárias (mg/dl)**= absorbância da amostra x fator de calibração

### 3.6 Gama Glutamil Transferase

A determinação quantitativa da enzima  $\gamma$ -GT urinária, foi feita utilizando kit comercial da Synermed® de acordo com o método enzimático modificado de Szasz (1976) e executado na Escola de Medicina Veterinária/UFMG. A atividade da  $\gamma$ -GT é expressa em Unidades internacionais/Litro (U/L), onde a unidade Internacional é definida como a atividade enzimática que converte 1  $\mu$ mol de substrato em 1 minuto. Em nossos experimentos os valores obtidos em U/l foram convertidos em U/24h, uma vez que as amostras foram coletadas nesse período de tempo.

### 3.7 Conteúdo Renal de RNA mensageiro que Codifica Componentes do Sistema-Renina-Angiotensina

O conteúdo de RNA mensageiro que codifica componentes do SRA (renina, angiotensinogênio, ECA, ECA2 e receptores AT1 e Mas) foi determinado utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

#### 3.7.1 Seqüência de RNA mensageiro das proteínas estudadas

As seqüências de nucleotídeos do RNA mensageiro das enzimas e receptores estudados foram obtidas na base de dados NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) que reúne, entre outras, as seqüências de RNA mensageiro de proteínas de diversas espécies e organismos. As proteínas estudadas e suas respectivas referências na base de dados, estão citadas na Tabela 1.

A partir das seqüências de RNA mensageiro obtidas nessas referências, foi possível selecionar os *primers* a serem empregados na amplificação dos cDNAs por PCR em tempo real.

**Tabela 1**

Proteínas e suas respectivas referências, na base de dados NCBI, onde a sequência do RNA mensageiro foi pesquisada.

Proteínas	Referência NCBI
Renina	<u>NM_012642.</u>
Angiotensinogênio	<u>NM_134432.</u>
ECA	<u>NM_012544</u>
ECA 2	<u>XM_228924</u>
Receptor AT <sub>1</sub>	<u>NM_031009.</u>
Receptor Mas	<u>NM_153722</u>
GAPDH	<u>AF106860</u>

### 3.7.2 Seleção dos pares de *primers*

Os *primers* foram selecionados utilizando o software “Primer Express” (Applied Biosystems), onde foi possível identificar os pares de “*primers*” amplificadores das sequências de cDNA das proteínas. As sequências dos pares de “*primers*” utilizados estão relacionadas na Tabela 2.

**Tabela 2**

Seqüência de DNA dos pares de *primers* utilizados para amplificação do cDNA das proteínas avaliadas neste estudo.

Proteínas	Primers
Renina	-Sense: 5'- CCACCTTCATCCGCAAGTTC-3' -Anti-sense: 5'- TGCGATTGTTATGCCGGTC -3'
Angiotensinogênio	-Sense: 5'- GACGTGACCCTGAGCAGTCC -3' -Anti-sense: 5'- TGAGTCCCGCTCGTAGATGG-3'
ECA	-Sense: 5'-CTTCACTGACCAAAAGCTGCG - 3' -Anti-sense:5'-CCTAGGGTCTGTACGGATCCG -3'
ECA 2	-Sense: 5'- GTGGAGGTGGATGGTCTTTCA-3' -Anti-sense: 5'- TTGGTCCACTGTTCTCTGGGA-3'
Receptor AT <sub>1</sub>	-Sense: 5'- TCTCAGCATCGATCGCTACCT -3' -Anti-sense: 5'- AGGCGAGACTTCATTGGGTG -3'
Receptor Mas	-Sense: 5'- TGACCATTGAACAGATTGCCA-3' -Anti-sense: 5'- TGTAGTTTGTGACGGCTGGTG -3'
GAPDH	-Sense: 5'- ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3' -Anti-sense:5'-GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA-3'

### 3.7.3 Preparação das amostras para PCR em tempo real

- Extração do RNA mensageiro

Uma fatia transversal de rim (contendo porções de córtex e medula renal, ~100 mg) de ratos submetidos ou não ao processo de indução de insuficiência renal aguda por gentamicina, foi cortada e colocada em um tubo estéril contendo 1 ml de Brazol. Este tubo foi mantido a -80oC até o momento da extração de RNA mensageiro, a qual foi processada conforme a seguir:

A amostra foi descongelada e triturada em um homogeneizador e mantida em repouso por 15 min em banho de gelo. Posteriormente, foi adicionado clorofórmio (200 µl para cada mililitro da suspensão obtida) sendo, esta mistura, homogeneizada em agitador de tubos, por 15 segundos. O tubo foi incubado durante 2-3 min em banho de gelo, centrifugado (10.000 rpm, por 15 min, a 4°C ) e, então, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A este tubo foi adicionado isopropanol (500 µl para cada ml da suspensão obtida) e, novamente, homogeneizado. Prosseguiu-se com sua incubação, em banho de gelo (10 min) e centrifugação (10.000 rpm, por 10 min, a 4°C). O sobrenadante foi removido e, ao precipitado contido no tubo, foi acrescentado etanol 75% gelado (1 ml de etanol para cada ml de suspensão obtida). Uma nova homogeneização, em agitador de tubos, seguida por centrifugação (5.000 rpm, por 5 min, a 4 °C) foi realizada. Após esta centrifugação, o sobrenadante (fase etanólica) foi descartado. O tubo foi mantido aberto para a secagem do precipitado à temperatura ambiente. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em 30 µl de dimetil pirocarbonato (DPEc).

A determinação da concentração de RNA mensageiro, na amostra, se deu a partir da diluição (1:200) de uma pequena alíquota da mesma em água deionizada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e de 280 nm. O tubo contendo a amostra foi mantido a -80 °C até o momento do uso e a concentração de RNA foi obtida de acordo com a equação abaixo:

$$[\text{RNA}] = (A_{260 \text{ nm}} \times \text{FC} \times \text{FD})/1000$$

Onde  $A_{260\text{nm}}$  é o valor de leitura da amostra a 260 nm; FC corresponde ao fator de conversão, no qual a  $A_{260}$  máxima é 1 e corresponde a 40 µg/ml de RNA; FD corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura e é igual a 200. O resultado da multiplicação é dividido por mil para se obter a concentração em µg/µl.

- Transcrição reversa

A transcrição reversa foi realizada a partir do RNA mensageiro extraído conforme protocolo descrito no item acima. Imediatamente antes do início da transcrição, uma alíquota desse RNA foi diluída com água milliQ, de forma a obter uma solução de RNA com concentração de 0,2 µg/µl. Para a transcrição, foram pipetados, em um tubo de centrifuga (tipo “eppendorf”), 1,8 µl de dNTP 10 mM, 2,5 µl de RT buffer 5X, 1,0 µl de DTT 100 mM, 0,2 µl de RNAsin 10.000 U, 1,0 µl de oligo dT (1:10) 50 ng/ml e 5 µl (1,0 µg) de RNA a 0,2 µg/µl e 1 µl da enzima transcriptase reversa 200U diluída 1:4. Este tubo contendo essa mistura foi colocado no termociclador previamente programado com o seguinte protocolo: 70 °C, por 5 min, 4 °C, por 5 min, e 25 °C. Uma alíquota de 30 µl foi armazenada a –20 °C.

- Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A PCR foi realizada em placa de 96 poços apropriada para o equipamento de PCR em tempo real. Para se evitar várias pipetagens diretamente nos poços, uma mistura dos constituintes comuns a todas as reações foi feita, em tubo de centrifuga (tipo eppendorf). O volume final dessa mistura era variável dependendo do número de reações a ser executado. Para cada poço da placa, foi transferida uma alíquota de 20 µl da mistura que consistia de 2,5 µl de tampão Syber 10x, 2,0 µl de uma mistura dNTPs (200 µM cada), 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl do “primer sense”, diluído 1:80 com água milliQ (100 nM), 2 µl de “primer antisense”, diluído 1:80 com água milliQ (100 nM), 0,125 µl de polimerase (Amplitaq Gold), (0,25U/µl) e 8,725 µl de água milliQ. O cDNA (5 µl), preparado conforme descrito no item anterior, foi adicionado a cada poço da placa. O volume final em cada poço (reação) foi de 25 µl. Os poços foram cobertos com tampas apropriadas e em seguida, a placa foi transferida para o equipamento de PCR em tempo real onde se executou o seguinte protocolo de termociclagem: 70 °C, por 5 min, 4 °C, por 5 min, 25°C, por 5 min, 25 °C, por 5 min, 37 °C, por 5 min, 70 °C por 5 min, 4 °C, por 5 min.



### 3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $X \pm EPM$ ). De acordo com a necessidade, os dados foram analisados por one-way-ANOVA, com pós-teste (Newman-Keuls). O teste “t” para amostras não pareadas foi utilizado, assim como regressão linear e não linear. As análises estatísticas foram feitas usando os programas GraphPad Prism, versão 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA e minitab versão 15).

## 4 RESULTADOS

Os dados apresentados, a seguir, são resultados da investigação do envolvimento do sistema renina-angiotensina na regulação da função renal em ratos com necrose tubular aguda (NTA) induzida pela gentamicina (GT).

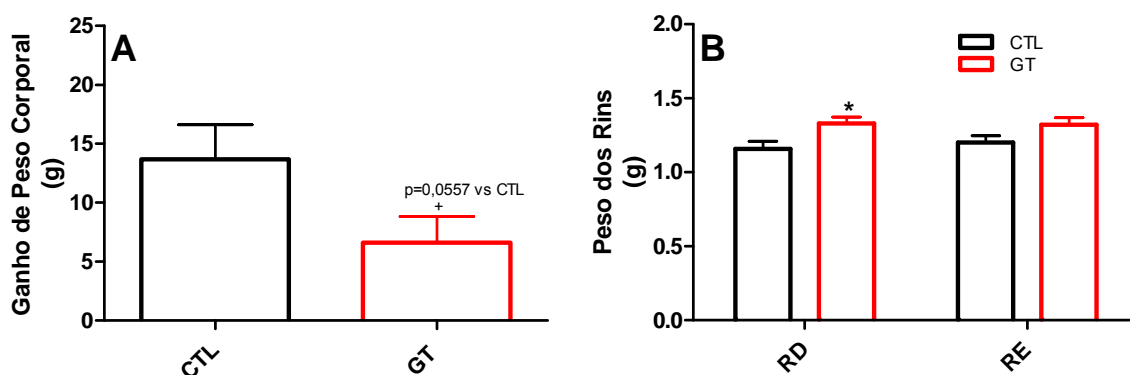
### 4.1 Validação e Caracterização do Modelo de NTA Induzida Pela Gentamicina em Ratos

#### 4.1.1 Peso corporal, peso dos rins e ingestão de água

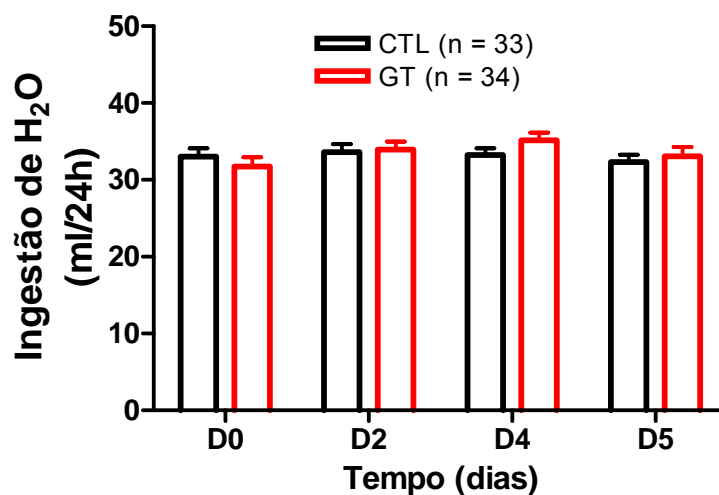
O peso dos ratos imediatamente antes do início do experimento era de  $267,4 \pm 5,2$  g ( $n = 33$ ) e de  $263,6 \pm 5,2$  g ( $n = 34$ ) nos grupos CTL e tratados com GT, respectivamente. Ao final dos 5 dias de tratamento, o peso nos respectivos grupos foi elevado para  $281,1 \pm 5,3$  g e  $270,3 \pm 3,9$  g.

A Figura 6 mostra o efeito da GT sobre o ganho de peso corporal bem como sobre o peso dos rins direito e esquerdo de ratos após 5 dias de tratamento. Os ratos de ambos os grupos apresentaram ganho de peso corporal, mas este ganho foi menor no grupo tratado com GT ( $6,6 \pm 2,2$  vs  $13,7 \pm 2,9$  g no grupo CTL) (Fig. 6A). Ao contrário, o peso dos rins estava aumentado após 5 dias de tratamento com a GT (Fig. 6B) sendo, o peso dos rins direitos, de  $1,33 \pm 0,04$  e  $1,16 \pm 0,05$  g nos ratos tratados e não tratados com GT, respectivamente.

Já a Figura 07 mostra que a ingestão de água não foi modificada ao longo dos 5 dias de tratamento com GT variando, o volume ingerido, de  $33,0 \pm 1,1$  a  $32,3 \pm 1,0$  ml/24h nos ratos do grupo CTL e de  $31,7 \pm 1,2$  a  $33,1 \pm 1,2$  ml/24h nos ratos tratados com GT.



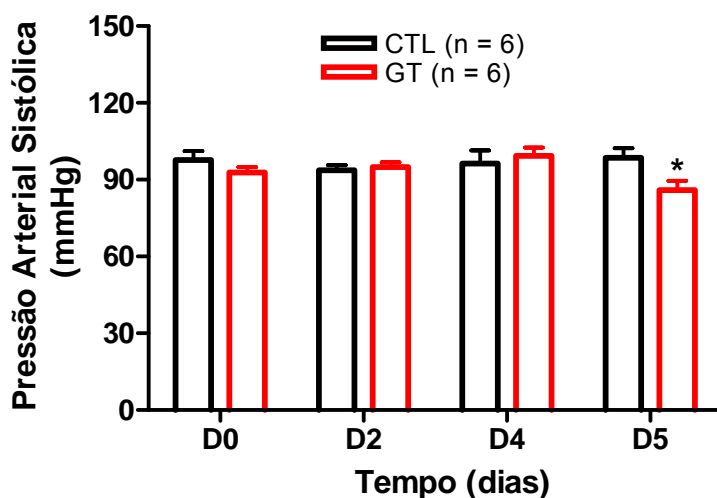
**Figura 06.** Peso corporal (A) e peso dos rins direito e esquerdo (B) de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle (n = 33) e GT, gentamicina (n = 34). RD, rim direito (n = 5/grupo); RE, rim esquerdo (n = 5/grupo). Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*p  $\leq$  0,05 vs CTL.



**Figura 07.** Ingestão diária de água em ratos durante 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle, GT, gentamicina. D, dia; D0, dia imediatamente anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### 4.1.2 Gentamicina e pressão arterial sistólica

A Figura 08 mostra a pressão arterial sistólica (PAS) em ratos tratados com GT durante 5 dias. A PAS foi aferida diariamente, sempre às 14 horas. No grupo GT foi observada uma queda significativa da PAS apenas no último dia de tratamento (D5,  $85,9 \pm 3,7$  mmHg,  $n = 6$  vs  $98,5 \pm 3,8$  mmHg no grupo CTL,  $n = 6$ ).

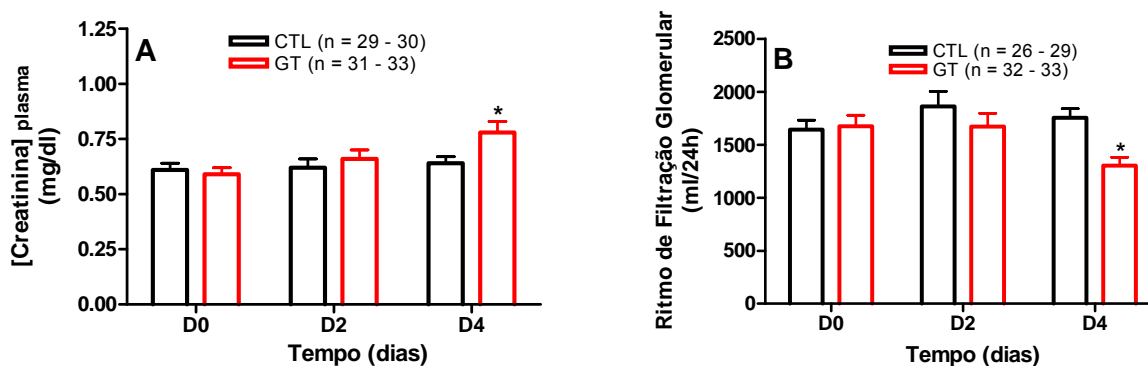


**Figura 08.** Pressão arterial sistólica em ratos durante 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, control, GT, gentamicina. D, dia; D0, dia imediatamente anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \* $p \leq 0,05$  vs CTL no mesmo dia (D5).

#### 4.1.3 Gentamicina e função renal

##### 4.1.3.1 Creatinina Plasmática e Ritmo de Filtração Glomerular

Como mostrado na Figura 9A, a GT promoveu um aumento significativo na concentração plasmática de creatinina no 4º dia de tratamento (D4,  $0,78 \pm 0,05$  mg/dl) em comparação com os ratos do grupo CTL ( $0,64 \pm 0,03$  mg/dl). Concomitantemente, houve queda do RFG (Fig. 9A), estimado pelo *clearance* da creatinina ( $1304,0 \pm 78,0$  ml/24h vs  $1754,9 \pm 85,0$  ml/24h, no grupo CTL).

