

PRISCILLA MARYS COSTA DOS SANTOS

**EFEITOS DA SINVASTATINA E DO SILDENAFIL NA
ATIVIDADE DO NHE3 EM TÚBULOS PROXIMAIS
DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

PRISCILLA MARYS COSTA DOS SANTOS

**Efeitos da Sinvastatina e do Sildenafil na Atividade
do NHE3 em Túbulos Proximais
de Ratos Wistar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana
Orientador: Prof. Dr. Gerhard Malnic

Versão Original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

dos Santos, Priscilla Marys Costa
Efeitos da Sinvastatina e do Sildenafil na
Atividade do NHE3 em Túbulos Proximais de Ratos
Wistar / Priscilla Marys Costa dos Santos;
orientador Gerhard Malnic. -- São Paulo, 2017.
106 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Trocador Sódio Hidrogênio Isoforma 3. 2.
Sildenafil. 3. Sinvastatina. 4. Pravastatina. I.
Malnic, Gerhard , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscilla Marys Costa dos Santos

Título da Tese: Efeitos da Sinvastatina e do Sildenafil na Atividade do NHE3 em Túbulo Proximal de Ratos Wistar

Orientador(a): Prof. Dr. Gerhard Malnic

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Decl. CEUA.053/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 003/12/CEUA, datado de 14.02.12 e por solicitação do Prof. Dr. **Gerhard Malnic**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Priscilla Marys Costa dos Santos** ao Projeto de Pesquisa "*Efeitos de Sildenafil e do Sildenafil na atividade do NHE3*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 23 de maio de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

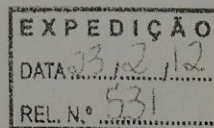
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **003** nas fls. **124** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Gerhard Malnic**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da Simvastatina e do Sildenafil na atividade do NHL3*" do qual participam o(s) aluno(s) **Thaissa Dantas Pessoa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **14.02.2012**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP



Aos meus pais, Rubens e Rose, cujo carinho, orientação e dedicação me levaram a desenvolver a curiosidade científica.

Ao meu marido, Luiz Fernando, o apoio incondicional durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gerhard Malnic a orientação e exemplo de dedicação, humanidade e ética dentro da prática científica.

Aos colaboradores – em especial a Dr^a Regiane Castelo-Branco – e a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram.

Ao corpo docente do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo por partilharem seus conhecimentos e contribuírem para a minha formação.

Aos colegas de laboratório a companhia e apoio durante a realização deste projeto. Um agradecimento especial à Michelle pela amizade.

Às amigas Adriana, Andressa, Claudia, Fabíola, Gardênia, Glaucia, Juliana, Paula e Tássia o apoio, atenção e compreensão.

À minha irmã Pâmela, ao meu irmão Rubens e aos meus pais Rubens e Rose o amor e o carinho dedicados a mim durante todos os dias de minha vida.

Ao meu esposo Luiz Fernando todo o amor, apoio e paciência a mim dedicados.

A Deus pela oportunidade de vivenciar todos os desafios que me foram impostos durante esta fase de minha formação acadêmica. Sem eles eu não teria saído do lugar.

Agradeço à CAPES e ao CNPq o suporte prestado durante o desenvolvimento deste projeto.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) o suporte e auxílio financeiro prestado.

AGRADECIMENTOS À FAPESP

Um agradecimento especial à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) o auxílio financeiro prestado ao projeto com processo FAPESP nº 2013/16751-5 (o projeto de doutorado que deu origem a esta tese).

Agradeço em especial os equipamentos comprados para o laboratório de Biofísica Renal. Os mesmos foram de fundamental importância para otimização dos nossos resultados.

Agradeço também os auxílios prestados por parte da FAPESP com relação aos congressos nos quais pude apresentar meus resultados pertinentes ao doutorado e trocar conhecimentos.

“Os pescadores sabem que o mar é perigoso e que a tempestade é terrível, mas eles nunca julgaram esses perigos como razão suficiente para permanecer em terra”.
Vincent Van Gogh

RESUMO

Dos Santos PMC. Efeitos da Sinvastatina e do Sildenafil na Atividade do NHE3 em Túbulos Proximais de Ratos Wistar. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Por meio da técnica de microperfusão estacionária *in vivo*, túbulos proximais (TP) de ratos Wistar foram perfundidos com solução controle (CTRL) contendo ou não Sinvastatina (Sinva) 100 μM ou Sil 10 μM para determinar a reabsorção de bicarbonato (JHCO_3^-). A perfusão de Sildenafil (Sil) diminuiu o JHCO_3^- em 20%, enquanto que Sinva incrementou em 19,31% o JHCO_3^- comparado com o CTRL. Já a Pravastatina (Prav) 100 μM diminuiu em 15% o JHCO_3^- . Para testar se os efeitos foram dependentes de NHE3, PTs foram perfundidos com CTRL, Sil, Sinva ou Prav mais S3226 5 μM S3226, um inibidor específico de NHE3. O JHCO_3^- remanescente (insensível à S3226) não foi diferente entre os grupos, mostrando que NHE3 foi modulado por Sil e Sinva. Já o efeito inibitório da Prav ocorre não apenas via NHE3 mas também via H^+ ATPase. Para determinar se a via Rho está envolvida nestes efeitos, os PTs foram perfundidos com Y-27632 10 μM , inibidor de Rho GTPase. A perfusão com Y-27632 reverteu o efeito inibitório promovido pelo Sil, demonstrando que o efeito inibitório deste fármaco sobre a atividade do NHE3 ocorre via Rho. Já os efeitos promovidos pela Sinvastatina e pela Pravastatina ocorrem de modo independente da via Rho. Além disso, o efeito inibitório de Sil foi completamente abolido pelo inibidor de PKG dependente de GMPc KT5823 1 μM . Para confirmar estes resultados, animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas e tratados via oral com 7 mg/Kg/dia de Sinva e 20 mg/Kg/dia de Sil. Sil diminuiu a CE Na^+ , indicando que outros mecanismos de transporte podem estar envolvidos em alterações no manejo de Na^+ pelos rins promovidas por Sil. Já a infusão de Prav em ratos Wistar pela jugular durante 30 minutos promoveu aumento da CE Na^+ , sugerindo que o fármaco age inibindo NHE3.

Palavras-chave: Sildenafil, Sinvastatina, Pravastatina, NHE3, AQ2, Rho, GMPc .