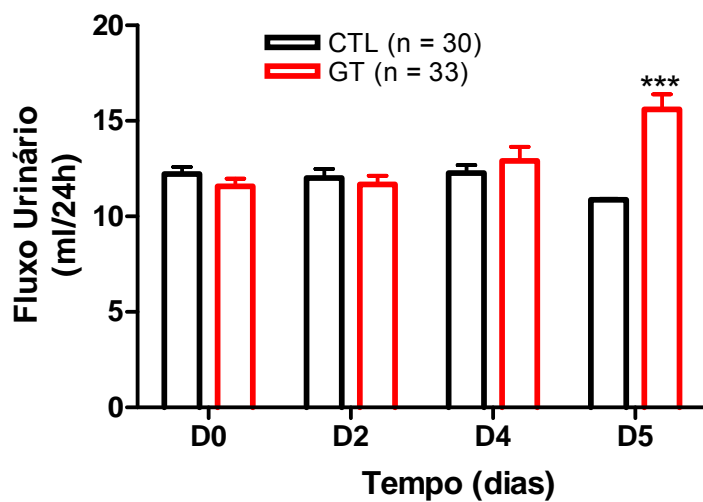


**Figura 9.** Concentração plasmática de creatinina (**A**) e ritmo de filtração glomerular (**B**) em ratos durante 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle, GT, gentamicina, D, dia; D0, dia imediatamente anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \* $p \leq 0,05$  vs CTL no mesmo dia (D4).

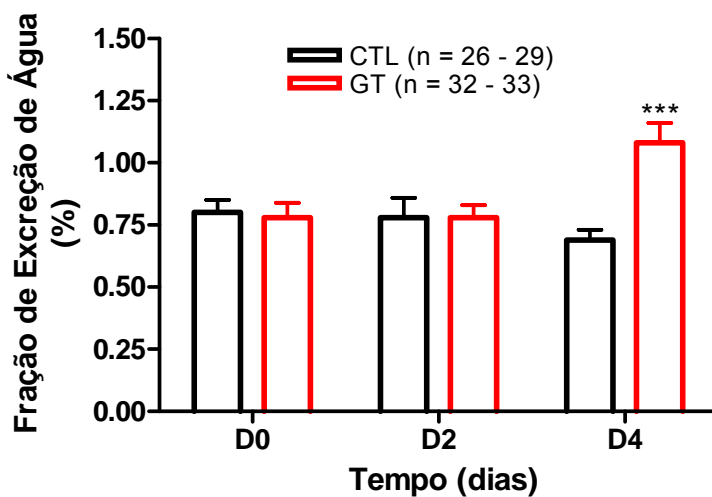
#### 4.1.3.2 Fluxo Urinário e Fração de Excreção de Água

A Figura 10 mostra o fluxo urinário em ratos do grupo GT e em ratos do grupo CTL ao longo do tratamento. Pode-se observar que os ratos do grupo GT apresentaram aumento significativo do FU ( $15,6 \pm 0,8$  ml/24h) apenas no último dia (D5), quando comparado com os ratos do grupo CTL ( $10,9 \pm 0,04$  ml/24h).

Já a Figura 11 mostra a fração de excreção de água (FEH<sub>2</sub>O) tanto no grupo GT, quanto no grupo CTL. Conforme pode ser observado, a GT promoveu elevação significativa da fração de excreção de água no último dia de tratamento (D4,  $1,08 \pm 0,08\%$ ) em comparação ao grupo CTL ( $0,69 \pm 0,04\%$ ). Este aumento da FEH<sub>2</sub>O promovido pela GT está associado à queda do RFG (Fig. 9B) e ao aumento de fluxo urinário (Fig. 10).



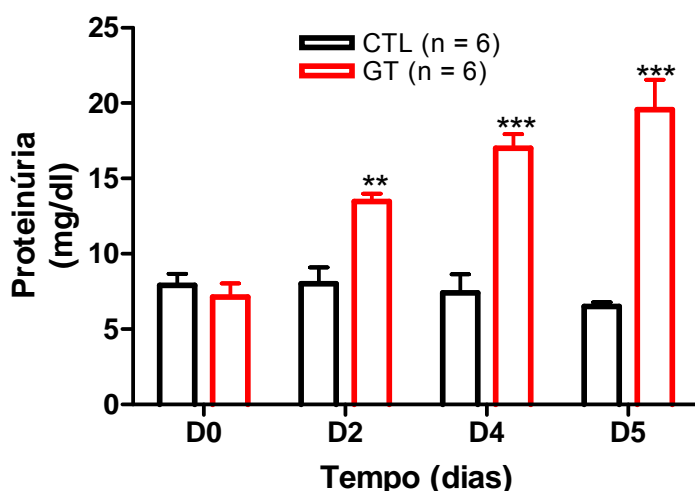
**Figura 10.** Fluxo urinário em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle, GT, gentamicina, D, dia; D0, dia imediatamente anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*\*\*  $p < 0,001$  vs CTL no mesmo dia (D5).



**Figura 11.** Fração de excreção de água em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle, GT, gentamicina, D, dia; D0, dia anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*\*\*  $p < 0,001$  vs CTL no mesmo dia (D4).  $FEH_2O = (FU/RFG) \cdot 100$ .

#### 4.1.3.3 Proteinúria e Enzima Gama-Glutamil-Transferase Urinária

A Figura 12 mostra que a gentamicina promoveu proteinúria significativa já a partir do D2. Os ratos do grupo CTL apresentaram níveis de proteína na urina mais baixos e estáveis ao longo dos dias de tratamento (em *mg/24h*: D0,  $7,90 \pm 0,77$ ; D2,  $8,01 \pm 1,09$ ; D4,  $7,41 \pm 1,23$  e D5=  $6,51 \pm 0,27$ ). Ao contrário, os ratos tratados com GT apresentaram quantidades, significativamente, crescentes de proteína na urina ao longo do período de tratamento (em *mg/24h*: D0,  $7,13 \pm 0,91$ ; D2,  $13,47 \pm 0,52$ ; D4,  $17,41 \pm 0,95$  e D5 =  $19,58 \pm 1,98$ ).

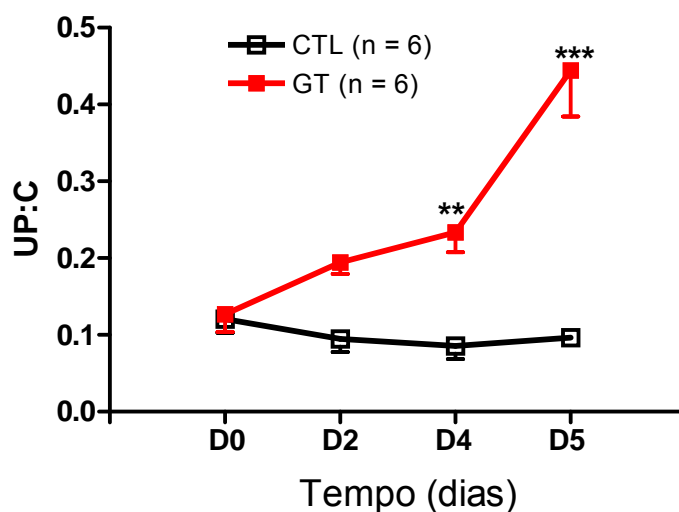


**Figura 12.** Proteinúria em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, GT, gentamicina, D, dia; D0, dia anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*\* $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs CTL no mesmo dia.

Pela Figura 13 pode-se observar a razão entre a proteinúria e a excreção urinária de creatinina (relação UP:C). Os ratos tratados com GT apresentaram aumento desta relação nos dias D4 e D5 em relação aos ratos do grupo CTL. Este aumento caracteriza o agravamento da lesão renal nos ratos que receberam GT.

Já a Figura 14 mostra a excreção urinária da enzima gama-glutamil-transferase ( $\gamma$ -GT) em ratos com NTA induzida pela GT e em ratos do grupo CTL. Os ratos do grupo CTL apresentaram valores estáveis de  $\gamma$ -GT na urina em todos os dias estudados (em

*Unidades/24h*: D0,  $544,0 \pm 127,4$ ; D2,  $446,9 \pm 105,9$ ; D4,  $581,7 \pm 228,8$  e D5,  $587,8 \pm 73,8$ ) enquanto que os ratos com NTA apresentaram elevação gradual ao longo do período estudado sendo, a mesma, significativa no dia D5 (em *Unidades/24h*: D0,  $540,8 \pm 104,0$ ; D2,  $401,3 \pm 82,6$ ; D4=  $948,5 \pm 182,0$  e D5,  $1139,0 \pm 94,9$ ).

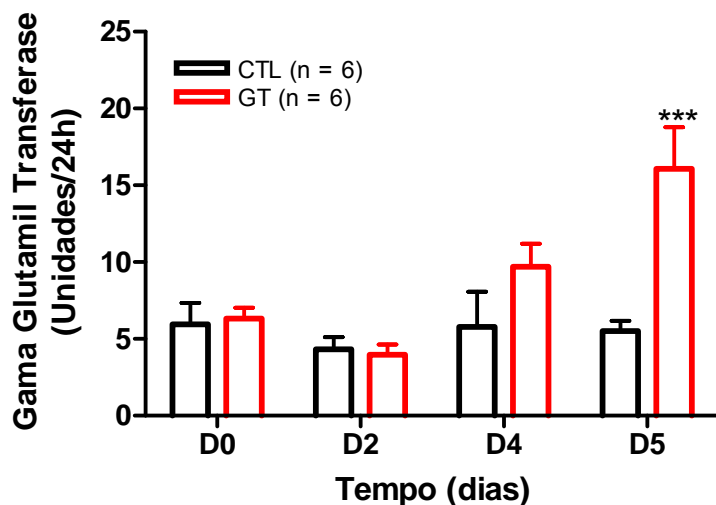


**Figura 13.** Razão proteína/creatinina urinárias (UP:C) ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle, GT, gentamicina, D, dia; D0, dia imediatamente anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*\* $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  vs CTL no mesmo dia.

#### 4.1.3.4 Sódio, Potássio, Osmolalidade e Água livre

A Tabela 3 mostra os valores de concentrações urinária e plasmática de sódio, potássio, creatinina e também da osmolalidade além de mostrar a relação entre a concentração urinária e plasmática de creatinina, nos ratos do grupo CTL e em ratos tratados com gentamicina nos dias D0, D2 e D4.





**Figura 14.** Excreção urinária da enzima gama-glutamil-transferase ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle, GT, gentamicina, D, dia; D0, dia imediatamente anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*  $p < 0,05$  vs CTL no mesmo dia.

**Tabela 3**

Concentração plasmática e urinária de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , osmolalidades urinária e plasmática, concentrações plasmática e urinária de creatinina e relação U/P de creatinina em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

Parâmetro	CTL (n = 30)			GT (n = 33)		
	D0	D2	D4	D0	D2	D4
$[\text{Na}^+]_{\text{plasma}}$	136,3 $\pm$ 5,1	138,7 $\pm$ 6,0	136,9 $\pm$ 5,8	142,5 $\pm$ 3,7	133,3 $\pm$ 5,0	133,8 $\pm$ 5,0
$[\text{Na}^+]_{\text{urina}}$	135,0 $\pm$ 7,9	146,2 $\pm$ 7,7	151,1 $\pm$ 10,8	135,5 $\pm$ 6,6	<b>107,4<math>\pm</math>6,0*</b>	<b>91,4<math>\pm</math>6,7**</b>
$[\text{K}^+]_{\text{plasma}}$	4,6 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	<b>4,1<math>\pm</math>0,1**</b>
$[\text{K}^+]_{\text{urina}}$	304,1 $\pm$ 24,0	303,3 $\pm$ 25,2	296,3 $\pm$ 20,2	291,7 $\pm$ 15,5	301,1 $\pm$ 21,0	262,5 $\pm$ 21,3
Osm <sub>plasma</sub>	277,0 $\pm$ 10,6	289,4 $\pm$ 7,2	296,4 $\pm$ 6,6	292,8 $\pm$ 6,7	297,3 $\pm$ 5,9	293,0 $\pm$ 5,3
Osm <sub>urina</sub>	2491,2 $\pm$ 104,5	2630,2 $\pm$ 104,2	2561,0 $\pm$ 118,8	2567,6 $\pm$ 97,0	2463,9 $\pm$ 77,1	<b>2009,7<math>\pm</math>95,9***</b>
[creat] <sub>plasma</sub>	0,61 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,04	<b>0,78<math>\pm</math>0,05*</b>
[creat] <sub>urina</sub>	86,0 $\pm$ 4,7	84,6 $\pm$ 3,6	90,9 $\pm$ 4,5	84,9 $\pm$ 4,4	87,3 $\pm$ 4,4	81,5 $\pm$ 4,6
U/P <sub>creat</sub>	150,3 $\pm$ 11,1	161,0 $\pm$ 15,2	150,3 $\pm$ 11,0	148,7 $\pm$ 8,0	141,7 $\pm$ 9,3	<b>111,3<math>\pm</math>7,0*</b>

[ ], concentração (mEq/l); Osm, osmolalidade (mOsmol/l); creat, creatinina (mg/dl); D, dia. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao mesmo período do controle.

Pode-se observar que não houve diferença significativa na concentração plasmática de sódio nos ratos com NTA em comparação com os ratos do grupo CTL em nenhum dos dias estudados (Tab. 3). No entanto, a concentração urinária de sódio apresentou-se diminuída nos dias D2 e D4 nos ratos do grupo GT em relação ao grupo CTL, passando de  $146,2 \pm 7,7$  nos ratos CTL para  $107,4 \pm 6,0$  mEq/l nos ratos GT, no dia D2 e de  $151,1 \pm 10,8$  nos ratos CTL para  $91,4 \pm 6,7$  mEq/l nos ratos GT, no dia D4 (Tab. 3).

A concentração plasmática de potássio apresentou-se significativamente mais baixa apenas no dia D4 nos ratos do grupo GT ( $4,1 \pm 0,1$  mEq/l) quando comparado com os ratos CTL ( $4,6 \pm 0,2$  mEq/l). Já a concentração urinária desse íon não foi estatisticamente diferente entre os grupos em nenhum dos dias estudados.

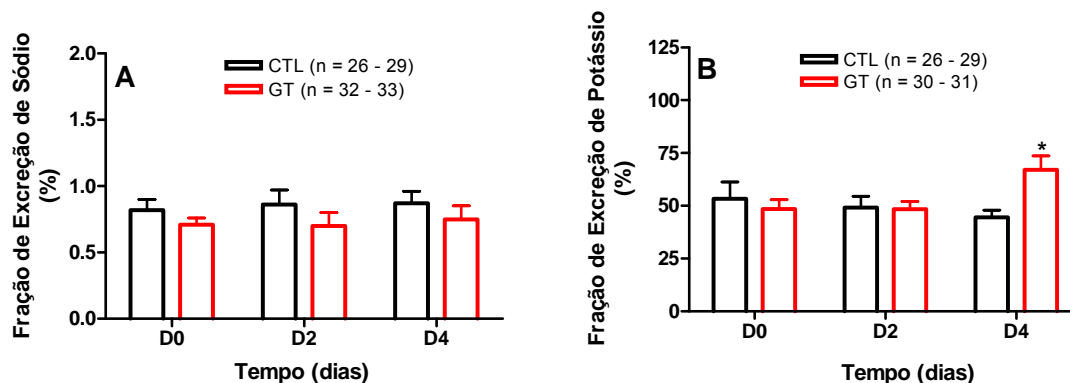
Não houve diferença significativa entre a osmolalidade plasmática nos ratos do grupo GT quando comparado aos ratos do grupo CTL em nenhum dos dias avaliados, mas a osmolalidade urinária foi estatisticamente menor nos ratos do grupo GT no dia D4, passando de  $2561,0 \pm 118,8$  nos ratos CTL para  $2009,7 \pm 95,9$  mOsm/kg nos ratos GT (Tab. 3).

Como já mostrado anteriormente (Fig. 9A), a concentração plasmática de creatinina, foi significativamente maior nos ratos do grupo GT. Já a concentração urinária manteve-se inalterada nos grupos experimentais avaliados. Nos ratos que receberam GT, a relação entre a concentração urinária e a plasmática de creatinina (U/P creatinina) foi significativamente menor no último dia do experimento (D4) em comparação com os ratos do grupo CTL.

A Figura 15 mostra as frações de excreção de sódio e potássio nos ratos tratados com GT por 5 dias. Apesar da lesão tubular já estar evidenciada por marcadores como, por exemplo, a enzima gama-glutamil transferase, não houve diferença significativa na fração de excreção de sódio (Fig. 15A) entre os ratos do grupo GT e os do grupo, em nenhum dos dias estudados. No entanto, a fração de excreção de potássio (Fig. 15B) foi estatisticamente maior no dia D4 nos ratos do grupo GT ( $67,1 \pm 6,6\%$ ), quando comparado aos ratos CTL, os quais apresentaram uma excreção fracional de  $K^+$  igual a  $44,5 \pm 3,4\%$ .

Os dados apresentados na Tabela 4 evidenciam que a GT, por 5 dias, diminuiu, de forma significativa, o *clearance* osmolar. Nos ratos do grupo GT esse *clearance* foi de  $85,4 \pm 4,1$  ml/24h em contraste com  $103,9 \pm 5,4$  ml/24h, nos ratos do grupo CTL.

Pode-se observar também, que a GT tornou o *clearance* de água livre menos negativo ( $-72,5 \pm 3,9$  ml/24h vs  $-91,8 \pm 5,1$  no grupo CTL).



**Figura 15.** Fração de excreção de sódio (A) e de potássio (B) ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle, GT, gentamicina, D, dia; D0, dia imediatamente anterior ao início do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*  $p < 0,05$  vs CTL no mesmo dia.

As relações  $UPNa^+$ ,  $UPK^+$ ,  $UPNa^+/UP_{creatinina}$ ,  $UPK^+/UP_{creatinina}$ , também estão mostradas na Tabela 4. Ao analisar a relação  $UPNa^+$  pode se observar que tal relação apresentou-se significativamente diminuída, no dia D4, nos ratos do grupo GT em comparação aos ratos do grupo CTL. Já a relação  $UPK^+$  não apresentou diferença entre os grupos estudados em nenhum dos dias avaliados. A razão entre  $UPNa^+/UP_{creatinina}$  não foi diferente entre os grupos em nenhum dos dias estudados. No entanto, a razão  $UPK^+/UP_{creatinina}$ , foi estatisticamente maior no dia D4 nos ratos do grupo GT, quando comparada com ratos do grupo CTL no mesmo dia.

**Tabela 4**

Razões  $UPNa^+$ ,  $UPK^+$ ,  $UPNa^+/UP_{creatinina}$  e  $UPK^+/UP_{creatinina}$ , em ratos ao longo de 5 dias de tratamento com gentamicina.

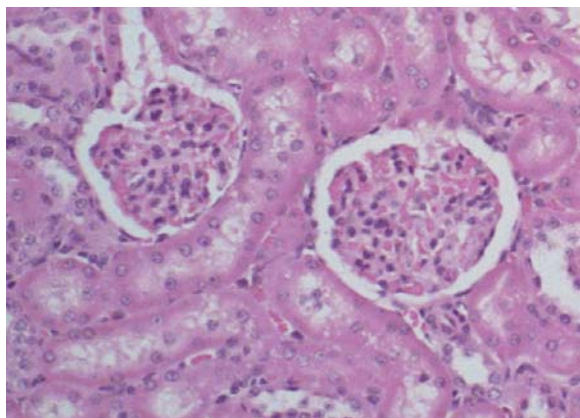
Parâmetro	CTL (n = 29 - 30)			GT (n = 33)		
	D0	D2	D4	D0	D2	D4
$C_{osm}$ (ml/24h)	111,1 ± 4,8	109,3 ± 4,6	103,9 ± 5,4	100,2 ± 3,7	96,3 ± 4,3	<b>85,4 ± 4,1**</b>
$C_{H_2O}$ (ml/24h)	-98,9 ± 4,8	-97,2 ± 4,4	-91,8 ± 5,1	-88,0 ± 3,7	-84,6 ± 4,0	<b>-72,5 ± 3,9**</b>
$UPNa^+$	1,04 ± 0,08	1,08 ± 0,11	1,11 ± 0,09	0,96 ± 0,05	0,88 ± 0,09	<b>0,72 ± 0,07*</b>
$UPK^+$	69,6 ± 8,1	63,3 ± 4,1	63,9 ± 4,3	62,4 ± 4,0	61,3 ± 4,4	65,4 ± 5,5
$UPNa/UP_{cre}$	0,0076 ±	0,0082 ±	0,0085 ±	0,0071 ±	0,0072 ±	0,0073 ±
at	0,0007	0,001	0,0007	0,0004	0,0009	0,00103
$UPK/UP_{creat}$	0,51 ± 0,08	0,47 ± 0,05	0,43 ± 0,04	0,48 ± 0,04	0,49 ± 0,03	<b>0,63 ± 0,05**</b>

C, *clearance*; osm, osmolar; creat, creatinina; D, dia. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs CTL no mesmo dia.

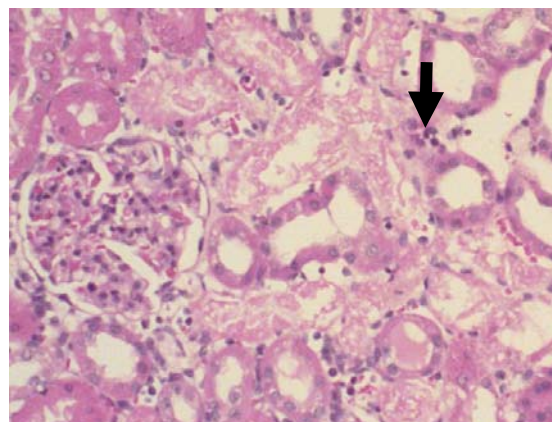
#### 4.1.3.5 Gentamicina e Aspecto Morfológico Renal

A Figura 16 compara o aspecto morfológico de rins de ratos do grupo CTL e de ratos com NTA induzida por GT. No grupo CTL, pode-se observar a preservação da arquitetura tecidual, caracterizada pela presença de tecido epitelial cúbico simples nos túbulos renais. As células do parênquima renal apresentam núcleos centrais e esféricos com nucléolo evidente (Figs 16A e 16C). No grupo tratado com GT, pode-se observar a presença de infiltrado mononuclear (Fig. 16B) e de núcleos picnóticos com cariólise, em células de túbulo com necrose de coagulação (Fig. 16D).

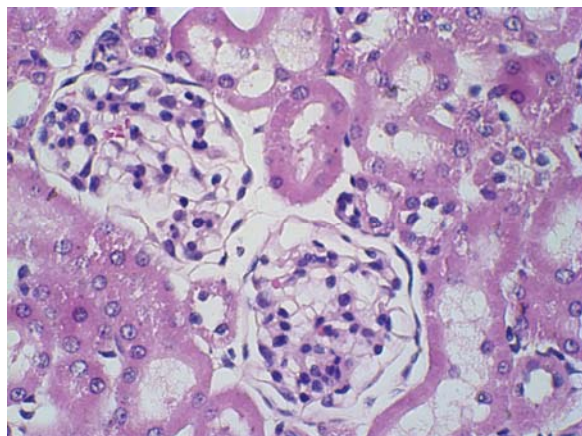
Em resumo, a gentamicina quando administrada na dose de 80 mg/Kg/dia por cinco dias induziu o aparecimento de lesão renal uma vez que vários indicadores característicos da necrose tubular aguda foram similares aos já descritos na literatura e, portanto, validam o modelo.

**A**

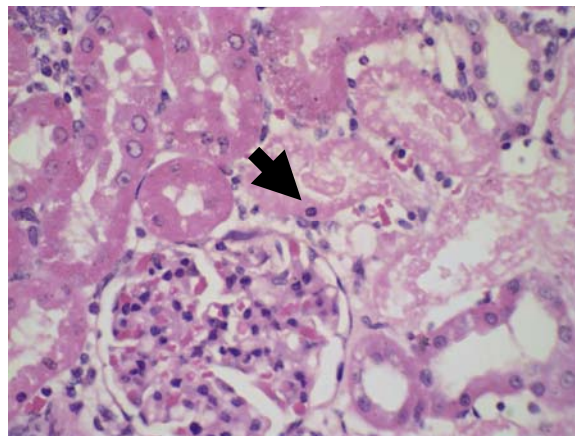
**Figura 16A.** Corte histológico do rim esquerdo de rato CTL (aumento: 20 vezes, Hematoxilina-Eosina).

**B**

**Figura 16B.** Corte histológico do rim esquerdo de rato tratado com GT (aumento: 20 vezes, Hematoxilina-Eosina). A seta indica infiltrado mononuclear.

**C**

**Figura 16C.** Corte histológico do rim esquerdo de rato CTL (aumento: 60 vezes, Hematoxilina-Eosina)

**D**

**Figura 16D.** Corte histológico do rim esquerdo de rato tratado com GT (aumento: 60 vezes, Hematoxilina-Eosina). A seta indica núcleo picnótico, em túbulo com necrose de coagulação, com cariólise.

## 4.2 Função Renal em Ratos Com NTA Induzida Pela Gentamicina Sob Infusão de Angiotensina(1-7)

### 4.2.1 Angiotensina(1-7) e função renal em ratos com NTA induzida pela gentamicina

#### 4.2.1.1 Fluxo Plasmático Renal

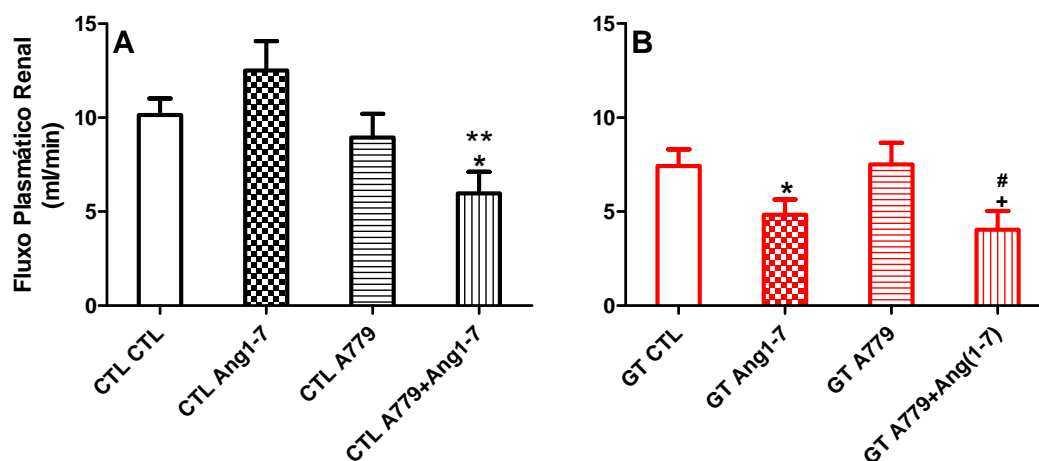
O Fluxo plasmático renal (FPR) foi determinado através do *clearance* do paraaminohipurato de sódio (PAH).

A Figura 17 compara o efeito da Ang(1-7) sobre o FPR em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. Inicialmente, foi observado que o simples tratamento com GT induz uma redução significativa do FPR ( $7,42 \pm 0,89$  ml/min vs  $10,15 \pm 0,87$  ml/min no grupo CTL,  $p \leq 0,05$ ) (barras brancas, Figs. 17A e 17B). A Ang(1-7), enquanto que não tenha afetado o FPR nos ratos do grupo CTL (Fig. 17A), significativamente o reduziu nos ratos do grupo GT (Fig. 17B). O antagonista do receptor Mas, A779, por si só, não afetou o perfil de resposta à Ang(1-7) tanto no grupo CTL, como no grupo GT (Fig. 17). No entanto, a associação de A779 e Ang(1-7) produziu uma diminuição significativa do FPR no grupo CTL, quando comparado com ratos CTL infundidos na ausência e na presença de Ang(1-7) apenas (Fig. 17A). Já nos ratos do grupo GT, a associação de A779 e Ang(1-7) produziu redução significativa do FPR somente em relação aos ratos GT (Fig. 17B).

#### 4.2.1.2 Ritmo de Filtração Glomerular

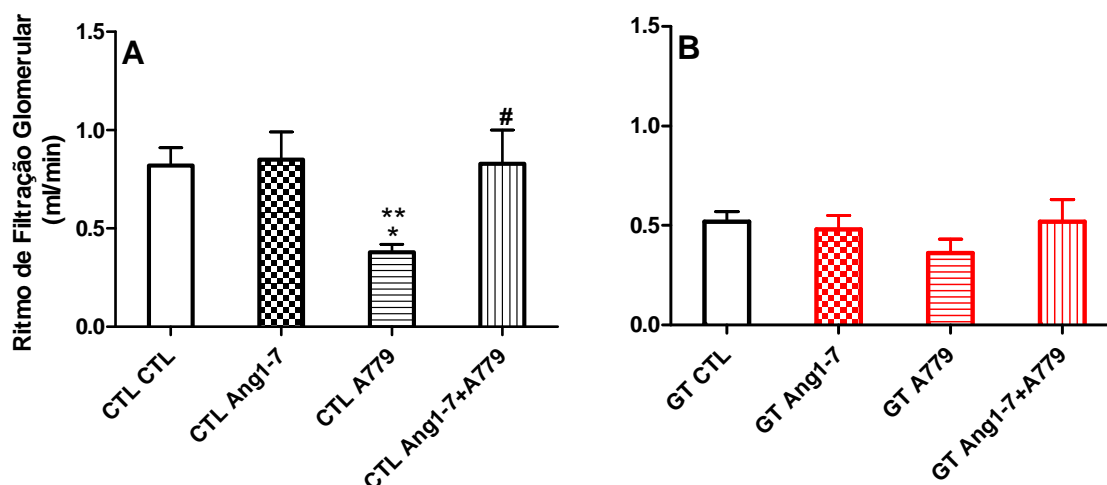
O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi determinado através do *clearance* da inulina.

A Figura 18 compara o efeito da Ang(1-7) sobre o RFG em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. De forma similar ao observado para o FPR, apenas o tratamento com GT diminuiu significativamente o RFG ( $0,52 \pm 0,05$  ml/min vs



**Figura 17.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre o fluxo plasmático renal em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL,  $n = 30$  e GT CTL,  $n = 31$ ) na ausência ( $n[\text{CTL/GT}] = 8/8$ ) e na presença ( $n[\text{CTL/GT}] = 7/8$ ) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 ( $n = 6$ ) e GT A779 ( $n = 7$ ) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL). Em **B**, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \* $p \leq 0,05$  vs CTL; \*\* $p \leq 0,05$  vs Ang(1-7) e # $p \leq 0,05$  vs A779.

$0,82 \pm 0,09$  ml/min no grupo CTL,  $p \leq 0,05$ ) (barras brancas, Figs. 18A e 18B). A Ang(1-7), por si só, não afetou o RFG tanto nos ratos do grupo CTL (Fig. 18A), quanto nos ratos do grupo GT (Fig. 18B). O antagonista do receptor Mas, A779, também por si só, reduziu significativamente o RFG no grupo CTL, quando comparado com ratos CTL infundidos na ausência e na presença de Ang(1-7) apenas (Fig. 18A), não exibindo qualquer efeito no grupo GT (Fig. 18B). Nenhuma alteração, no RFG, foi detectada quando da associação de A779 e Ang(1-7) tanto em ratos CTL, quanto em ratos do grupo GT (Figs. 18A e 18B).

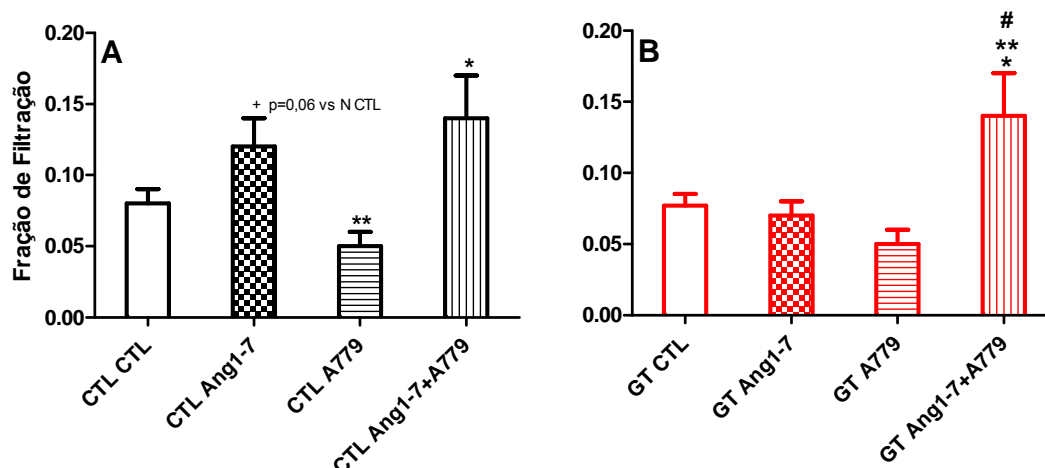


**Figura 18.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre o ritmo de filtração glomerular em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL,  $n = 30$  e GT CTL,  $n = 32$ ) na ausência ( $n[CTL/GT] = 9/10$ ) e na presença ( $n[CTL/GT] = 7/7$ ) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 ( $n = 6$ ) e GT A779 ( $n = 7$ ) foram infundidos apenas com A779. Em A, controle (CTL) e em B, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \* $p \leq 0,05$  vs CTL; \*\* $p \leq 0,05$  vs Ang(1-7) e # $p \leq 0,05$  vs A779.

#### 4.2.1.3 Fração de Filtração

A Figura 19 compara o efeito da Ang(1-7) sobre a fração de filtração (FF) em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. Ao contrário do observado para o FPR e para o RFG, o tratamento com GT não afeta a FF de forma significativa ( $0,080 \pm 0,010$  vs  $0,077 \pm 0,008$  no grupo CTL,  $p > 0,05$ ) (barras brancas, Figs. 19A e 9B). A Ang(1-7) aumentou significativamente a FF nos ratos do grupo CTL (Fig. 19A), embora não a tenha alterado nos ratos do grupo GT (Fig. 19B). O antagonista do receptor Mas, A779, por si só, produziu uma redução significativa da FF no grupo CTL, quando comparado com ratos CTL infundidos com Ang(1-7) apenas (Fig. 19A). No grupo GT, o A779 não afetou o perfil de resposta à Ang(1-7) (Fig. 19B). Já a associação de A779 e Ang(1-7) produziu um aumento significativo da FF tanto no grupo CTL, quando comparado com ratos CTL infundidos na ausência de Ang(1-7) apenas (Fig. 19A), como no grupo GT infundidos na ausência e na presença de Ang(1-7) (Fig. 19B).