ABSTRACT

Dos Santos PMC. Effects of Simvastatin and Sildenafil on NHE3 Activity in Proximal Tubes of Wistar Rats. PhD Thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

By means of stationary microperfusion, PT of Wistar rats were perfused with a control solution (CTRL) with or without 100 μM of Simvastatin (Simva) or 10 μM Sildenafil (Sil) to determine bicarbonate reabsorption (JHCO_3^-). Perfusion of Sildenafil (Sil) decreased JHCO_3^- by 20% and perfusion of Simvastatin (Simva) increased JHCO_3^- by 19,31% compared to CTRL. Pravastatin (Prav) decreased JHCO_3^- by 15%. To test if these effects were NHE3-dependent, PTs were perfused with CTRL, Sil, Simva or Prav plus 5 μM S3226, a specific NHE3 inhibitor. The reminiscent S3226-insensitive JHCO_3^- was not different among groups, showing that NHE3 was modulated by Sil or Simva. To determine if Rho was involved in these effects, the PTs were perfused with the Rho GTPase inhibitor Y-27632 (10 μM). Perfusion with Y-27632 reversed the inhibitory effect promoted by Sil, demonstrating that the inhibitory effect of the drug on NHE3 activity occurs via Rho. The effects caused by Simva and Prav occur independently of the Rho pathway. Furthermore, the inhibitory effect of Sil was completely abolished by either the protein kinase G (PKG) inhibitor dependent of cGMP KT5823 1 μM . To confirm our results the animals were kept for 24 hours in metabolic cages and treated orally with 7 mg/kg Sim or 20 mg/kg Sil. The Sil decreased the Na^+ excretion load, indicating that other transport mechanisms beyond the proximal tubule involved in the changes of handling of Na^+ by the treatment with Sil. On the other hand, the infusion of Prav in Wistar rats by jugular for 30 minutes promoted an increase in Na^+ CE, suggesting that the drug acts by inhibiting NHE3.

Keywords: Sildenafil, Simvastatina, Pravastatin, NHE3, AQ2, Rho, cGMP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo Estrutural da H ⁺ ATPase Vacuolar	22
Figura 2 - Reabsorção de HCO ₃ ⁻ ao longo dos segmentos do néfron.....	24
Figura 3 - Mecanismos pelos quais H ⁺ e HCO ₃ ⁻ são transportados através das membranas apical e basolateral do túbulo proximal.....	26
Figura 4 - Estrutura do NHE3	29
Figura 5 – A inibição da HMG CoA pela estatina reduz os níveis intracelulares de colesterol e isoprenóides.....	35
Figura 6 - Ação dos inibidores de PDE5 sobre a ereção peniana. O retângulo representa uma célula do músculo liso do corpo cavernoso.....	38
Figura 7 - Localização de aquaporinas (AQP) ao longo do néfron.....	42
Figura 8 - Vias de sinalização intracelulares envolvidas com as ações das AQ2.....	43
Figura 9 - Preparo cirúrgico de animais submetidos à microperfusão estacionária in vivo...50	
Figura 10 - Desenho esquemático do sistema de microperfusão estacionária in vivo em túbulo proximal cortical (segmento S2).....	52
Figura 11 - Registro representativo de curvas de microperfusão estacionária in vivo e de curvas de calibração.....	53
Figura 12 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil ou Sildenafil + Sinvastatina diminui a carga excretada de Na ⁺	56
Figura 13 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sinvastatina aumentou a osmolaridade urinária.....	57
Figura 14 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil, Sinvastatina ou Sildenafil+Sinvastatina diminuiu o fluxo urinário.....	58
Figura 15 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sinvastatina aumentou o Na ⁺ plasmático.....	62
Figura 16 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil diminuiu o K ⁺ plasmático.....	62
Figura 17 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil diminuiu o hematócrito.....	63
Figura 18 - Ratos Wistar submetidos à restrição hídrica durante 24 horas apresentaram aumento de osmolaridade urinária, aumento do clearance osmolar e um clearance de água livre mais negativo.....	86

Figura 19 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil diminuiu o ritmo de filtração glomerular (clearance de creatinina).....	67
Figura 20 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil ou Sildenafil+Sinvastatina diminuiu o fluxo urinário.....	67
Figura 21 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil diminuiu a carga excretada de Na ⁺	68
Figura 22 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil diminuiu a fração de excreção de Na ⁺ (% da carga filtrada).....	69
Figura 23 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil+Sinvastatina aumentou o Na ⁺ plasmático.....	72
Figura 24 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas com Sildenafil+Sinvastatina, aumentou proteína total plasmática.....	72
Figura 25 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil+Sinvastatina aumentou o hematócrito.....	73
Figura 26 – A infusão pela jugular de ratos Wistar durante 30 minutos com Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) ou Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) + Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) diminui o fluxo urinário.....	76
Figura 27 – A infusão pela jugular de ratos Wistar durante 30 minutos com Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) ou Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) + Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) diminui o ritmo de filtração glomerular.....	77
Figura 28 - A infusão pela jugular de ratos Wistar durante 30 minutos com Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) aumentou a carga excretada de Na ⁺ e Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) reverteu o efeito da Pravastatina (0,3 mg/Kg/min), diminuindo a carga excretada de Na ⁺	78
Figura 29 - Efeito da perfusão tubular de Sildenafil 10 μM e Sinvastatina 100 μM ou os dois fármacos simultaneamente no JHCO ₃ ⁻ do túbulo proximal de ratos Wistar.....	79
Figura 30 - Determinação do papel do NHE3 na modulação da reabsorção de HCO ₃ ⁻ proximal pelo Sildenafil 10 μM, Sinvastatina 100 μM ou os dois fármacos combinados, na presença ou ausência de S3226 5 μM, um inibidor específico de NHE3.....	80
Figura 31 - Papel da via Rho sobre o JHCO ₃ ⁻ pela perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM no túbulo proximal de ratos Wistar.....	82
Figura 32 - Papel da via GMPc sobre o JHCO ₃ ⁻ pela perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM no túbulo proximal de ratos Wistar.....	83
Figura 33 - Papel da via Rho sobre o JHCO ₃ ⁻ pela perfusão intraluminal de Sinvastatina 100 μM no túbulo proximal de ratos Wistar.....	84
Figura 34 - Efeito da perfusão tubular de Sildenafil 10 μM e Pravastatina 100 μM ou os dois fármacos simultaneamente no JHCO ₃ ⁻ do túbulo proximal de ratos Wistar.....	85

Figura 35 - Determinação do papel do NHE3 na modulação da reabsorção de HCO_3^- proximal pelo Sildenafil $10 \mu\text{M}$, Pravastatina $100 \mu\text{M}$ ou os dois fármacos combinados, na presença ou ausência de S3226 $5 \mu\text{M}$, um inibidor específico de NHE3.....86

Figura 36 - Determinação do papel da H^+ ATPase na modulação da reabsorção de HCO_3^- proximal pela Pravastatina $100 \mu\text{M}$, na presença ou ausência de Concanamicina 10^{-8}M , um inibidor específico da H^+ ATPase.....87