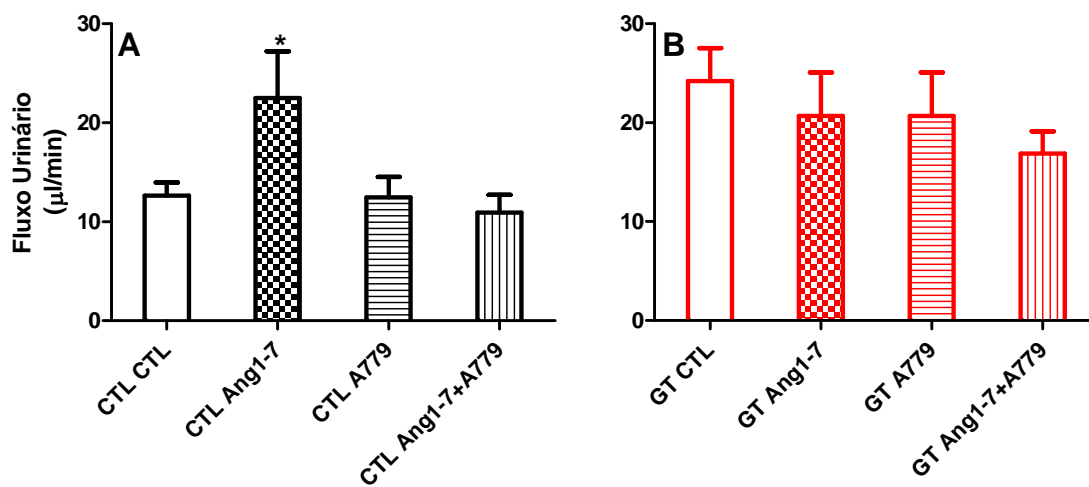


**Figura 19.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de filtração em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL, n = 30 e GT CTL, n = 27) na ausência (n[CTL/GT] = 9/10) e na presença (n[CTL/GT] = 7/7) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 (n = 6) e GT A779 (n = 7) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL) e em **B**, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \* $p \leq 0,05$  vs CTL; \*\*  $p \leq 0,05$  vs Ang(1-7) e # $p \leq 0,05$  vs A779. FF = RFG/FPR.

#### 4.2.1.4 Fluxo Urinário

O fluxo urinário (FU) foi determinado por gravimetria.

Figura 20 compara o efeito da Ang(1-7) sobre o FU em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. Confirmando a observação de que a GT aumenta o FU de 24 h após 5 dias de tratamento (Fig. 10), esse parâmetro mostrou-se elevado no grupo GT, mesmo quando o FU foi examinado por períodos curtos (1 h). Nesse caso, o FU foi de  $24,2 \pm 3,3$  e  $12,6 \pm 1,3$   $\mu\text{l}/\text{min}$  nos grupos GT e CTL, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (barras brancas, Figs. 20A e 20B). A Ang(1-7), aumentou o FU nos ratos do grupo CTL (Fig. 20A) embora não o tenha alterado nos ratos do grupo GT (Fig. 20B). O antagonista do receptor Mas, A779, por si só, não afetou o perfil de resposta à Ang(1-7) tanto no grupo CTL, como no grupo GT (Fig. 20). A associação de A779 e Ang(1-7) também não induziu qualquer alteração detectável no FU tanto no grupo CTL (Fig. 20A), como no grupo GT (Fig. 20B).

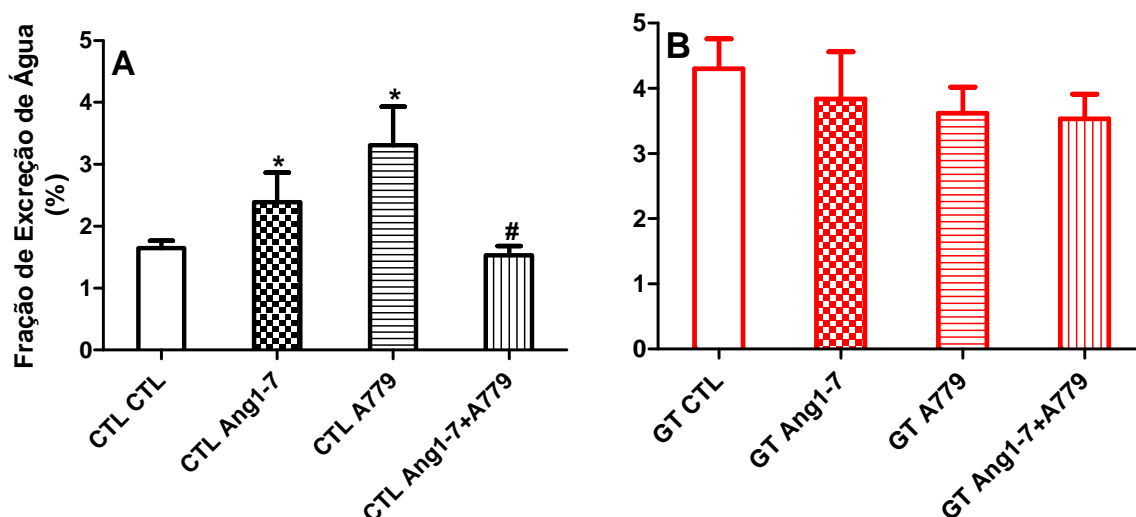


**Figura 20.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre o fluxo urinário em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) (n = 9 – 16) foi infundida ou não (grupos CTL CTL, n = 32 e GT CTL, n = 33) na ausência (n[CTL/GT] = 9/16) e na presença (n[CTL/GT] = 6/8) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 (n = 6) e GT A779 (n = 7) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL) e em **B**, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*p $\leq$ 0,05 vs CTL.

#### 4.2.1.5 Fração de Excreção de Água

A Figura 21 compara o efeito da Ang(1-7) sobre a fração de excreção de água ( $\text{FEH}_2\text{O}$ ) em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. De forma similar ao FU, a  $\text{FEH}_2\text{O}$ , quando examinada por períodos curtos de tempo (1 h), também confirma a observação de 24 h após 5 dias de tratamento (Fig. 11) de que a GT realmente aumenta essa fração. A  $\text{FEH}_2\text{O}$  determinada em período curto de tempo (1 h), foi de  $4,30 \pm 0,46$  e  $1,65 \pm 0,12\%$  nos grupos GT e CTL, respectivamente (p $\leq$ 0,05) (barras brancas, Figs. 21A e 21B). A Ang(1-7) aumentou significativamente a  $\text{FEH}_2\text{O}$  nos ratos do grupo CTL (Fig. 21A), embora não a tenha alterado nos ratos do grupo GT (Fig. 21B). O antagonista do receptor Mas, A779, por si só, produziu um aumento significativo da  $\text{FEH}_2\text{O}$  no grupo CTL, quando comparado com ratos CTL infundidos com NaCl 0,9% apenas (grupo CTL CTL, Fig. 21A). No grupo GT, o A779 não afetou o perfil

de resposta à Ang(1-7) (Fig. 21). Já a associação de A779 e Ang(1-7) produziu uma diminuição significativa da  $FEH_2O$  no grupo CTL quando comparada com ratos CTL infundidos com o A779 apenas.

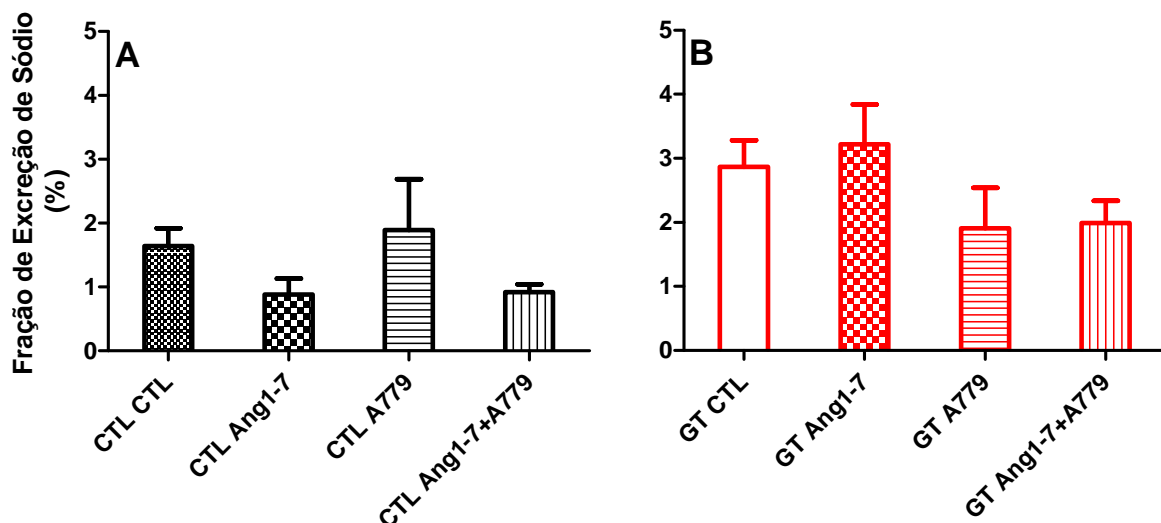


**Figura 21.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de excreção de água em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL,  $n = 25$  e GT CTL,  $n = 28$ ) na ausência ( $n[CTL/GT] = 9/9$ ) e na presença ( $n[CTL/GT] = 7/7$ ) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 ( $n = 6$ ) e GT A779 ( $n = 7$ ) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL) e em **B**, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \* $p \leq 0,05$  vs CTL e # $p \leq 0,05$  vs A779.  $FEH_2O = FU/RFG \times 100$ .

#### 4.2.1.6 Fração de Excreção de Sódio

A Figura 22 compara o efeito da Ang(1-7) sobre a fração de excreção de sódio ( $FENa^+$ ) em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. Contrariando a observação de que a GT não afeta a  $FENa^+$  de 24 h após 5 dias de tratamento (Fig. 15A), esse parâmetro mostrou-se elevado no grupo GT quando examinado por períodos curtos (1 h). Nesse caso, a  $FENa^+$  foi de  $2,87 \pm 0,41$  e  $1,64 \pm 0,28\%$  nos grupos GT e CTL, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (barras brancas, Figs. 22A e 22B). A Ang(1-7) não produziu qualquer alteração significativa na  $FENa^+$  tanto nos ratos do grupo CTL (Fig. 22A), quanto nos ratos do grupo GT (Fig. 22B). O antagonista do receptor Mas, A779,

por si só, ou associado à Ang(1-7) também não afetou a  $\text{FENa}^+$  no grupo CTL (Fig. 22A, nem no grupo GT (Fig. 22B).

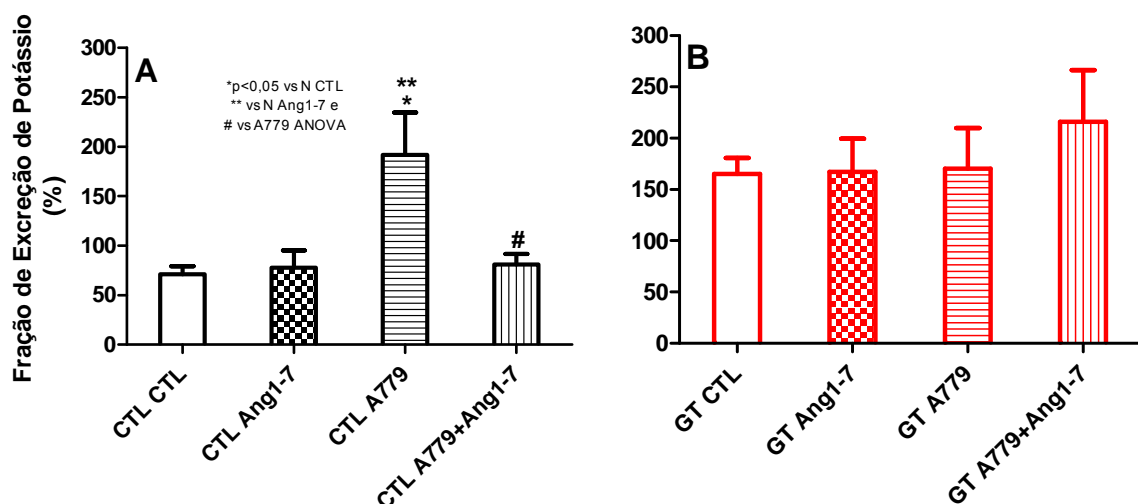


**Figura 22.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de excreção de sódio em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL,  $n = 30$  e GT CTL,  $n = 29$ ) na ausência ( $n[\text{CTL/GT}] = 7/8$ ) e na presença ( $n[\text{CTL/GT}] = 7/7$ ) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 ( $n = 6$ ) e GT A779 ( $n = 7$ ) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL) e em **B**, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.  $\text{FENa}^+ = \text{QENa}^+ / \text{QFNa}^+ \times 100$ .

#### 4.2.1.7 Fração de Excreção de Potássio

A Figura 23 compara o efeito da Ang(1-7) sobre a fração de excreção de potássio ( $\text{FEK}^+$ ) em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. De forma similar ao FU e à  $\text{FEH}_2\text{O}$ , a  $\text{FEK}^+$ , quando examinada por períodos curtos de tempo (1 h), também confirma a observação de 24 h após 5 dias de tratamento (Fig. 15B) de que a GT aumenta essa fração. A  $\text{FEK}^+$  determinada em período curto de tempo (1 h), foi de  $165 \pm 16$  e  $71 \pm 8\%$  nos grupos GT e CTL, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (barras brancas, Figs. 23A e 23B). A Ang(1-7) não alterou, de forma significativa, a  $\text{FEK}^+$  nem no grupo CTL (Fig. 23A), nem no grupo GT (Fig. 23B). O antagonista do receptor Mas, A779, por

si só, produziu um aumento significativo da  $FEK^+$  no grupo CTL, quando comparado com ratos CTL infundidos apenas com NaCl 0,9% (grupo CTL CTL) ou com apenas Ang(1-7) (grupo CTL Ang(1-7)) (Fig. 23A). No grupo GT, o A779 não afetou o perfil de resposta à Ang(1-7) (Fig. 23B). A associação de A779 e Ang(1-7) produziu uma diminuição significativa da  $FEK^+$  no grupo CTL quando comparada com ratos CTL infundidos com o A779 apenas.

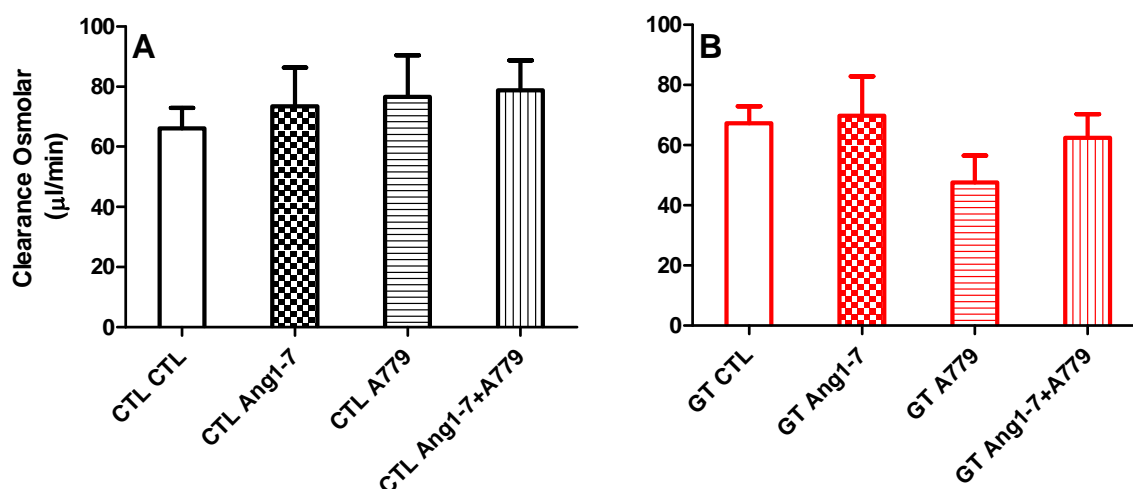


**Figura 23.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre a fração de excreção de potássio em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL, n = 25 e GT CTL, n = 30) na ausência (n[CTL/GT] = 8/8) e na presença (n[CTL/GT] = 7/8) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 (n = 6) e GT A779 (n = 7) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL) e em **B**, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM; \*p $\leq$ 0,05 vs CTL e #p $\leq$ 0,05 vs A779.  $FEK^+ = QEK^+ / QFK^+ \times 100$ .

#### 4.2.1.8 Clearance Osmolar

A Figura 24 compara o efeito da Ang(1-7) sobre o *clearance* osmolar (Cosm) em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. Contrariando a observação de que a GT reduz o Cosm de 24 h após 5 dias de tratamento (Tab. 4), esse parâmetro mostrou-se inalterado no grupo GT quando examinado por períodos curtos de tempo (1 h). Nesse caso, o Cosm foi de  $67,2 \pm 5,6$  e  $66,1 \pm 6,8$   $\mu$ l/min nos grupos GT e CTL,

respectivamente ( $p>0,05$ ) (barras brancas, Figs. 24A e 24B). A Ang(1-7) não produziu qualquer alteração significativa no Cosm tanto nos ratos do grupo CTL (Fig. 24A), quanto nos ratos do grupo GT (Fig. 24B). O antagonista do receptor Mas, A779, por si só, ou associado à Ang(1-7) também não afetou o Cosm no grupo CTL (Fig. 24A), nem no grupo GT (Fig. 24B).