Figura 37 - Papel da via Rho sobre o HCO_3^- pela perfusão intraluminal de Pravastatina $100\mu\text{M}$ no túbulo proximal de ratos Wistar.....89

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios dos parâmetros de função renal de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente.....58
- Tabela 2** – Valores médios dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente.....63
- Tabela 3** – Valores médios dos parâmetros de função renal de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente e restrição hídrica.....69
- Tabela 4** – Valores médios dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente e submetidos à restrição hídrica.....73

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – anidrase carbônica;

ACIV - Anidrase carbônica isoforma IV;

AE- trocador ânion/ HCO_3^- ;

AMPc – adenosina 3'5'-monofosfato cíclico;

AQ - aquaporina;

AQ2 – aquaporina isoforma 2;

CO_2 – gás carbônico;

GMPC – monofosfato cíclico de guanosina;

H_2CO_3 – ácido Carbônico;

H_2O – água;

HCO_3^- - bicarbonato;

JHCO₃⁻ - fluxo de bicarbonato;

NBC –co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$;

NHE – trocador Na^+/H^+ ;

NHE1 – trocador Na^+/H^+ isoforma 1;

NHE3 – trocador Na^+/H^+ isoforma 3;

NHERF – fator regulador do trocador Na^+/H^+ ;

NKA – bomba Na^+/K^+ ATPase;

$p\text{CO}_2$ – pressão parcial de gás carbônico;

PKA – proteína quinase A;

PKG – proteína quinase G;

$t_{1/2}$ – meia vida da redução da concentração de bicarbonato ao nível estacionário;

TP – túbulo proximal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	O Túbulo Proximal.....	20
2.2	A Manutenção do Equilíbrio Ácido-Base	20
2.2.1	O papel da H ⁺ ATPase vacuolar nos rins	21
2.2.2	Papel do NHE3 no equilíbrio ácido-base e manejo de sódio	23
2.2.2.1	Estrutura do NHE3.....	28
2.3	Vias de sinalização envolvidas com os efeitos da Sinvastatina e do Sildenafil.....	30
2.4	A Sinvastatina.....	34
2.5	O Citrato de Sildenafil.....	37
2.6	Citrato de Sildenafil e Sinvastatina regulam a inserção de Aquaporinas 2 (AQ2) nos rins.....	39
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	Objetivo Geral.....	44
3.2	Objetivos Específicos.....	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Reagentes.....	45
4.2	Animais.....	46
4.3	Modelos experimentais.....	46
4.4	Avaliação da excreção renal de sódio: Medida de <i>Clearance</i> e Fração de Excreção pelo método de gaiola metabólica.....	47
4.4	Avaliação da excreção renal de sódio: Medida de <i>Clearance</i> e Carga Excretada de Na ⁺ pelo método gravimétrico.....	49
4.5	Microperfusão estacionária <i>in vivo</i>	49
4.6	Análise Estatística.....	54
5	RESULTADOS.....	55
5.1	Efeito do tratamento por 24 horas com Sildenafil e Sinvastatina sobre a função renal e ratos Wistar	55
5.2	Efeito do tratamento por 24 horas com Sildenafil e Sinvastatina sobre a função renal de ratos Wistar submetidos à 24 horas de restrição hídrica	64
5.3	Efeito da infusão por 30 minutos com Sildenafil e Pravastatina sobre a função renal de ratos Wistar.....	75
5.4	Efeito da perfusão intraluminal de Sildenafil 10 µM e Sinvastatina 100 µM no JHCO ₃ ⁻ no túbulo proximal de ratos Wistar	78
5.5	Vias de sinalização envolvidas no efeito promovido pela perfusão intraluminal do túbulo proximal de ratos Wistar com Sildenafil 10 µM e Sinvastatina 100 µM sobre o JHCO ₃ ⁻	81
5.6	Efeito da perfusão intraluminal de Sildenafil 10 µM e Pravastatina 100 µM no JHCO ₃ ⁻ no túbulo proximal de ratos Wistar	84
5.7	Vias de sinalização envolvidas no efeito promovido pela perfusão intraluminal do túbulo proximal de ratos Wistar com Pravastatina 100 µM sobre o JHCO ₃ ⁻	88

6 DISCUSSÃO	90
6.1 Efeitos sobre a função renal promovidos pelo tratamento de ratos Wistar com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos por 24 horas	90
6.2 Papel da via Rho sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM, Sinvastatina 100 μM e Pravastatina 100 μM no túbulo proximal de ratos Wistar	97
7 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica atual desenvolveu diversos medicamentos que ocasionam alterações em vias de sinalização intracelulares, as quais constituem importantes alvos de estudos da ciência moderna. O Sildenafil e a Sinvastatina são fármacos de uso bastante difundido e que atuam em vias de sinalização que alteram aspectos funcionais e estruturais de proteínas localizadas ao longo dos túbulos renais. Como alterações no manejo de água e sódio pelos rins são esperados frente à administração destes fármacos, investigar os mecanismos envolvidos com a reabsorção de sódio e água por este órgão é de fundamental importância para um entendimento mais detalhado do efeito fisiológico promovido pela administração destes medicamentos.

O trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3) é responsável pela reabsorção de Na^+ e secreção de H^+ e sua atividade está intimamente relacionada a aspectos estruturais das células dos rins, uma vez que alterações do citoesqueleto e de vias de sinalizações intracelulares - que possivelmente acontecem frente à administração de Sinvastatina e Sildenafil - modulam a atividade desta proteína.

A Sinvastatina é um fármaco utilizado no controle do colesterol e sua administração é prevalente em pacientes que apresentam doenças cardíacas ou hipertensão, por exemplo. A compreensão do papel deste fármaco na retenção de Na^+ e água (que estão fortemente relacionados ao desenvolvimento e agravamento da hipertensão) é fundamental para que o tratamento com tal fármaco seja criterioso, uma vez que este é utilizado em um grupo de indivíduos com predisposição a desenvolver alterações de volume.

Com relação ao Sildenafil, a disfunção erétil é muito comum em pacientes diabéticos e hipertensos. Inclusive, este fármaco é utilizado para tratar a hipertensão pulmonar. Assim, se este medicamento é capaz de promover natriurese, tal efeito secundário seria benéfico em uma ampla gama de pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Túbulo Proximal

O túbulo proximal, o primeiro segmento tubular do néfron, consiste num segmento contorcido - o túbulo contorcido proximal (segmentos S1 e S2) –; sendo seguido por um segmento reto – o túbulo proximal reto (segmento S3) - que desce em direção à medula, perpendicular à superfície do rim. Este segmento tubular é responsável pela reabsorção de aproximadamente 67% da água filtrada, Na^+ , Cl^- , K^+ e outros solutos. Além disso, o túbulo proximal reabsorve quase toda a glicose e aminoácidos filtrados pelo glomérulo. A reabsorção de cada substância, incluindo água, está relacionada, de algum modo, à manutenção da atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase localizada na membrana basolateral (Brenner, Rector, 2008). Por outro lado, este segmento cumpre um papel fundamental na função renal de regulação da homeostase ácido-base através de uma secreção significativa de prótons.

2.2 A Manutenção do Equilíbrio Ácido-Base

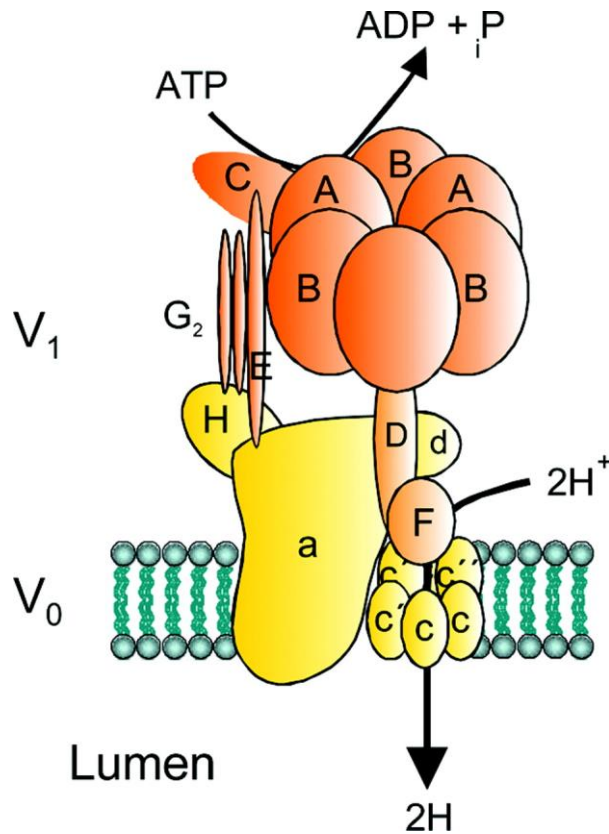
A manutenção da concentração do íon hidrogênio no meio interno dentro de faixas estreitas de variação é essencial para que diversas reações enzimáticas intracelulares aconteçam. O rim é de fundamental importância para que esta função fisiológica seja atendida, garantindo a regulação da homeostase ácido-base – eliminação diária (por filtração e subsequente acidificação da urina) de uma quantidade de ácido liberada composta de ácidos fixos (*i.e.*, radicais ácidos não voláteis) produzidos pelo metabolismo e na reabsorção do HCO_3^- filtrado. Estes processos são possíveis através da secreção de prótons pela membrana apical das células que constituem os túbulos renais. Esta secreção é garantida (Mello Aires, Oliveira-Souza, 2000) por mecanismos que variam de um tipo celular para outro, envolvendo transportadores de íons inseridos na membrana plasmática (Na^+/H^+ , H^+ ATPase, H^+/K^+ ATPase, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$).

2.2.1 O papel da H⁺ ATPase vacuolar nos rins

O contra-transportador Na⁺/H⁺ (isoforma NHE-3) constitui a via predominante para a secreção de H⁺ pelo túbulo proximal e usa o gradiente lúmen/célula para Na⁺ como forma de impulsionar este processo (Mello Aires, Malnic, 1979; Brenner, Rector, 2008). Por outro lado, até 40% da secreção de H⁺ neste segmento é independente de Na⁺ e sensível a Bafilomicina, um inibidor da H⁺-ATPase do tipo vacuolar (H⁺-ATPase_v) (Kinne-Saffran et al., 1982; Wagner et al., 2004).

A H⁺ ATPase apical, responsável pela acidificação do ducto coletor, pertence a uma nova classe de bombas de prótons denominada vacuolar. Apresenta um peso molecular aproximado de 900 kDa e é composta de múltiplas subunidades que se dividem em dois domínios funcionais. Conforme a figura 1 O domínio citoplasmático V1 (catalítico) possui todos os nucleotídeos envolvidos na hidrólise do ATP; o domínio intramembrana Vo se encarrega da translocação dos prótons através da membrana, comportando-se como um canal hidrofóbico para H⁺ (Wagner, 2004) (Figura 1).

Figura 1 – Modelo Estrutural da H^+ ATPase Vacuolar



O domínio citosólico V_1 consiste as subunidades A-H (em letras maiúsculas). O domínio intramembrana V_0 compreende as subunidades a-d com diversas isoformas da subunidade c (em letras minúsculas).

Fonte: Wagner, 2004.

Observações imunocitoquímicas utilizando anticorpos específicos contra várias subunidades da H^+ -ATPase_v, tais como numerosos estudos funcionais em túbulos intactos e vesículas de membrana isoladas da borda em escova, têm demonstrado que a H^+ -ATPase_v está localizada na membrana apical e em organelas intracelulares das células epiteliais do túbulo proximal (Brown et al., 1988; Wagner et al., 2004). Na célula, H^+ e bicarbonato (HCO_3^-) são produzidos por uma reação catalisada pela anidrase carbônica (AC). O H^+ é secretado para o fluido tubular, enquanto o bicarbonato sai da célula pela membrana basolateral e retorna ao sangue peritubular. A maioria do HCO_3^- sai via o co-transportador Na^+/HCO_3^- (NBC1). O processo descrito é responsável também pela reabsorção de 80% do bicarbonato filtrado (Brenner, Rector, 2008). Os transportadores de prótons e bicarbonato presentes no túbulo

proximal são regulados por diversos fatores que possibilitam a manutenção da homeostase ácido-base do organismo (Brenner, Rector, 2008).