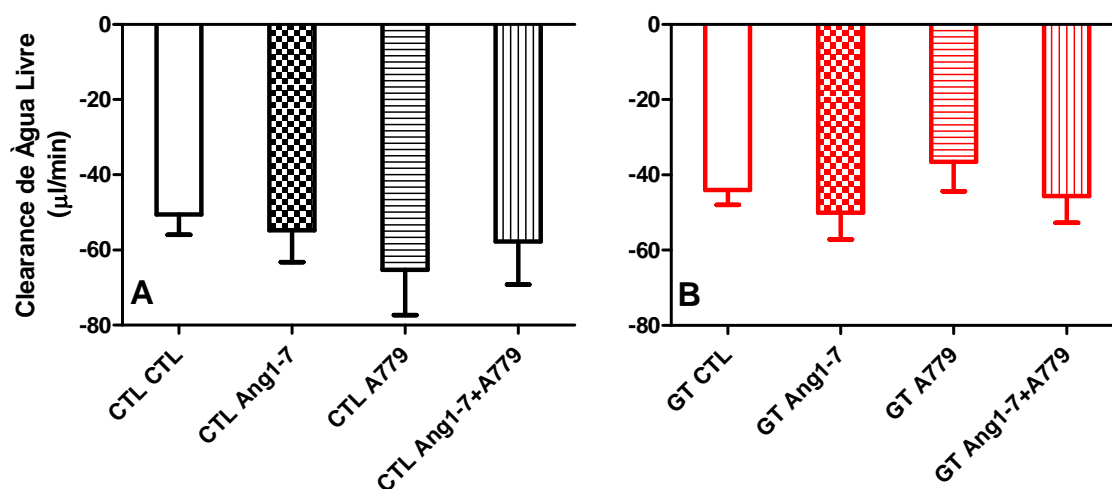


**Figura 24** Efeito da angiotensina(1-7) sobre o *clearance* osmolar em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL,  $n = 30$  e GT CTL,  $n = 31$ ) na ausência ( $n[CTL/GT] = 10/9$ ) e na presença ( $n[CTL/GT] = 6/8$ ) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 ( $n = 6$ ) e GT A779 ( $n = 7$ ) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL) e em **B**, gentamicina (GT). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### 4.2.1.9 Clearance de Água Livre

A Figura 25 compara o efeito da Ang(1-7) sobre o *clearance* de água livre ( $CH_2O$ ) em ratos normais (CTL) e em ratos com NTA induzida pela GT. Contrariando a observação de que a GT torna o  $CH_2O$  de 24 h após 5 dias de tratamento menos negativo (Tab. 4), esse parâmetro mostrou-se inalterado no grupo GT quando examinado por períodos curtos de tempo (1 h). Nesse caso, o  $CH_2O$  foi de  $-44,0 \pm 3,9$  e  $-55,5 \pm 5,4$  µl/min nos grupos GT e CTL, respectivamente ( $p>0,05$ ) (barras brancas,

Figs. 25A e 25B). A Ang(1-7) não produziu qualquer alteração significativa no  $\text{CH}_2\text{O}$  tanto nos ratos do grupo CTL (Fig. 25A), quanto nos ratos do grupo GT (Fig. 25B). O antagonista do receptor Mas, A779, por si só, ou associado à Ang(1-7) também não afetou o  $\text{CH}_2\text{O}$  no grupo CTL (Fig. 25A), nem no grupo GT (Fig. 25B).

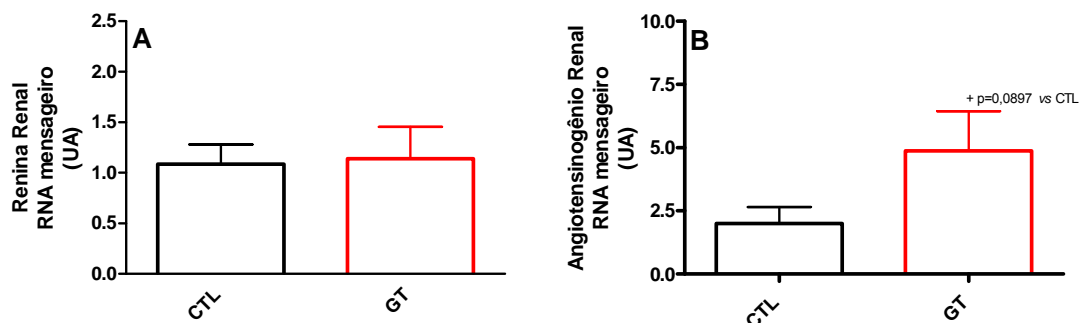


**Figura 25.** Efeito da angiotensina(1-7) sobre o *clearance* de água livre em ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. A Ang(1-7) foi infundida ou não (grupos CTL CTL, n = 30 e GT CTL, n = 31) na ausência (n[CTL/GT] = 10/9) e na presença (n[CTL/GT] = 7/8) do antagonista A779 conforme indicado na Figura. Os grupos CTL A779 (n = 6) e GT A779 (n = 7) foram infundidos apenas com A779. Em **A**, controle (CTL) e em **B** gentamicina (GT). Os valores representam a média ± EPM.

### 4.3 Expressão Renal de RNA Mensageiro que Codifica Componentes do Sistema Renina-Angiotensina em Ratos com NTA Induzida pela Gentamicina

#### 4.3.1 Angiotensinogênio e renina renais

A Figura 26 mostra o conteúdo de RNA mensageiro que codifica a renina e o angiotensinogênio em rins de ratos tratados com GT. A GT não alterou, de forma significativa, o conteúdo de RNA mensageiro que codifica a enzima renina (Fig. 26A). Já o conteúdo renal de angiotensinogênio (Fig. 26B) apresentou tendência de aumento pelo tratamento com GT (em *unidades arbitrárias*:  $4,87 \pm 1,57$  vs  $1,99 \pm 0,66$  no grupo CTL). No entanto, essa diferença não alcançou significância estatística ( $p = 0,0857$ ).

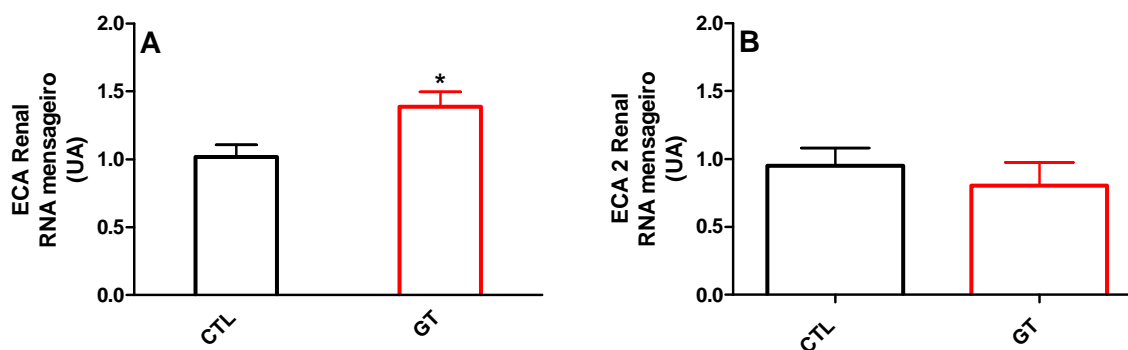


**Figura 26.** RNA mensageiro que codifica renina (A) e angiotensinogênio (B) em rins de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle (n = 6) e GT, gentamicina (n = 4 - 6). Os níveis de RNA mensageiro que codifica renina ou angiotensinogênio relacionados aos níveis de GAPDH foram expressos como média  $\pm$  EPM de unidades arbitrárias (UA) de fluorescência obtidas durante a fase de amplificação exponencial (Ct) do cDNA.



### 4.3.2 Enzima Conversora de Angiotensina I e Enzima Conversora de Angiotensina II Renais

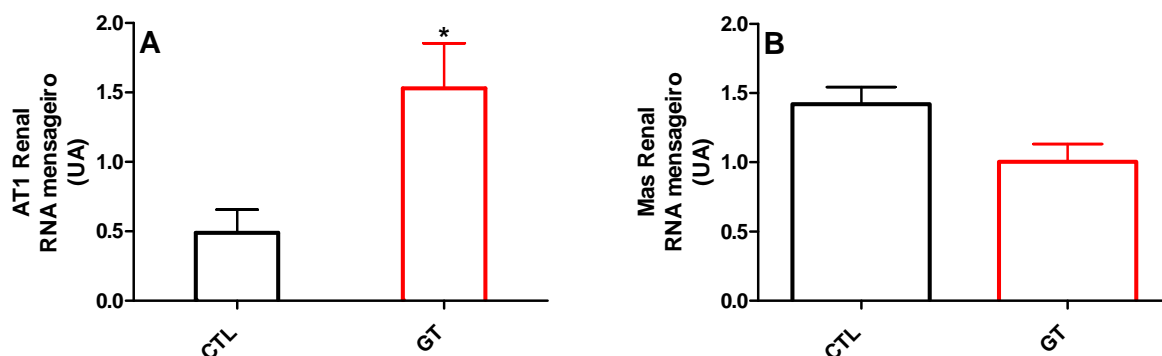
A Figura 27 mostra o conteúdo de RNA mensageiro que codifica a enzima conversora de angiotensina I (ECA) e a enzima conversora de angiotensina 2 e (ECA 2) em rins de ratos tratados com GT. O conteúdo renal de ECA aumentou, significativamente, nos rins de ratos submetidos à NTA induzida por GT (Fig. 27A). Estes valores, em unidades arbitrárias, foram elevados de  $1,02 \pm 0,09$  (CTL,  $n = 6$ ) para  $1,39 \pm 0,11$  ( $n = 6$ ) nos rins dos ratos do grupo GT. Já o RNA mensageiro renal que codifica a ECA2 (Fig. 27B) não apresentou diferença significativa pelo tratamento com GT (em *unidades arbitrárias*:  $0,81 \pm 0,17$  vs  $0,95 \pm 0,13$  no grupo CTL).



**Figura 27.** RNA mensageiro que codifica ECA (A) e ECA 2 (B) em rins de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle ( $n = 6$ ) e GT, gentamicina ( $n = 5 - 6$ ). Os níveis de RNA mensageiro que codifica ECA ou ECA 2 relacionados aos níveis de GAPDH foram expressos como média  $\pm$  EPM de unidades arbitrárias (UA) de fluorescência obtidas durante a fase de amplificação exponencial (Ct) do cDNA. \* $p < 0,05$  vs CTL.

### 4.3.3 Receptores AT1 e Mas Renais

A Figura 28 mostra o conteúdo de RNA mensageiro que codifica os receptores AT1 e Mas em rins de ratos tratados com GT. O conteúdo renal de receptor AT1 foi significativamente elevado nos rins de ratos submetidos à NTA induzida por GT (Fig. 28A). Estes valores, em unidades arbitrárias, foram elevados de  $0,49 \pm 0,17$  (CTL,  $n = 4$ ) para  $1,53 \pm 0,32$  ( $n = 5$ ). Por outro lado, o RNA mensageiro renal que codifica o receptor Mas (Fig.28B) não foi significativamente afetado pelo tratamento com GT (em *unidades arbitrárias*:  $1,00 \pm 0,05$  vs  $1,04 \pm 0,13$  no grupo CTL).



**Figura 28.** RNA mensageiro que codifica os receptores AT1 (A) e Mas (B) em rins de ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina. CTL, controle ( $n = 4 - 6$ ) e GT, gentamicina ( $n = 5 - 6$ ). Os níveis de RNA mensageiro que codifica os receptores AT1 ou Mas relacionados aos níveis de GAPDH foram expressos como média  $\pm$  EPM de unidades arbitrárias (UA) de fluorescência obtidas durante a fase de amplificação exponencial (Ct) do cDNA. \* $p < 0,05$  vs CTL.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Validação do modelo de necrose tubular aguda induzida por gentamicina

O modelo de necrose tubular aguda (NTA) induzida por gentamicina (GT), implantado em nosso laboratório e por nós utilizado pela primeira vez no presente estudo, é um modelo confiável e, portanto, válido, uma vez que parâmetros característicos da nefrotoxicidade deste antibiótico foram reprodutíveis e estão em consonância com dados relatados na literatura.

#### 5.1.1 Gentamicina e parâmetros não – renais

Em nosso estudo:

- O ganho de peso corporal foi menor nos ratos tratados com GT em relação aos ratos CTL. Esta observação foi similar ao encontrado nos estudos de Appel e cols., (1981) que verificaram que ratos tratados com gentamicina na dose de 80 mg/Kg/dia apresentaram menor ganho de peso.
- Contrariamente ao que ocorreu com o peso corporal, o peso dos rins foi aumentado pelo tratamento com GT, o que está de acordo com o descrito por Ali e cols. (2009). Este efeito, atribuído ao efeito nefrotóxico do antibiótico, provavelmente, é devido ao edema do órgão que ocorre na fase de implantação da NTA e pode estar relacionado a um processo inflamatório local.
- A GT promoveu significativa queda da pressão arterial sistólica. Em trabalho similar, Rivas-Cabañero e cols. (1995) verificaram que o L-NAME, um inibidor da síntese de óxido nítrico (NO), aumentou a pressão arterial em ratos tratados com altas doses de GT (100 mg/Kg/dia). Estudos têm relatado que a inibição do óxido nítrico agrava a insuficiência renal induzida pela GT, ao passo que a administração de L-arginina, precursor do óxido nítrico, tem efeito benéfico sobre as funções glomerulares e tubulares (Rivas-Cabañero e cols., 1994; Rivas-Cabañero e cols., 1995; Can e cols., 2000; Ghaznavi e cols., 2005; Seçilmiş e cols. 2005).

### 5.1.2 Gentamicina e parâmetros renais

Em nosso estudo:

- A GT produziu alterações morfológicas típicas de necrose tubular, podendo ser observada presença de infiltrado mononuclear e presença de núcleos picnóticos com cariólise, em túbulos com necrose de coagulação.
- A GT promoveu queda do RFG com concomitante elevação dos níveis plasmáticos de creatinina. Observações similares foram relatadas por diversos autores como: Banday e cols., 2008; Ghaznavi e Kadkhodaei, 2007; Soliman e cols., 2007; Cuzzocrea e cols., 2002; Mazzon e cols., 2001; Lee e cols., 2001; De-Barros-e-Silva e cols., 1992.
- A GT causou poliúria, aumento da fração de excreção de água e redução da osmolalidade urinária o que também confirma dados já descritos na literatura (Bae e cols. 2007; Lee e cols., 2001).
- A GT promoveu proteinúria, o que é um indicador de lesão renal. Esta observação é similar à obtida por outros autores (Papanikolaou e cols., 1992; Banday e cols., 2008).
- A GT aumentou a excreção urinária da enzima gama glutamil transferase (gama-GT), uma enzima da borda em escova do epitélio tubular. Isto indica lesão tubular e está de acordo com o já relatado por outros autores (Mazzon e cols., 2001; Cuzzocrea e cols., 2002).
- O tratamento com GT tornou o *clearance* de água livre menos negativo, o que indica uma redução na reabsorção de água, o que poderia, pelo menos em parte, ser o responsável pela poliúria observada.
- A GT reduziu a concentração plasmática de  $K^+$  bem como aumentou a fração de excreção do mesmo, dados esses, similares aos relatados por outros autores (Watson e cols., 1983; Cronin e Thompson, 1991; Silan e cols., 2007).
- A GT não alterou, de forma significativa, a fração de excreção de  $Na^+$ , o que está de acordo com o resultado obtido por Sohn e cols. (2003). No entanto, alguns autores

(Bae e cols., 2007; Cuzzocrea e cols., 2002; De-Barros-e-Silva e cols., 1992) têm descrito no diagnóstico de NTA, dentre outros, um aumento da fração de excreção de sódio. A  $\text{FENa}^+$  mantida inalterada nos ratos acordados, por si só, não descaracteriza a instalação da NTA induzida pela GT, já que outros indicadores de necrose tubular renal foram confirmados (redução do RFG, poliúria, aumento da gama-GT, morfologia etc).

Interessantemente, os ratos com NTA e que foram infundidos apenas com solução de NaCl 0,9% apresentaram  $\text{FENa}^+$  elevada, quando comparado aos ratos normais, também, infundidos apenas com solução de NaCl 0,9% (Fig. 22). Cabe lembrar que, de acordo com os protocolos experimentais (ver métodos), os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas durante o tratamento com GT (5 dias). Nesse período, os ratos foram submetidos à coleta de sangue e de urina e, passado esse tempo, esses mesmos ratos foram anestesiados antes de serem submetidos a procedimentos cirúrgicos para a infusão de diferentes substâncias. De modo que a alteração da  $\text{FENa}^+$  não detectada enquanto os ratos foram mantidos nas gaiolas, foi observada após os ratos serem anestesiados.

Tomados em conjunto, os nossos dados viabilizaram o uso do modelo de necrose tubular aguda induzida pela gentamicina, na dose de 80 mg/Kg/dia, por 5 dias consecutivos.

## **5.2 Função renal em ratos anestesiados e com necrose tubular aguda**

Em ratos anestesiados e infundidos com solução de NaCl 0,9% foi possível determinar o FPR pelo *clearance* do para-amino-hipurato de sódio (PAH) tanto em ratos CTL, como em ratos tratados com GT. Em nossos experimentos, a gentamicina, por si só, promoveu queda do FPR e do RFG, o que está de acordo com os relatos de outros autores (Appel e cols., 1981; Klotman e Yarger, 1983; Can e cols., 2000). Esse efeito da GT pode estar relacionado ao aumento dos níveis renais da enzima ECA e dos receptores AT1, o que culminaria com a ativação do eixo vasoconstritor do SRA. Por seu efeito vasoconstritor, a Ang II pode reduzir o RFG, o que agravaria o efeito

nefrotóxico da gentamicina. A participação do SRA na patogênese da NTA induzida pela GT tem sido estudada por muitos pesquisadores. Por exemplo, o uso de inibidores da ECA, que resulta na inativação da principal via de formação da Ang II, minimiza a queda do RFG em ratos tratados com GT (Hishida e cols., 1994; Yamada e cols., 1992; Morin e cols., 1989; Luft e cols., 1982; Schor e cols., 1981).

Além dos estudos com inibidores de ECA, antagonistas de receptores de angiotensinas, também tem sido utilizados na tentativa de elucidar a participação do SRA na NTA. Nesse sentido, a administração, por exemplo, de candesartan, um antagonista de receptor AT1, aumentou significativamente o FPR, em humanos (Wuerzner e cols., 2004). Já a administração, em ratos jovens e adultos, de Ang II, promoveu vasoconstrição tanto da arteríola aferente, quanto da eferente, o que contribui para a queda do FPR (Zhang e cols., 1997). Assim, como a GT, em nossos estudos, reduziu de forma similar tanto o FPR quanto o RFG, a FF manteve-se inalterada.