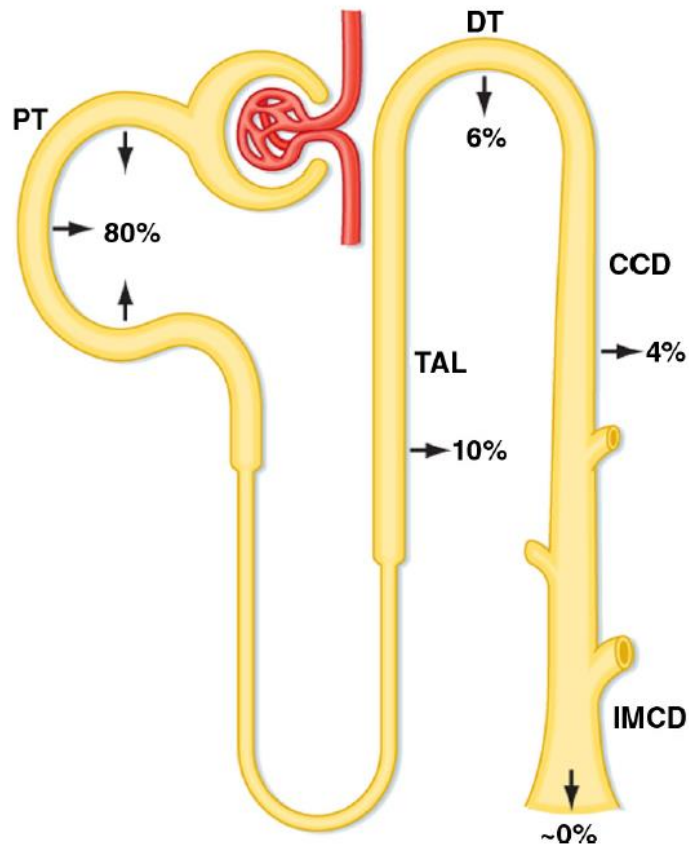
2.2.2 Papel do NHE3 no equilíbrio ácido-base e manejo de sódio

Dentre as funções essenciais dos rins, está a regulação da homeostase ácido-base através da secreção de prótons, como mencionado anteriormente. Ao longo do néfron existem células que apresentam mecanismos de transporte que possibilitam não apenas a secreção de prótons (H^+) para o fluido tubular, mas também a reabsorção de bicarbonato (HCO_3^-) filtrado para que a regulação do pH nos organismos aconteça.

O túbulo proximal (TP), o primeiro segmento tubular do néfron, tem início na junção epitélio-glomerular e se estende até o ramo fino descendente da alça de Henle. O TP é composto pelo túbulo contorcido proximal (segmentos S1 e S2), o qual é seguido pelo túbulo proximal reto (segmento S3) que desce em direção à medula, perpendicular à superfície renal. Aproximadamente 80% da carga filtrada de HCO_3^- é reabsorvida pelo TP – segmento que também gera “ HCO_3^- novo” que neutraliza minerais ácidos gerados pelo metabolismo -, 10% reabsorvida no ramo ascendente espesso da alça de Henle, 6% no túbulo convoluto distal, com 4% do HCO_3^- que permaneceu no fluido tubular sendo reabsorvido no sistema de ductos coletores (Koeppen, 2009) (Figura 2).

Neste processo de geração de “ HCO_3^- novo” a glutamina é metabolizada em NH_4^+ (amônio) e HCO_3^- no túbulo proximal. O NH_4^+ é secretado para o lúmen e o HCO_3^- é reabsorvido para o sangue. Este NH_4^+ secretado é reabsorvido de forma majoritária no ramo espesso ascendente da alça de Henle, acumulando-se no interstício medular. O NH_4^+ é então secretado pelo ducto coletor via difusão não iônica e pelos transportadores de NH_4^+ . Tais processos são necessários para a secreção de H^+ pelo ducto coletor, sendo que para cada molécula de NH_4^+ excretada na urina, uma molécula “nova” de HCO_3^- é adicionada de volta ao líquido extracelular (Koeppen, 2009).

Figura 2 - Reabsorção de HCO_3^- ao longo dos segmentos do néfron



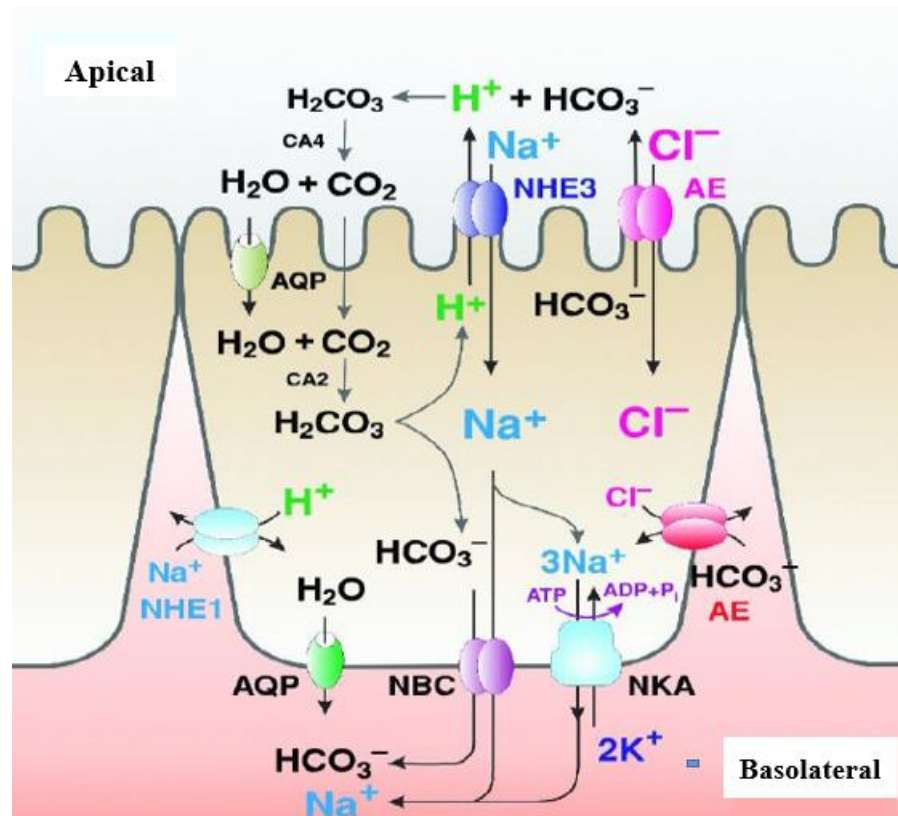
A figura contém a percentagem de HCO_3^- filtrado que é reabsorvido em cada segmento tubular. PT, túbulo proximal; TAL, ramo ascendente espesso da alça de Henle; DT, túbulo convoluto distal; CCD, ducto coletor cortical; IMCD, ducto coletor medular interno.

Fonte: modificado de Koeppen, 2009.

Os mecanismos pelos quais H^+ e HCO_3^- são transportados através das membranas apical e basolateral do túbulo proximal estão presentes na Figura 3. A secreção de H^+ ocorre em sua maior parte pelo trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3, Slc9a3), o qual é responsável pela reabsorção de aproximadamente 70% do HCO_3^- neste segmento. Além deste mecanismo de extrusão de protons, neste segmento também está presente a H^+ -ATPase Vacuolar que é responsável pela reabsorção de 30% do HCO_3^- (Koeppen, 2009).

A anidrase carbônica (AC) é uma enzima que participa de forma importante na secreção de prótons e reabsorção de bicarbonato. A AC-IV, na membrana apical de células do túbulo proximal, promove a dissociação do ácido carbônico (H_2CO_3) em dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). A H_2O entra na célula por aquaporinas (AQP1) que estão inseridas na membrana. O CO_2 e a H_2O sofrem a ação da AC-II, no meio intracelular, gerando H_2CO_3 que se dissocia em H^+ e HCO_3^- . O H^+ é secretado, então, para o lumen majoritariamente pelo NHE3, enquanto que o HCO_3^- sai da célula para a região da serosa, ou seja, para o meio interno, pelo funcionamento do cotransportador eletrogênico sódio-bicarbonato ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, NBC) e pelo trocador cloreto-bicarbonato ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, AE). É importante salientar, ainda, que a reabsorção de cada substância, incluindo a água, depende da manutenção da atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase (NKA) - localizada na membrana basolateral. A funcionalidade da NKA envolve gasto energético, já que transporta, em cada ciclo, 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular - contra seus gradientes eletroquímicos. A energia para o funcionamento desta proteína advém do ATP das mitocôndrias (Orłowski, Grinstein, 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismos pelos quais H^+ e HCO_3^- são transportados através das membranas apical e basolateral do túbulo proximal



O NHE3 apical funciona de forma coordenada com a anidrase carbônica (AC), o trocador cloreto-bicarbonato (AE) e aquaporinas (AQP) de forma a possibilitar a reabsorção de bicarbonato e NaCl do lúmen para o meio interno dos organismos.

Fonte: modificado de Orlowski, Grinstein, 2011.

Além da homeostase ácido-base, o NHE3 desempenha importante papel no que se refere ao manejo de Na^+ e manutenção do volume pelos rins. No TP acontece a reabsorção de aproximadamente 65-70% do sódio e da água filtrados pelos glomérulos, sendo a funcionalidade do NHE3 essencial para a manutenção deste processo. O NHE3 utiliza o gradiente para Na^+ gerado pela NKA na membrana basolateral para a manutenção do efluxo de H^+ e influxo de Na^+ nas células deste segmento tubular, preservando, assim, o volume do meio extracelular via transcelular (Alexander et al., 2013).

Vale ressaltar também que o manejo de sódio pelos TPs não ocorre exclusivamente via NHE3, podendo ocorrer através da funcionalidade de outros NHEs ou mesmo por mecanismos de transporte como: a) co-transportadores Na^+ -Pi tipos I e IIa (na região apical) e do tipo III (na região basolateral dos TPs (Murer et al., 2000); b) transportadores Na^+ -glicose isoformas 1 e 2 (SGLT1 e SGLT2), expressos na região apical deste segmento e responsáveis pela reabsorção de quase toda a glicose filtrada pelos glomérulos - utilizando o gradiente eletroquímico gerado pelo funcionamento da NKA na região basolateral como força movente (Hummel et al., 2011).

Atualmente, sabe-se que um aumento ou diminuição no transporte de sódio no túbulo proximal, pode ser compensado por mecanismos que alteram o transporte deste íon nos segmentos distais do néfron ou até mesmo ritmo de filtração glomerular via *feedback* tubuloglomerular. Além destes aspectos, há também alterações no manejo de sódio no túbulo proximal que acontecem de forma independente dos segmentos distais e que podem alterar o volume extracelular e, conseqüentemente, a pressão arterial. Isto é realizado por meio da atividade de mecanismos de transporte específicos como o NHE3, que, alterando a taxa de reabsorção de Na^+ , altera o volume (Wang et al., 2009). Assim, fármacos que promovam alterações de volume (tal como a Sinvastatina) ou que alterem a carga excretada de sódio e o RFG (tal como o Citrato de Sildenafil), poderiam alterar a funcionalidade do NHE3.

Algumas condições em que os indivíduos são submetidos à períodos de restrição ou privação hídrica estão relacionados com alterações no manejo de sódio pelos rins como forma de aumentar a retenção hídrica e evitar desidratação. Um estudo com restrição hídrica em galinhas, por exemplo, demonstrou que nesta condição, há aumento da atividade do NHE3 no jejuno destes animais como forma de conter Na^+ no organismo e, conseqüentemente, aumentar o volume e prevenir desidratação (De la Horra et al., 1998). Além disto, ensaios com privação de água demonstraram que ocorre aumento da expressão do NHE3 na medula externa renal de ratos submetidos a esta manobra (Amla, Wilke, 2003). Vale lembrar que o NHE3 é expresso (na medula renal) tanto no TP quanto no ramo ascendente espesso da alça de Henle. Assim, há a possibilidade de que o aumento da expressão desta proteína durante a privação hídrica tenha ocorrido também por um aumento da expressão de NHE3 no TP e não

somente na alça de Henle. Desta forma, animais submetidos à restrição hídrica poderiam alterar a funcionalidade do NHE3 nos rins.