De um modo geral, os parâmetros renais medidos nos ratos após anestesia foram similares aos mesmos parâmetros medidos nos ratos acordados e mantidos em gaiolas metabólicas. Por exemplo, os ratos anestesiados e tratados com GT apresentaram poliúria e aumento da  $FEH_2O$ . Uma possível explicação para o aumento da produção de urina, em ratos com NTA induzida pela gentamicina é que esse antibiótico impediria a formação de AMP cíclico, o que reduziria a formação e mobilização das AQP2 para a membrana apical das células principais. Conseqüentemente, a reabsorção de água no ducto coletor diminuiria, culminando com um aumento na excreção de água (Lee e cols., 2001).

A perda urinária de  $Na^+$  e de  $K^+$ , nos ratos anestesiados, foi maior nos ratos tratados com GT. Este efeito, segundo muitos autores, se deve à necrose do túbulo proximal produzida pela GT (Banday e cols., 2008; Silan e cols., 2007; Cuzzocrea e cols., 2002).

Alguns parâmetros mostraram alterações, promovidas pela GT, divergentes quando analisadas nos ratos acordados ou anestesiados. Nos ratos anestesiados e tratados com GT, nenhuma alteração no *clearance* de água livre ( $CH_2O$ ) foi detectada. Isto pode ter sido devido à curta duração dos períodos de *clearances* (20 min). Já nos ratos acordados, a GT tornou o  $CH_2O$  menos negativo, indicando menor reabsorção de

água e formação de urina hiposmótica (Tab. 2), conforme também observado por Sohn e cols. (2003) em seus estudos. A inabilidade em concentrar urina é uma das características do modelo de NTA induzida por GT, pois reduz a reabsorção tubular de água (Sohn e cols., 2003).

### **5.3 Função renal em ratos anestesiados e com necrose tubular aguda sob infusão de Ang(1-7)**

Nesta sessão, será discutido a função renal em ratos anestesiados com NTA induzida pela GT sob a influência de infusão contínua de Ang(1-7) na ausência e na presença do antagonista de receptor Mas, o A779.

Embora não tenha alcançado significância estatística, a Ang(1-7) parece tender a aumentar o FPR nos ratos normais (Fig. 17), efeito este, bloqueado pelo antagonista de receptor Mas, A779, conforme pode ser visto na combinação de Ang(1-7) com A779 (grupo CTL Ang1-7+A779).

Nos ratos tratados com GT a Ang(1-7) reduziu o FPR, mas o A779 não interferiu nessa resposta (grupo GT Ang1-7+A779). A GT promoveu aumento dos níveis renais de RNA mensageiro que codifica a ECA. Na cascata do SRA, a ECA exerce importante papel porque, além de converter a Ang I em Ang II, hidrolisa a Ang(1-7) inativando-a (Yamada e cols., 1998). Então uma maior quantidade ou atividade da ECA levaria a uma maior degradação do heptapeptídeo. Esse evento, nos ratos tratados com GT, poderia, pelo menos em parte, explicar a queda do FPR em resposta à Ang(1-7). Ou ainda a queda do FPR, sob nossas condições experimentais, poderia ser explicada pela mediação da Ang(1-7) via receptor AT1. Em humanos, Ueda e cols., (2000) demonstraram que infusão de baixas doses de Ang(1-7) na artéria braquial induziu aumento do fluxo sanguíneo para o antebraço. Este aumento do fluxo sanguíneo foi devido ao efeito direto da Ang(1-7) vasodilatando o vaso e também pelo efeito indireto, inibindo os efeitos vasoconstritores da AngII. No entanto, altas doses de Ang(1-7) reduziu o fluxo sanguíneo para o antebraço e esse efeito foi devido à afinidade deste peptídeo com o receptor AT1.

A Ang(1-7) (exógena) não afetou o RFG nos ratos normais, mas o antagonista seletivo de receptor Mas, A779, o reduziu significativamente. Curiosamente, quando associado à Ang(1-7), o A779 não mais exibiu tal efeito. O efeito do A779 quando infundido isoladamente poderia ser atribuído ao fato de que, na dose utilizada, esse antagonista foi suficiente para bloquear a ligação da Ang(1-7) endógena aos receptores Mas. Porém, quando infundido em associação com Ang(1-7) (exógena), não foi mais capaz de bloquear a resposta na dose utilizada, devido à concentração mais elevada do heptapeptídeo (endógeno + exógeno). Nos ratos com NTA, embora o RFG já esteja reduzido apenas pelo tratamento, a Ang(1-7), o antagonista A779 ou mesmo a associação Ang(1-7) + o A779 não afetaram o RFG. Os dados disponíveis a cerca do efeito da Ang(1-7) sobre o RFG são discrepantes uma vez que alguns autores relatam que esse peptídeo aumenta o RFG, em ratos normais (Vallon e cols., 1998), enquanto outros relatam redução do mesmo, também, em ratos normais (Baracho e cols., 1998). Cabe ressaltar que os protocolos experimentais, utilizados pelos diferentes autores, não são os mesmos. Assim, fatores como magnitude da volemia e uso de anestésico poderiam interferir ou mesmo determinar os diferentes tipos de efeitos da Ang(1-7) sobre um mesmo parâmetro. Nesse estudo, nem a Ang(1-7), nem o A779 exibiu qualquer efeito sobre o RFG nos ratos tratados com GT. Com isto, pode se especular que na NTA induzida pela GT: i) a reatividade vascular renal a vasodilatadores, como a Ang(1-7), esteja diminuída, ii) enzimas que degradam a Ang(1-7) estejam aumentadas, como no caso da ECA e iii) os receptores para a Ang(1-7) estejam diminuídos e/ou com baixa afinidade.

A Ang(1-7) aumentou o FU nos ratos normais anestesiados. Esta observação está em consonância com os resultados obtidos por alguns autores que relataram ações diurética e natriurética da Ang(1-7), em ratos e em cães normotensos (Bürgelová e cols., 2002; Heller e cols., 2000; Vallon e cols., 1998; Handa e cols., 1996; Hilchey e Bell-Quilley, 1995; DelliPizzi e cols., 1994). Entretanto, a Ang (1-7) não apresenta apenas efeito diurético. Santos e Baracho (1992) verificaram que, em ratos acordados e com sobrecarga hídrica, a Ang(1-7) apresentava efeito antidiurético, o qual não era afetado pelo bloqueio do receptor V2 de vasopressina. A ação antidiurética da Ang(1-7) estava associada a uma redução significativa do RFG e o uso do antagonista do receptor Mas,



A779, atenuou esse efeito (Santos e cols., 1996; Baracho e cols., 1998; Simões e Silva e cols., 1998; Simões e Silva e cols., 1997). Garcia e Garvin (1994) descreveram um efeito bifásico da Ang(1-7), onde concentrações fisiológicas do peptídeo aumentava a reabsorção de fluidos no túbulo proximal, enquanto que altas doses a reduzia. Ainda no rim, a Ang(1-7) altera a reabsorção tubular de sódio e de bicarbonato (Campagnole-Santos e cols., 1989; Handa e cols., 1996), diminui a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Garcia e Garvin, 1994) e aumenta o transporte de água no ducto coletor da medula interna (Santos e cols., 1996; Magaldi e cols., 2003). Joyner e cols. (2008b) verificaram que a Ang(1-7) pode exibir efeitos antagônicos dependendo do estado fisiológico. Por exemplo, ela promove diurese, com redução da osmolalidade urinária, durante a fase final de gestação em ratas, mas também induz antidiurese, com aumento da osmolalidade urinária, em ratas virgens (Joyner e cols., 2008a). Os autores atribuíram a diurese ao aumento da ingestão de água, redução da vasopressina plasmática e “*downregulation*” da AQP1 renal. A antidiurese foi atribuída à reabsorção de água, a qual poderia, em parte, ser mediada pela “*upregulation*” da AQP1. O A779 bloqueou tanto a diurese, como a antidiurese. Em nosso estudo, o A779 também impediu o aumento da diurese em resposta à Ang(1-7), o que indica que o aumento da diurese foi devido à ativação do receptor Mas.

Em resumo, a Ang(1-7) pode causar tanto diurese, quanto antidiurese sendo, o tipo de efeito, dependente das condições experimentais, as quais incluem: via de administração, dose, estado de hidratação, o sítio de exposição à Ang(1-7) no néfron (Chappell e cols., 1998) ou ainda se o estudo foi feito *in vitro* ou *in vivo* e do estado de vigília (se animais acordados ou anestesiados). Em nossos estudos, foram utilizados ratos anestesiados, o que pode ter interferido no efeito da Ang(1-7) ao causar poliúria. Resultado semelhante foi obtido por Handa e cols. (1996), os quais observaram que a Ang(1-7) produz diurese e natriurese também em ratos anestesiados. Essa observação juntamente com a por nós obtida diverge daquela relatada por Santos e Baracho (1992), onde a Ang(1-7), administrada periféricamente, produziu antidiurese em ratos acordados e submetidos a uma sobrecarga hídrica. Como observado para o RFG, o FU não foi afetado pela Ang(1-7) nos ratos tratados com GT. As possíveis explicações para isto seriam as mesmas já especuladas para explicar a ausência de efeito desse peptídeo

sobre o RFG, ou seja, fatores como baixa reatividade vascular e/ou número de receptores diminuídos ou com baixa afinidade.

Em ratos normais, a  $FEH_2O$  foi elevada tanto pela Ang(1-7), como pelo A779. Isto era esperado, pois a Ang(1-7) aumentou o FU sem alterar o RFG, ao passo que o A779, por si só, reduziu o RFG sem, no entanto, afetar o FU. Nos ratos tratados com GT, Ang(1-7), o A779 e associação Ang(1-7)+A779 não produziram qualquer alteração detectável, igualmente ao observado para o RFG e FU.

O  $CH_2O$  não sofreu qualquer alteração pela infusão de Ang(1-7), A779 ou pela associação Ang(1-7)+A779, quer seja em ratos normais, quer seja em ratos tratados com GT. Esta observação vai de encontro ao trabalho de Pinheiro e cols. (2009) que relataram, em camundongos *knockout* para o receptor Mas, um  $CH_2O$  inalterado mesmo com o FU e o FPR reduzidos. Nesse mesmo trabalho, foi verificado que camundongos selvagens (*wildtype*) para o receptor Mas, apresentaram  $C_{osm}$  semelhante aos camundongos *knockout* para esse receptor, indicando que a Ang(1-7) não afeta esse parâmetro ou que, se afetasse, não o faria via receptor Mas. Em nossos experimentos, a Ang(1-7) não exibiu qualquer efeito detectável sobre o  $C_{osm}$ , nem em ratos normais, nem em ratos com NTA.

A Ang(1-7), o A779 e a associação Ang(1-7)+A779 não alterou, de forma significativa, a  $FENa^+$  tanto em ratos normais, como em ratos com NTA. Diferentemente, estudos têm mostrado que a Ang(1-7) produz acentuada em ratos e cães normotensos (DelliPizzi e cols., 1994; Heller e cols., 2000; Bürgelová e cols., 2002; Vallon e cols., 1998). Embora tal discrepância não possa ser explicada nos ratos normais, nos ratos tratados com GT, a mesma poderia, pelo menos parcialmente, estar relacionada ao estado hipotenso no qual os ratos com NTA se encontram.

Igualmente ao observado para a  $FENa^+$ , a Ang(1-7) não alterou a  $FEK^+$  em ratos normais. No entanto, o A779, por si só, aumentou significativamente tal fração sendo, este efeito abolido quando o mesmo foi associado à Ang(1-7) (grupo CTL Ang(1-7)+A779). Novamente, como observado para outros parâmetros, a  $FEK^+$  não foi afetada pela Ang(1-7) nos ratos tratados com GT. Para efeito de especulação, fatores como baixa reatividade vascular e/ou baixo número de receptores poderiam, até certo ponto,

explicar a ausência de efeito desse peptídeo sobre a excreção tanto de  $K^+$ , como de  $Na^+$ .

Diante dos diferentes dados obtidos em ratos normais e em ratos com NTA induzida pela GT, pode-se sugerir que o efeito da Ang(1-7), sobre a função renal, depende do estado basal, fisio e/ou patológico, dos ratos.

#### **5.4 Efeito da Gentamicina sobre os níveis renais de RNA mensageiro que codifica componentes do sistema renina-angiotensina**

Uma vez que a Ang(1-7) pouco interferiu na função renal de ratos com NTA, o RNA mensageiro que codifica alguns componentes do SRA foi investigado a fim de tentar desvendar como estariam, sob as condições por nós utilizadas, os níveis renais de alguns dos componentes que favorecem tanto o eixo vasodilatador, Mas-Ang(1-7), como o eixo vasoconstritor do SRA, Ang II-AT1.

A investigação dos níveis renais de RNA mensageiro que codifica alguns componentes do SRA, em ratos tratados com GT, revelou uma tendência de aumento níveis renais de RNA mensageiro que codifica o angiotensinogênio ( $p=0,0857$ ) sem, no entanto, alterar os níveis de RNA mensageiro que codifica a renina. Luft e Evan (1980) ao administrarem altas doses de gentamicina verificaram aumento da atividade plasmática de renina e alterações na barreira de filtração glomerular e sugeriram que estas alterações podem, pelo menos em parte, ser mediadas pelo SRA. Este sistema é formado por uma cascata de reações enzimáticas que se iniciam com a hidrólise do angiotensinogênio pela renina, levando à formação do decapeptídeo Ang I. Este sistema tem importante papel no controle da atividade cardiovascular, no equilíbrio hidroeletrolítico e na função celular. As enzimas conversoras de angiotensinas, ECA e ECA2 (Tipnis e cols., 2000; Donoghue e cols., 2000) participam dessa cascata promovendo a formação de peptídeos como a Ang II e Ang(1-7), a partir da formação da Ang I.

Análise do tecido renal mostrou que os níveis renais do RNA mensageiro para a enzima ECA estavam aumentados em ratos com NTA induzida pela GT. Esses dados

estão de acordo com aqueles obtidos por Ziai e cols. (2003) que verificaram aumento da atividade da ECA em rins, pulmão e soro de ratos que receberam GT (100 mg/Kg/dia), por 7 dias. A ECA é uma importante enzima da cascata do SRA, pois converte a Ang I em Ang II, um importante agente vasoconstritor. A ECA ainda, a partir da clivagem da Ang(1-7), pode formar metabólitos inativos (Ang(1-5), Ang(1-3)), podendo ser uma importante via de inativação da Ang(1-7) circulante e, possivelmente, da forma tecidual desse peptídeo (Yamada e cols., 1998). Sabe-se que quando a ECA é inibida, os níveis circulantes de Ang(1-7) podem aumentar de 25 a 50 vezes (Campbell e cols., 1995). Desse modo, inibidores de ECA tem sido usados para se avaliar a possível participação do SRA no desenvolvimento da NTA induzida por aminoglicosídeos. Acredita-se que o bloqueio do SRA pelos inibidores de ECA melhoram a função renal, seja pela inibição da formação de Ang II (Schor e cols., 1981; Luft e cols., 1982), seja pela inibição da hidrólise da bradicinina, que tem reconhecida ação vasodilatadora (Brosnihan e cols. 1996; Lima e cols. 1997). O fato é que, o uso de inibidores de ECA minimizam a queda do RFG e também do coeficiente de ultrafiltração (Schor e cols., 1981; Luft e cols., 1982; Morin e cols., 1989; Yamada, 1992; Hishida e cols., 1994). Estudos em ratos neonatais demonstraram que a inibição da ECA, por enalapril, induz profundas alterações na função e na hemodinâmica renal, caracterizadas por redução da osmolalidade urinária e considerável elevação do FU, da FENa<sup>+</sup> e da FEK<sup>+</sup> (Guron, 2005).