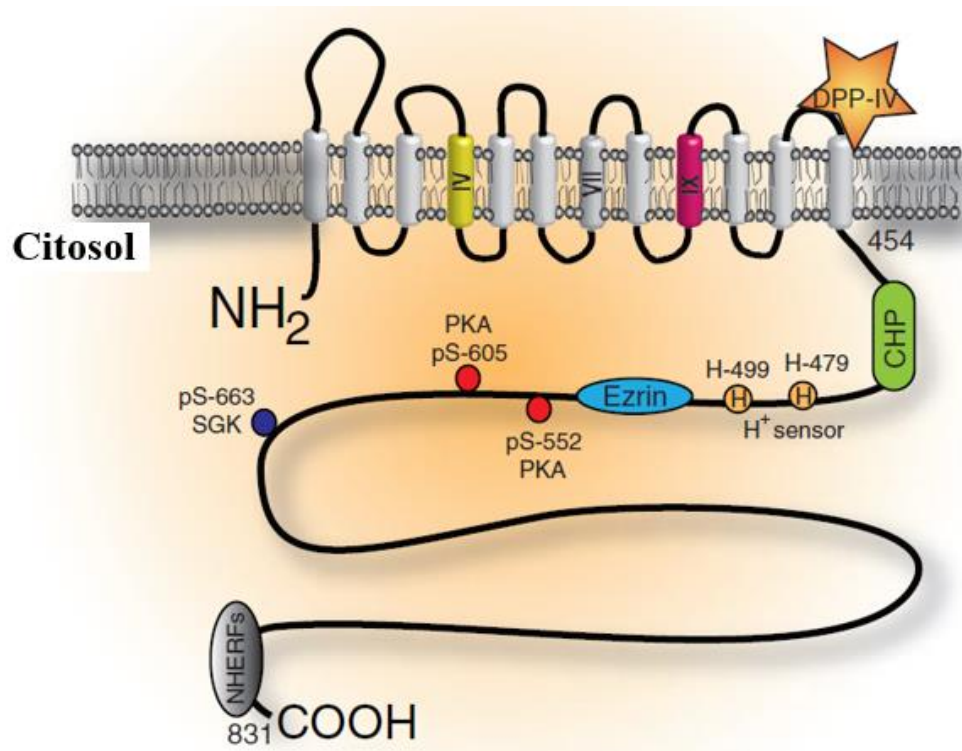
2.2.2.1 Estrutura do NHE3

Atualmente, nove diferentes isoformas de NHEs estão descritas em mamíferos (Orlowski, Grinstein, 2004; Brett et al., 2005). Um dos membros desta família é o NHE3 (gene identificado como SLC26A3), o qual apresenta maior expressão nos epitélios dos tecidos renais e gastrointestinais (Orlowski et al., 1992; Tse et al., 1992; Brant et al., 1995). Porém, o NHE3 já foi identificado no timo, próstata, testículo e ovário de humanos (Brant et al., 1995). Nos rins, o NHE3 é expresso não apenas na borda em escova do TP, mas também no ramo ascendente espesso da alça de Henle, sendo localizado na região apical de células que compõem estes epitélios (Biemesderfer et al, 1997).

O NHE3 é um polipeptídeo de 80 KDa (Biemesderfer et al., 1993) que tem como principal função secretar um H^+ da célula para o lúmen em troca de um Na^+ do lúmen para a célula, em uma estequiometria rígida de 1:1, ou seja, de forma eletroneutra (Alexander, Grinstein, 2009).

Do ponto de vista estrutural, o NHE3 apresenta uma região N-terminal com 12 domínios transmembrana (resíduos de aminoácidos de 1 à 454) seguida por uma região C-terminal (resíduos de aminoácidos de 455 à 831), a qual possui importantes funções regulatórias pelo fato de conter diversos sítios de fosforilação que são alvos de quinases e domínios de interação com fatores regulatórios. Assim, os domínios transmembrana medeiam a troca do H^+ intracelular pelo Na^+ extracelular propriamente dita, enquanto que a região C-terminal citosólica interage com o citoesqueleto das células e moléculas acessórias, regulando a atividade do transportador (Alexander, Grinstein, 2009) (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura do NHE3



A estrutura do NHE3 é dividida em 12 domínios transmembrana e um grande domínio C-terminal citosólico. O domínio relacionado com o transporte de íons está indicado em amarelo (IV), enquanto que a região em que o amiloride (1mmol/l) age inibindo o trocador está em rosa (IX). A figura mostra também sítios de ligação para ezrina e NHERFs (fatores regulatórios do trocador sódio-hidrogênio) que são sensores de prótons e sítios fosforilados, por exemplo, por proteínas quinase A (PKA).

Fonte: modificado de Alexander, Grinstein, 2009.

O NHE3 apresenta também sítios de ligação para ezrina e NHERFs (fatores regulatórios do trocador sódio-hidrogênio) que atuam como “sensores de prótons”, além de sítios fosforilados, por exemplo, por proteínas quinase A (PKA). Estudos com mutações específicas nas regiões C-terminais demonstram que tanto ezrina quanto NHERF-1/2 estão relacionados com NHE3 e atuam como elementos de regulação desta proteína (Weinman et al., 2003b; Cha et al., 2006).

NHE3 é encontrado não apenas na membrana apical, mas também em compartimentos endomembranas sub-apicais. Hoje, já se sabe que no túbulo proximal há a presença de cílios que respondem a mudanças no fluxo tubular funcionando como verdadeiros sensores (Wang, 2006). Além disso, a atividade do NHE3 pode ser modulada por alterações na sua distribuição e abundância, podendo estar presente em duas localizações distintas: no corpo do microvilos, onde apresenta regulação por proteínas que interajam com o citoesqueleto de actina; ou na região entre os microvilos, com diminuição de sua fosforilação e distribuição e onde, provavelmente, acontece a formação de endossomos contendo o transportador (Alexander, Grinstein, 2009). Portanto, alterações no grau de polimerização dos filamentos de actina - ou em proteínas que interajam com actina - podem alterar a atividade do NHE3. Estudos demonstraram que inibição de proteínas Rho-GTPases (proteínas que interagem com filamentos de actina) por manipulação genética ou farmacologicamente diminui a atividade do NHE3 (Kurashima et al., 1999; Szaszi et al., 2000). Estes achados sugerem que fármacos com capacidade de modulação da via de sinalização Rho poderiam alterar a atividade do NHE3. Assim, Sinvastatina e Sildenafil, através da inibição da via Rho agiriam inibindo a atividade do NHE3.

2.3 Vias de sinalização envolvidas com os efeitos da Sinvastatina e do Sildenafil

A indústria farmacêutica tem desenvolvido inúmeros fármacos que agem em vias de sinalização intracelulares – descobertas pela ciência biológica moderna – que se tornaram uma grande área de estudos. Com o advento destes estudos ocorreu, com certa frequência, a atribuição da importância de determinada via a um sistema específico, porém com a posterior descoberta do papel da mesma via no funcionamento de outros sistemas. Assim, durante a triagem clínica – ou após o início da comercialização de muitos fármacos – foram observados efeitos benéficos, ou até mesmo maléficos, em sistemas não diretamente relacionados ao da indicação inicial; o que possibilitou, frente a um efeito benéfico, a indicação destes medicamentos para o tratamento de mais de uma

doença. Dois fármacos que foram desenvolvidos obedecendo esta nova tendência foram a Sinvastatina e o Sildenafil.

Além das funções descritas no item 2.4, atualmente também se atribuiu a Sinvastatina um efeito inibitório na via da Rho GTPase (família de proteínas que inclui a Rac1, Cdc42 e a RhoA (*Rho homology gene Family, member A*)) e suas proteínas acessórias, que apresentam importantes efeitos biológicos (Park et al., 2002; Jacobson et al., 2004). Sabe-se hoje que as Rho GTPases têm um importante papel na organização do citoesqueleto e, por isto, esta proteína parece estar envolvida com o tráfego intracelular de vesículas e proteínas, além de migração, crescimento celular, entre outros processos que dependem do citoesqueleto (Ridley, 2006; Aspenstrom et al., 2007; Karlsson et al., 2009).