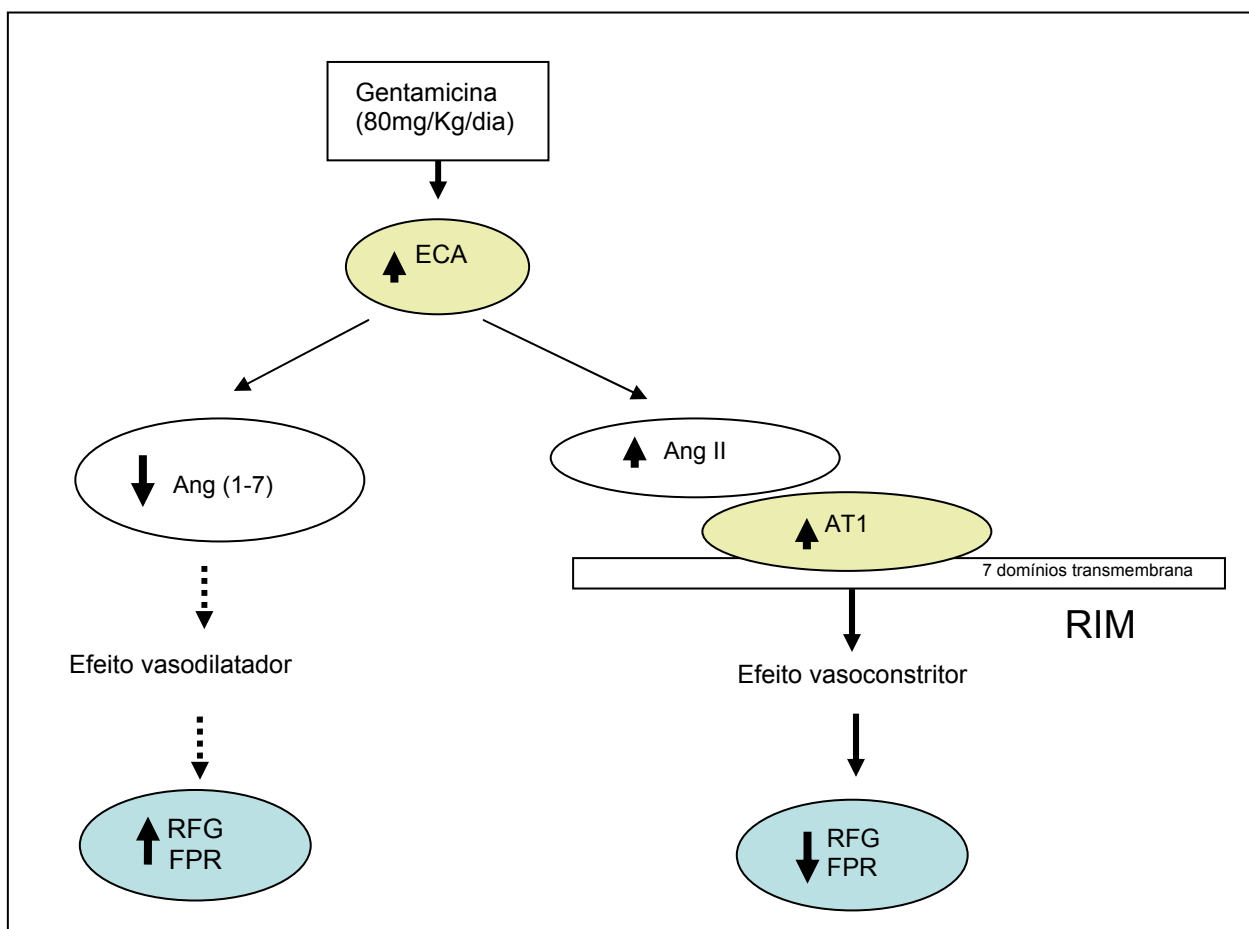
Com base nas vias de formação e de degradação do SRA, podemos inferir, a partir dos resultados obtidos, que o aumento dos níveis de RNA mensageiro no tecido renal que codifica a enzima ECA observado nos ratos com NTA induzida pela GT, pode levar a uma maior inativação da Ang(1-7) endógena, além de contribuir para o aumento na formação de Ang II. Isto pode produzir queda do RFG e do FPR (Wuerzner e cols., 2004; Zhang e cols. 1997) (Fig. 29).

Nossos resultados também mostraram que os níveis renais de RNA mensageiro que codificam o receptor de Ang(1-7), Mas, não foram significativamente diferentes nos ratos com NTA induzida pela GT, quando comparados com os ratos normais. Por outro lado, foi observado aumento dos níveis de RNA mensageiro que codifica para o receptor de Ang II, o AT1, em rins de ratos tratados com GT. O AT1 é um dos subtipos de receptores farmacologicamente definidos e clonados, caracterizados inicialmente por

Whitebread e cols. (1989) e Chiu e cols. (1989). Este receptor apresenta sete domínios transmembrana e está acoplado à proteína G (Touyz e Berry, 2002; Campbell, 2003) sendo amplamente distribuído em tecidos de vasos sanguíneos, coração, rim, glândula adrenal, fígado, órgãos reprodutores, trato urinário, cérebro e pulmão. Muitas ações fisiológicas importantes da Ang II são mediadas pelo receptor AT1. Entre estas, pode-se citar vasoconstrição, liberação de aldosterona, aumento da reabsorção tubular renal, aumento da secreção de vasopressina, aumento da frequência cardíaca e inibição da secreção de renina (Timmermans e cols., 1993). A Ang II também tem um efeito aditivo regulando a AQP2 através da potencialização do efeito da vasopressina pelo acúmulo de AMP cíclico (Lee e cols., 2007).

O aumento renal de ECA sugere aumento na formação de Ang II e, este dado associado ao aumento de receptor AT1, indica exacerbação da ação vasoconstritora da Ang II, o que pode ter sido determinante na redução do RFG e do FPR nos ratos que foram tratados apenas com GT. Ou seja, o eixo vasoconstritor ECA-AngII-AT1 estaria ativado neste modelo de NTA. Denton e cols. (2000) demonstraram que a infusão intrarrenal de doses crescentes de Ang II causou uma redução progressiva do FPR sem alterar o RFG, resultando em um aumento da FF. No entanto, o potente efeito da Ang II, sobre a microcirculação renal, causa considerável vasoconstrição das arteríolas aferente e eferente e redução do coeficiente de filtração glomerular ( $K_f$ ) (Arendshorst e cols., 1999, Blantz, 1980). Isto explicaria a redução do RFG observada em nossos experimentos. Estudos em rins isolados, usando uma técnica específica de isolamento de arteríolas, mostraram que a Ang II promove vasoconstrição tanto da arteríola aferente, quanto da eferente e que a arteríola eferente é mais sensível à ação da Ang II (Yuan e cols., 1990). No entanto, Navar e cols. (1996) afirmaram que a Ang II promove constrição das arteríolas aferente e eferente, porque ativa o influxo de  $Ca^{2+}$ , o qual é diferente nos dois tipos de vasos (Loutzenhiser e Loutzenhiser, 2000; Carmines e Navar, 1989). De modo que o efeito vasoconstritor da Ang II, sobre as arteríolas aferente e eferente, depende de condições fisiológicas e que os diferentes efeitos sobre parâmetros da função renal como FPR, RFG e FF dependem particularmente da região do néfron sobre a qual a Ang II age (Denton e cols., 2000).

Tomados juntos, esses resultados sugerem que em ratos com NTA induzida pela gentamicina, a via vasoconstritora está ativada em detrimento da via vasodilatadora. E, uma vez instalada a lesão renal, a Angiotensina (1-7) pouco age sobre os parâmetros avaliados.



**Figura 30** - Possíveis efeitos que o aumento dos níveis renais de RNAm que codifica para a enzima ECA e para o receptor AT1 poderia desencadear em ratos com NTA induzida por gentamicina. RFG- ritmo de filtração glomerular, ECA-enzima conversora de angiotensinas; AT1, receptor de Angiotensina II, FPR- fluxo plasmático renal.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 Modelo de Insuficiência Renal Induzida por Gentamicina

- A gentamicina, da forma por nós utilizada (80mg/Kg/dia, subcutaneamente, 2 vezes ao dia, 5 dias), promoveu necrose tubular aguda o que viabilizou o seu uso para induzir a insuficiência renal.

### 6.2 Angiotensina(1-7) e Insuficiência Renal Induzida por GT

- A Ang(1-7), na NTA induzida pela GT, nas doses e condições utilizadas nesse estudo, apresentou apenas efeito vascular renal (reduziu o FPR) sem, no entanto, afetar grandemente a função tubular. O efeito vascular, provavelmente, foi devido à ativação de receptores Mas presentes nas arteríolas aferentes renais.

### 6.3 RNA Mensageiro Renal Para Componentes do SRA em ratos com NTA Induzida por GT

- Os ratos que desenvolveram lesão renal pelo uso da GT apresentaram aumento na expressão renal de RNA mensageiro que codifica a ECA e receptores AT1, sem alterar a expressão renal de RNA mensageiro que codifica a ECA2 e receptores Mas. Isto sugere a ativação do eixo vasoconstritor do SRA, ECA-Ang II-AT1 ao invés do eixo vasodilatador, ECA2-Ang(1-7)-Mas.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI BH. Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research. *Food Chem Toxicol.* 41:1447–1452, 2003.

ALI BH, AL-SALAM S, AL-HUSSEINI I, NEMMAR A. Comparative protective effect of N-acetyl cysteine and tetramethylpyrazine in rats with gentamicin nephrotoxicity. *J Appl Toxicol.* 29(4):302-7, 2009.

AL-MAJED AA, MOSTAFA AM, AL-RIKABI AC, AL-SHABANAH OA. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 46:445–51, 2002.

APPEL GB, SIEGEL NJ, APPEL AS, HAYSLETT JP. Studies on the mechanism of non-oliguric experimental acute renal failure. *Yale J Biol Med.* 54(4):273-81, 1981.

ARENDHORST WJ, BRANNSTROM K, RUAN X. Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *J Am Soc Nephrol.* 10, Suppl 11: S149–S161, 1999.

ASSAEL BM, CHIABRANDO C, GAGLIARDI L, NOSEDA A, BAMONTE E, SALMONA M. Prostaglandins and aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicol. App. Pharmac.* 78, 386-394, 1985.

BAE EH; OH YW; PARK JW; MA SK; LEE JU; KIM SH; KIM SW. Gentamicin decreases guanylyl cyclase activity in rat glomerulus. *Kidney and Blood Pressure Research.* 30:81-87, 2007.

BANDAY AA; FAROOQ N; PRIYAMVADA S; YUSIFU ANK; KHAN F. Time dependet effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sciences* 82, 450-459, 2008.

BARACHO NCV, SIMÕES-E-SILVA AC, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. *Braz J Med Biol Res*.31: 1221-1227, 1998.

BLANTZ, RC: The glomerulus, passive filter or regulatory organ? *Klin. Wochenschr*. 58: 957-964, 1980.

BLEDSE G, CRICKMAN S, MAO J, XIA CF, MURAKAMI H, CHAO L, CHAO J. Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006.

BRENNER BM, BRADY HR, LIEBERTHAL W. Acute renal failure: Pathogenesis of renal disease. In: Brenner BM. *The Kidney*. Philadelphia, Penn: WB Saunders Company, 1201-62, 2000.

BROSNIHAN KB, LI P, FERRARIO CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 27, 523–528, 1996.

BÜRGELOVÁ M, KRAMER HJ, TEPLAN V, VELICKOVÁ G, VÍTKO S, HELLER J, MALÝ J, CERVENKA L. Intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) modulates renal functional responses to exogenous angiotensin II in the rat. *Kidney Blood Press Res*. 25(4):202-10, 2002.

CAMPBELL DJ, DUNCAN AM, KLADIS A, HARRAP SB. Converting enzyme inhibition and its withdrawal in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 26(3):426-36, 1995.

CAMPBELL DJ. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol*. 35(6):784-91, 2003.

CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. DIZ DI, SANTOS RAS, KHOSLA MC, BROSNIHAN KB. FERRARIO CM: Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol* 257: H324-H329. 1989.

CAN C, SEN S, BOZTOK N, TUGLULAR I. Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *Eur J Pharmacol.* 3;390(3):327-34, 2000.

CARMINES, PK; NAVAR, LG. Disparate effects of Ca channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to ANG II. *Renal Physiology*, 256(6); 1015-F1020, 1989.

CASTRO CH, SANTOS RA, FERREIRA AJ, BADER M, ALENINA N, ALMEIDA AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci.* 80(3): 264-8, 2006.

CHAPPELL MC; DIZ DI; YUNIS C; FERRARIO CM. Differential actions of Ang- (1-7) in the kidney. *Kidney international* 54, suppl. 68, pp S3-S6, 1998.

CHAPPELL MC, MODRALL JG, DIZ DI, FERRARIO CM. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. In: Suzuki H, Saruta T, eds. *Kidney and Blood Pressure Regulation*. Basel, Switzerland: Karger; 77– 89, 2004.

CHEN JL, ZHOU T, CHEN WX, ZHU JS, CHEN NW, ZHANG MJ, WU YL. Effect of tetramethylpyrazine on P-selectin and hepatic/renal ischemia and reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol.* 9(7):1563-6, 2003.

CHIU AT, HERBLIN WF, MCCALL DE, ARDECKY RJ, CARINI DJ, DUNCIA JV, PEASE LJ, WONG PC, WEXLER RR, JOHNSON AL. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 30;165(1):196-203, 1989.

COATES D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol.* 35(6):769-73, 2003.

COJOCEL C, DOCIUS N, MAITA K, SMITH JH, HOOK JB. Renal ultrastructural and biochemical injuries induced by aminoglycosides. *Environ Health Perspect.* 57:293-9, 1984. 77

CONGER J. Prophylaxis and treatment of acute renal failure by vasoactive agents: the fact and the myths. *Kidney Int Suppl.* 64:S23-6. 1998.

CRONIN RE., THOMPSON JR., Role of potassium in the pathogenesis of acute renal failure. *Miner. Electrolyte Metab.*, 17, 100—105, 1991.

CUZZOCREA S, MAZZON E, DUGO L, SERRAINO I, DI PAOLA R, BRITTI D, DE SARRO A, PIERPAOLI S, CAPUTI A, MASINI E, SALVEMINI D. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol.* 450(1):67-76, 2002.

DEAN RT, HUNT JV, GRANT AJ, YAMAMOTO Y, NIKI, E. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 161– 168, 1991.

DE-BARROS-E-SILVA ML, VARANDA WA, LACHAT JJ, ALVES-DA-SILVA CG, COIMBRA TM. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. *Braz J Med Biol Res.* 25(4):409-17, 1992.

DELLIPIZZI AM, HILCHEY SD, BELL-QUILLEY CP. Natriuretic action of angiotensin (1-7). *Br J Pharmacol.* 111(1):1-3, 1994.

DENTON, KM; ANDERSON WP.; SINNI AH, R. Effects of angiotensin II on regional afferent and efferent arteriole dimensions and the glomerular pole. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R629–R638, 2000.

DE SOUZA AM, LOPES AG, PIZZINO CP, FOSSARI RN, MIGUEL NC, CARDOZO FP, ABI-ABIB R, FERNANDES MS, SANTOS DP, CARUSO-NEVES C. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na<sup>+</sup>-ATPase activity through AT<sub>2</sub> receptor. *Regul Pept.* 15;120(1-3):167-75, 2004.

DHANARAJAN, R, ABRAHAM, P, ISAAC, B. Protective Effect of Ebselen, a Selenoorganic Drug, against Gentamicin-Induced Renal Damage in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 99, 267–272, 2006.

DILAURO, M.; BURNS, KD. Angiotensin-(1-7) and Its Effects in the Kidney. *TheScientificWorldJournal.* 9, 522–535, 2009.

DONOGHUE M, HSIEH F, BARONAS E, GOBOUT, K; GOSSELIN, M, STAGLIANO N, DONOVAN M; WOOLF B; ROBINSON K, JEYASEELAN R, BREIBART RE. ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-(1-9). *Circ Res.*87:E1-E9, 2000.

DOSTAL DE, BAKER KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res.* 1;85(7):643-50. Review, 1999.

EKOR M, FAROMBI EO, EMEROLE GO. Modulation of gentamicin-induced renal dysfunction and injury by the phenolic extract of soybean (*Glycine max*). *Fundam Clin Pharmacol.* 20(3):263-71, 2006.

EL MOUEDDEN M, LAURENT G, MINGEOT-LECLERCQ MP. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:665–675, 2000.

ESQUERRO E, RIVAS-CABÁNERO L, LÓPEZ-NOVOA JM. Glomerular angiotensin II receptors in gentamicin-induced renal failure in the rats. *Ren Fail.* 17(6): 689-94,1995.

FANTONE JC, WARD PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol.* 107(3):395-418, 1982.

FAROMBI EO, EKOR M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 44 1443–1448, 2006.

FERNÁNDEZ-REPOLLET E, FANTAUZZI R. Effects of gentamicin on glomerular renin release. *Ren Fail.* 16(1):71-89, 1994.

FERREIRA AJ, JACOBY BA, ARAUJO CA, MACEDO FA, SILVA GA, ALMEIDA AP, CALIARI MV, SANTOS RA. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(2): H1113-9, 2007.

FUHR J, KACZMARCZYK J, KRÜTTGEN CD. A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics. *Klin Wochenschr.* 33(29-30): 729-30, 1955.

FUKUDA Y, MALMBORG AS, APERIA A. Gentamicin inhibition of Na-K-ATPase in rat kidney cells. *Acta Physiol. Scand.* 141, 27-34, 1991.

GARCIA NH, GARVIN JL. Angiotensin 1-7 has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. *J Am Soc Nephrol.* 5(4):1133-8, 1994.

GHAZNAVI R, FAGHIHI M, KADKHODAE M, SHAMS S, KHASTAR H. Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys. *J Nephrol.* 18(5):548-52, 2005.

GHAZNAVI R, KADKHODAE M. Comparative effects of selective and non-selective nitric oxide synthase inhibition in gentamicin-induced rat nephrotoxicity. *Arch Toxicol.* 81:453–457, 2007.

GONZALES S, NORIEGA GO, TOMARO ML, PEÑA C. Angiotensin-(1-7) stimulates oxidative stress in rat kidney. *Regul Pept.* 15;106(1-3):67-70, 2002.

GREENE LJ, SPADARO AC, MARTINS AR, PERUSSI DE JESUS WD, CAMARGO AC. Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension.* 4(2):178-84, 1982.

GURLEY SB, ALLRED A, LE TH, GRIFFITHS R, MAO L, PHILIP N, HAYSTEAD TA, DONOGHUE M, BEITBART RE, ACTON SL, ROCKMAN HA, COFFMAN TM. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest.* 116:2218 –2225, 2006.

80

GURON G. Renal haemodynamics and function in weanling rats treated with enalapril from birth. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32(10):865-70, 2005.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280(1):1-8. Review, 1990.

HANDA RK, FERRARIO CM, STRANDHOY JW. Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol.* ;270(1 Pt 2):F141-7, 1996.

HANDA RK. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptors. *J Am Soc Nephrol.* 11(8):1377-86, 2000.

HARRIS RC, MARTINEZ-MALDONADO M. Angiotensin II-mediated renal injury. *Miner Electrolyte Metab.*21(4-5): 328-35, 1995.

HEITSCH, H., BROVKOVYCH, S., MALINSKI, T., AND WIEMER, G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension.* 37, 72–76, 2001.

HELLER J, KRAMER HJ, MALÝ J, CERVENKA L, HORÁČEK V. Effect of intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) in the dog. *Kidney Blood Press Res.* 23(2):89-94, 2000.

HILCHEY, SD.; BELL-QUILLEY, CP. Association Between the Natriuretic Action of Angiotensin-(1-7) and Selective Stimulation of Renal Prostaglandin I<sub>2</sub> Release. *Hypertension.* 25:1238-1244, 1995.

HISHIDA A, NAKAJIMA T, YAMADA M, KATO A, HONDA N. Roles of hemodynamic and tubular factors in gentamicin-mediated nephropathy. *Ren Fail.*;16(1):109-16, 1994.

HOFMEISTER R, BHARGAVA AS, GUNZEL P. Value of enzyme determination in urine for the diagnosis of nephrotoxicity in rats. *Clinica Chimica Acta* 160: 163-167, 1986.

INGELFINGER, JR. Angiotensin-converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 18:79–84, 2009. 81

JERKIĆ M, MILORADOVIĆ Z, JOVOVIĆ D, MIHAILOVIĆ-STANOJEVIĆ N, ELENA JV, NASTIĆ-MIRIĆ D, GRUJIĆ-ADANJA G, RODRÍGUEZ-BARBERO A, MARKOVIĆ-LIPKOVSKI J, VOJVODIĆ SB, MANERO MV, PRIETO MP, LÓPEZ-NOVOA JM. Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 19(1):83-94, 2004.

JOYNER J, NEVES LAA, STOVALL K, FERRARIO CM, BROSNIHAN KB. Angiotensin-(1-7) serves as an aquaretic by increasing water intake and diuresis in association with downregulation of aquaporin-1 during pregnancy in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294(3):R1073-80, 2008a.

JOYNER J, NEVES LAA, FERRARIO CM, BROSNIHAN KB. Administration of D-Alanine-[Ang-(1-7)] (A-779) Prior to Pregnancy in Sprague Dawley Rats Produces Antidiuresis in Late Gestation. *Am Soc Hypertens*. 2(6): 425–430, 2008b.

KADKHODAE M, KHASTAR H, FAGHIHI M, GHAZNAVI R, ZAHMATKESH M. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol*. 90(4):571-6, 2005.

KADKHODAE M, KHASTAR H, ARAB H, GHAZNAVI R, ZAHMATKESH M, MAHDAVIMAZDEH M. Antioxidant Vitamins Preserve Superoxide Dismutase Activities in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity. *Transplantation Proceedings*. 39:864-865, 2007.

KLAHR S. The role of L-arginine in hypertension and nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 7: 547-550, 1998.

KLOTMAN PE, YARGER WE. Reduction of renal blood flow and proximal bicarbonate reabsorption in rats by gentamicin. *Kidney Int*. 24(5):638-43, 1983.

KOSTENIS E, MILLIGAN G, CHRISTOPOULOS A, SANCHEZ-FERRER CF, HERINGER-WALTHER S, SEXTON PM, GEMBARDT F, KELLETT E, MARTINI L, VANDERHEYDEN P, SCHULTHEISS HP, WALTHER T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 111(14):1806-13, 2005.

82

KOPPLE, JD, DING, H, LETOHA A, IVANYI, B, QING, DP, DUX, L, WANG, H, SONKODI, S. L-carnitine ameliorates gentamicin-induced renal injury in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 17: 2122–2131, 2002.

KUCHAREWICZ I, PAWLAK R, MATYS T, PAWLAK D, BUCZKO W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 40 (5):774-9, 2002.



LAURENT G, CARLIER MB, ROLLAN B., VAN HOOFF E, TULBENS P. Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3861-3870, 1982.

LEE JU, YOO KS, KANG DG, KIM SW, CHOI KC. Gentamicin decreases the abundance of Aquaporin Channels in rat kidney. *Jpn J Pharmacol.* 85, 391-398, 2001.

LEE YJ, SONG IK, JANG KJ, NIELSEN J, FRØKIAER J, NIELSEN S, KWON TH. Increased AQP2 targeting in primary cultured IMCD cells in response to angiotensin II through AT1 receptor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(1):F340-50, 2007.

LI, N, ZIMPELMANN J, CHENG K, WILKINS JA, BURNS KD. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288, F353–362, 2005.

LIMA CV, PAULA RD, RESENDE FL, KHOSLA MC, SANTOS RA. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1–7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 30:542–548, 1997.

LOUTZENHISER K, LOUTZENHISER R. Angiotensin II–Induced Ca<sup>2+</sup> Influx in Renal Afferent and Efferent Arterioles. Differing Roles of Voltage-Gated and Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Circ Res.* 87:551-557, 2000.

LUFT FC, EVAN, A. R Glomerular filtration barrier in aminoglycoside-induced nephrotoxic acute renal failure. *Renal Physiol.* (Basel) 3: 265-271, 1980.

83

LUFT FC, ARONOFF GR, EVAN AP, CONNORS BA, WEINBERGER MH, KLEIT SA. The renin-angiotensin system in aminoglycoside-induced acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther.* 220(2):433-9, 1982.

MAGALDI AJ, CESAR KR, DE ARAÚJO M, SIMÕES E SILVA AC, SANTOS RA. Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors. *Pflugers Arch.* 447(2):223-30, 2003.

MATSUSAKA T, ICHIKAWA I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol.* 59:395-412. Review, 1997.

MAZZON AE, BRITTI BD, DE SARRO AC, CAPUTI AP, CUZZOCREA S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *European Journal of Pharmacology*, 424, 75–83, 2001.

MORIN JP, THOMAS N, TOUTAIN H, BORGHI H, FILLASTRE JP. Treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor may increase the nephrotoxicity of gentamicin in rats. *Pathol Biol (Paris)*. 37(5 Pt 2):652-6, 1989.

NAKAJIMA T, HISHIDA A, KATO A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol.* 266(3 Pt 2):F425-31, 1994.

NAKANO S, OGAWA N. Chronotoxicity of gentamicin in mice. *IRCS Med Sci.* 10: 592-3, 1982.

NAVAR LG, INSCHO EW, MAJID DSA, IMIG JD, HARRISON-BERNARD LM, MITCHELL KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev.*;76:425–536, 1996.

NISSENSON AR. Acute renal failure: definition and pathogenesis. *Kidney Int Suppl.* 66:S7 10, 1998.

84

OLIVEIRA VCR; TEJOS, CR; HOSAKA EM; ANDRADE, SC; ARAÚJO, M; VATTIMO, MFF. Influence of the dose regimen on the gentamicin nephrotoxicity in rats. *Rev Esc Enf USP*, 35 (2) p. 200-4, 2001.

OLIVEIRA, JFP; CIPULLO, JP; BURDMANN, EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Braz J Cardiovasc Surg*; 21(4): 444-452, 2006.

ORTEGA A, RÁMILA D, IZQUIERDO A, GONZÁLEZ L, BARAT A, GAZAPO R, BOSCH RJ, ESBRI P. Role of the renin-angiotensin system on the parathyroid hormone-related protein

overexpression induced by nephrotoxic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol.* 16(4): 939-49, 2005.

ORTIZ MC, SANABRIA E, MANRIQUEZ MC, ROMERO JC, JUNCOS LA. Role of endothelin and isoprostanes in slow pressor responses to angiotensin II. *Hypertension.* 37(2 Part 2):505-10, 2001.

ODUIT GY, CRACKOWER MA, BACKX PH, PENNINGER JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 13(3):93-101, 2003.

PAPANIKOLAOU N, PEROS G, MORPHAKE P, GKIKAS G, MARAGHIANNE D, TSIPAS G, KOSTOPOULOS K, ARAMBATZE C, GKIKAS EL, BARIETY J. Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 45(2):131-6, 1992.

PARK JW, BAE EH, KIM IJ, MA SK, CHOI C, LEE JU, KIM SW. Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin-induced kidney injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* (nov) 2009.

PARSONS PP, GARLAND HO, HARPUR ES. Localization of the nephron site of gentamicin-induced hypercalciuria in the rat: a micropuncture study. *Br J Pharmacol.* 130(2):441-9, 2000.

PINHEIRO SV, FERREIRA AJ, KITTEN GT, DA SILVEIRA KD, DA SILVA DA, SANTOS<sup>85</sup> SH, GAVA E, CASTRO CH, MAGALHÃES JA, DA MOTA RK, BOTELHO-SANTOS GA, BADER M, ALENINA N, SANTOS RA, SIMOES E SILVA AC. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int.* 75(11):1184-93, 2009.

POLAT A, PARLAKPINAR H, TASDEMIR S. COLAK C, VARDI N, UCAR M, EMRE, MH, ACET, A. Protective role of Aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta histochemica.* 108 ,365—371, 2006.

RAJENDRAN S, CHIRKOV YY, CAMPBELL DJ, HOROWITZ JD. Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol* 46(4):459-463, 2005.

REITER RJ, TAN DX, SAINZ RM, MAYO JC, LOPEZ-BURILLO S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* ;54:1299–321, 2002.

RICE GI, THOMAS DA, GRANT PJ, TURNER AJ, HOOPER NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* 383, 45–51, 2004.

RIVAS-CABAÑERO L, MONTERO A, LÓPEZ-NOVOA JM. Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. *Eur J Pharmacol.* 3; 270(1):119-21, 1994.

RIVAS-CABAÑERO L, RODRIGUEZ-BARBERO A, ARÉVALO M, LÓPEZ-NOVOA JM. Effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Nephron.* 71(2):203-7, 1995.

ROGERS RA, HANNA AY, RIVIERE JE. Dose response studies of gentamicin nephrotoxicity in rats with experimental renal dysfunction. III. Effects of dosage adjustment method. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 57(3): 01-11, 1987.

SANTOS RA, BARACHO NCV. Angiotensin-(1–7) is a potent antidiuretic peptide in rats 86  
*Braz. J. Med. Biol. Res.* 25: 651–654, 1992.

SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, BARACHO NC, FONTES MA, SILVA LC, NEVES LA, OLIVEIRA DR, CALIGIORNE SM, RODRIGUES AR, GROPEL JUNIOR, C, CARVALHO WS, SIMOES E SILVA AC, KHOSLA MC. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res. Bull.* 35, 293–298, 1994.

SANTOS RA, SIMÕES E SILVA AC, MAGALDI AJ, KHOSLA MC, CESAR KR, PASSAGLIO KT, BARACHO NC. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. 27(4):875-84, 1996.

SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, ANDRADE SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, 91: 45-62, 2000.

SANTOS RA, SIMOES E SILVA AC, MARIC C, SILVA DM, MACHADO RP, DE BUHR I, HERINGER-WALTHER S, PINHEIRO SV, LOPES MT, BADER M, MENDES EP, LEMOS VS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, SCHULTHEISS HP, SPETH R, WALTHER T. Angiotensin-(1-7) is na endogenous ligand for the Gprotein-coupled receptor Mas. *PNAS*, 100(14): 8258-8263, 2003.

SANTOS RA, FERREIRA AJ. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev*. 24(3-4): 239-46, 2006.

SANTOS RA, CASTRO CH, GAVA E, PINHEIRO SV, ALMEIDA AP, PAULA RD, CRUZ JS, RAMOS AS, ROSA KT, IRIGOYEN MC, BADER M, ALENINA N, KITTEN GT, FERREIRA, A.J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 47, 996–1002, 2006.

SCHIAVONE MT, SANTOS RA, BROSNIHAN KB, KHOSLA MC, FERRARIO CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(11):4095-8, 1988.

SCHLONDORFF DO. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int* 74: 860-866, 2008. 87

SCHOR N, ICHIKAWA I, RENNKE HG, TROY JL, BRENNER BM. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int*.19(2):288-96, 1981.

SEN S, BOZTOK N, TUGLULAR I. Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *Eur J Pharmacol*. 390(3):327-34, 2000.

SEÇILMIŞ MA, KARATAŞ Y, YORULMAZ O, BUYUKAFŞAR K, SINGIRIK E, DORAN F, INAL TC, DIKMEN A. Protective effect of L-arginine intake on the impaired renal vascular responses in the gentamicin-treated rats. *Nephron Physiol.* 100(2):p13-20, 2005.

SILAN C, UZUN O, COMUNOĞLU NU, GOKÇEN S, BEDIRHAN S, CENGİZ M. Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats Ameliorated and Healing Effects of Resveratrol. *Biol. Pharm. Bull.* 30(1) 79—83, 2007.

SIMÕES-E-SILVA, AC; BARACHO, NCV; PASSAGLIO, KT; SANTOS, RAS. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 30: 503-513, 1997.

SIMÕES E SILVA AC, BELLO APC, BARACHO NCV, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regul Pept* 74: 177–184, 1998.

SINGH P, SRIVASTAVA MM, KHEMANI LD. Renoprotective effects of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees in rats. *Ups J Med Sci.* 114(3):136-9, 2009.

SMITH HW, FINKELSTEIN N, ALIMINOSA L, CRAWFORD B, GRABER M. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *J. Clin. Invest.* 24: 388-404, 1945.

SOHN EJ, KANG DG; LEE HS. Protective Effects of Glycyrrhizin on Gentamicin-Induced Acute Renal Failure in Rats. *Pharmacology & Toxicology.* 93, 116–122, 2003.

SOLIMAN KM, ABDUL-HAMID M, OTHMAN AI. Effect of carnosine on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Med Sci Monit*, 13(3): BR73-83, 2007.

88

STOYKOVA S, CASANOVA P, LUCCIONI F, LANZA M. 1-year monitoring of the course of chronic renal insufficiency induced by subtotal nephrectomy in rats. Pharmacokinetic value]. *Pathol Biol (Paris).* 31(7):569-76, 1983.

SZASZ G. Reaction-rate method for gamma-glutamyltransferase activity in serum. *Clin Chem.* 22(12):2051-5, 1976.

TIMMERMANS PB, WONG PC, CHIU AT, HERBLIN WF, BENFIELD P, CARINI DJ, LEE RJ, WEXLER R, SAYE J, SMITH R. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*, 45: 205–251, 1993.

TIPNIS SR, HOOPER NM, HYDE R, KARRAN E, CHRISTIE G, TURNER AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, 33238–33243, 2000.

THURAU K, BOYLAN JW. Acute renal success. The unexpected logic oliguria in acute renal failure. *Am. J. Med.* 61: 308-315, 1976.

TOUYZ RM, BERRY C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res.*;35(9):1001-15, 2002.

UEDA S, MASUMORI-MAEMOTO S, ASHINO K, NAGAHARA T, GOTOH E, UMEMURA S, ISHII M. Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. *Hypertension.* 35(4):998-1001, 2000.

VALLON V, HEYNE N, RICHTER K, KHOSLA MC, FECHTER K. [7-D-ALA]-angiotensin 1-7 blocks renal actions of angiotensin 1-7 in the anesthetized rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 32(1):164-7, 1998.

VAN'T VEER LJ, VAN DER FELTZ MJM, VAN DER BERG-BAKKER CAM, CHENG RPM, VAN OORSCHOT DAJ, KIEVITS T, SCHRIER PI. Activation of the Mas protooncogene involves coupling to human alphaoid sequences. *Oncogene*, 8: 2673 – 2681, 1993. 89

VARDI N, PARLAKPINAR H, OZTURK F, ACET A. Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 19, 173–177, 2005.

VILLAR A, PEDERSEN RA. Parental imprinting of the Mas protooncogene in mouse. *Nature Genetics*, 8: 373 – 379, 1994.

VOLPINI RA, COSTA RS, DA SILVA CG, COIMBRA TM. Inhibition of Nuclear Factor-kappaB Activation Attenuates Tubulointerstitial Nephritis Induced by Gentamicin. *Nephron Physiol*. 98 (4): p97–p106, 2004.

WATSON A, COFFEY L, KEOGH B, MCCANN SR. Severe hypomagnesaemia and hypocalcaemia following gentamicin therapy. *Ir Med J*. 76(9):381-3, 1983.

WATSON AJ, GIMENEZ LF, KLASSEN DK, STOUT RL, WHELTON A. Calcium channel blockade in experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J Clin Pharmacol*. 27(8):625-7, 1987.

WEISS SJ, LOBUGLIO AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*. 47(1):5-18, 1982.

WHITEBREAD S, MELE M, KAMBER B, DE GASPARO M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 30;163(1):284-91, 1989.

WUERZNER G, CHICLE'RO A, MAILLARD M, NUSSBERGER J, BRUNNER HR, BURNIER M. Angiotensin II receptor blockade prevents acute renal sodium retention induced by low levels of orthostatic stress. *Kidney International*. 65, 238–244, 2004.

YAMADA M, HISHIDA A, HONDA N. Effects of desoxycorticosterone acetate (DOCA) plus saline drinking on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Ren Fail*. 14(4):499-505, 1992. 90

YAMADA K, IYER SN, CHAPPELL MC, GANTEN D, FERRARIO CM. Converting enzyme determines the plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 98:496 – 502, 1998.

YOUNG D, WAITCHES G, BIRCHMEIER C, FASANO O, WIGLER M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 45: 711 – 719, 1986.



YUAN BH, ROBINETTE JB, CONGER JD. Effect of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol.* 258(3 Pt 2):F741-50, 1990.

ZHANG XZ, QIU C, BAYLIS C. Sensitivity of the segmental renal arterioles to angiotensin II in the aging rat. *Mech Ageing Dev.* 97(2):183-92, 1997.

ZHOU T, LI X, WU P, ZHANG D, ZHANG M, CHEN N, DONG D. Effect of anti-P-selectin monoclonal antibody on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Chin Med J (Engl).* 113(9):790-3., 2000.

ZIAI SA, SALEHIAN P, MAHMOUDIAN M. Study of serum and tissues angiotensin converting enzyme (ACE) activity in rat with gentamicin induced renal toxicity. *Ren Fail.* 25(6):923-33, 2003.