No tecido renal tanto a Rho GTPase quanto a PDE5, responsáveis por parte ou todos os efeitos biológicos observados durante a terapia com a Sinvastatina e o Sildenafil (respectivamente) são expressas, e possuem papel fisiológico e patofisiológico neste tecido (Dousa, 1999; Hallett et al., 2003; Caron et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que estes fármacos promovem aumento da inserção de aquaporina 2 (AQP2) no ducto coletor de ratos Brattleboro (linhagem que apresenta diabetes *insipidus* neurogênica (Majzoub et al., 1987)) e em células LLC-AQP2 (células do túbulo proximal de porcos transfectadas com AQ2) (Bouley et al., 2005; Li et al., 2011).

Tal como o Sildenafil, foi demonstrado que fármacos inibidores da via da Rho-quinase (tais como Y-27632 e fasudil) também são eficazes para o tratamento da hipertensão pulmonar (Abe et al., 2004.; Fagan et al., 2004). Evidências apontam que a Rho-quinase desempenha um importante papel na regulação de aspectos estruturais de células vasculares, tais como a organização do citoesqueleto de actina e diferenciação (Somlyo, Somlyo, 2000; Mack et al., 2001). Na musculatura lisa vascular, a RhoA é inibida pela via NO / cGMP dependente de proteína quinase (PKG) (Sauzeau et al., 2000), e portanto, a ativação da via NO / cGMP (que ocorre durante a terapia com Sildenafil) pode levar à alterações na via da RhoA e, conseqüentemente, na organização do citoesqueleto de actina (Sauzeau et al., 2000; Gudi et al., 2002.). Assim, apesar do Sildenafil não agir diretamente na via da RhoA, este aumenta os níveis intracelulares de cGMP, o que torna provável que este fármaco promova alterações no citoesqueleto semelhantes as

produzidas por fármacos que atuam diretamente na RhoA, tal como a Sinvastatina. Este pode ser um dos mecanismos comuns pelos quais estes fármacos corrigem a hipertensão pulmonar e/ou atuam no ducto coletor promovendo a inserção de aquaporinas.

Fisiologicamente, a inserção de AQP2 no ducto coletor depende da ativação dos receptores V2 após a liberação de hormônio anti-diurético (ADH) e é seguida pela reabsorção de água livre neste segmento tubular com consequente aumento da osmolaridade urinária e diminuição do volume/fluxo urinário (Boone, Deen, 2008). Porém, o mecanismo pelo qual o Sildenafil e a Sinvastatina aumentam a expressão apical de AQP2 é independente de ADH e ocorre por alterações na taxa de endocitose/exocitose promovida por estes agentes, através da modulação de vias intracelulares comuns às moduladas pelo complexo ADH/receptor (Bouley et al., 2005; Hoffert et al., 2011; Li et al., 2011). Sendo assim, espera-se que a administração de tais fármacos seja seguida por efeitos semelhantes aos observados frente à administração de ADH, isto é, aumento da osmolaridade urinária e redução do volume/fluxo urinário. Porém, apesar de ter sido capaz de aumentar a expressão de AQP2 na membrana apical de ratos Brattleboro, o Sildenafil não foi capaz de aumentar a osmolaridade urinária e reduzir o fluxo urinário nestes animais. Já o tratamento com a Sinvastatina promoveu acentuada redução do fluxo urinário e aumento da osmolaridade (Bouley et al., 2005; Li et al., 2011).

O túbulo proximal constitui um importante segmento do néfron responsável pela reabsorção maciça de Na^+ e água; atuando na regulação do volume extracelular e da pressão arterial, em especial através da regulação da atividade do trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3) expresso na membrana apical deste segmento (Lorenz et al., 1999; Amlal et al., 2003; Girardi et al., 2008; Damiano et al., 2010; Banday, Lokhandwala, 2011). A atividade deste transportador já foi relacionada ao início da hipertensão em animais espontaneamente hipertensos (SHR) (Crajoinas et al., 2010) e à retenção de Na^+ e água com consequente aumento de volume circulante em animais com insuficiência cardíaca (Inoue et al., 2012).

Wakabayash et al. (1997) demonstraram que a atividade do NHE3 é modulada por alterações na pressão sanguínea, sendo sensível a hormônios que elevam segundos mensageiros intracelulares, tais como cAMP e diacilglicerol. A regulação do NHE3 também

pode ser exercida por estimulação de proteínas quinases, como a proteína quinase A (PKA), a proteína quinase G (PKG) e a proteína quinase C (PKC), as quais induzem significativa inibição do trocador (Borgese et al., 1992; Kandasamy et al., 1995; Cha et al., 2005). Estudos apontam a participação de proteínas acessórias (NHERF1 e NHERF2) necessárias para a inibição do NHE3 mediada por PKA e por PKG (Yun et al., 1997; Weinman et al., 1995; Cha et al., 2005). Assim, a produção de cGMP com a conseqüente ativação da PKG, também promove inibição do NHE3, tal como verificado com o tratamento com Uroguanilina e Sta, importantes ativadores do receptor da guanilato ciclase c (Roczniak, Burns, 1996; Jin et al., 2001; Cha et al., 2005;).

Algumas das proteínas acessórias que modulam a atividade do NHE3 se relacionam com a ezrina, sendo que esta se liga a filamentos de actina servindo como ponte entre proteínas de membrana, dentre elas o NHE3, e o citoesqueleto. Assim, a atividade do NHE3 pode ser controlada pelo seu estado de associação com o citoesqueleto de actina e com a ezrina (Kurashima et al., 1999). Szászi et al. (2001) sugeriram que a inibição do NHE3 pela PKA envolve remodelamento do citoesqueleto e inativação da via RhoA (proteína que integra a família Rho GTPase) alterando a fosforilação do NHE3 no resíduo Ser⁶⁰⁵ e indireta no resíduo Ser⁶³⁴.

Como mencionado anteriormente, a Sinvastatina apresenta um efeito inibitório sobre as Rho GTPases, e estas apresentam importante papel na organização do citoesqueleto. Assim, a inibição da RhoA (ou outras GTPases) pela Sinvastatina, poderia alterar a taxa de endocitose e exocitose do NH₃ diminuindo sua expressão na membrana apical e, portanto sua atividade. O Sildenafil, por sua vez, é um fármaco que aumenta a biodisponibilidade do cGMP, sendo que esta via intracelular apresenta acentuado efeito inibitório sobre o NHE3 (Jin et al. 2001; Cha et al., 2005). A ativação do cGMP/PKG pode ser o mecanismo pelo qual o Sildenafil não é capaz de promover a retenção de água no modelo de diabetes *insipidus*, uma vez que a inibição acentuada do NHE3 pode ocasionar acentuada natriurese.

Entretanto, estes fármacos poderiam atuar em outros transportadores de Na⁺ expressos ao longo do néfron. No ramo ascendente espesso da alça de Henle, há, não

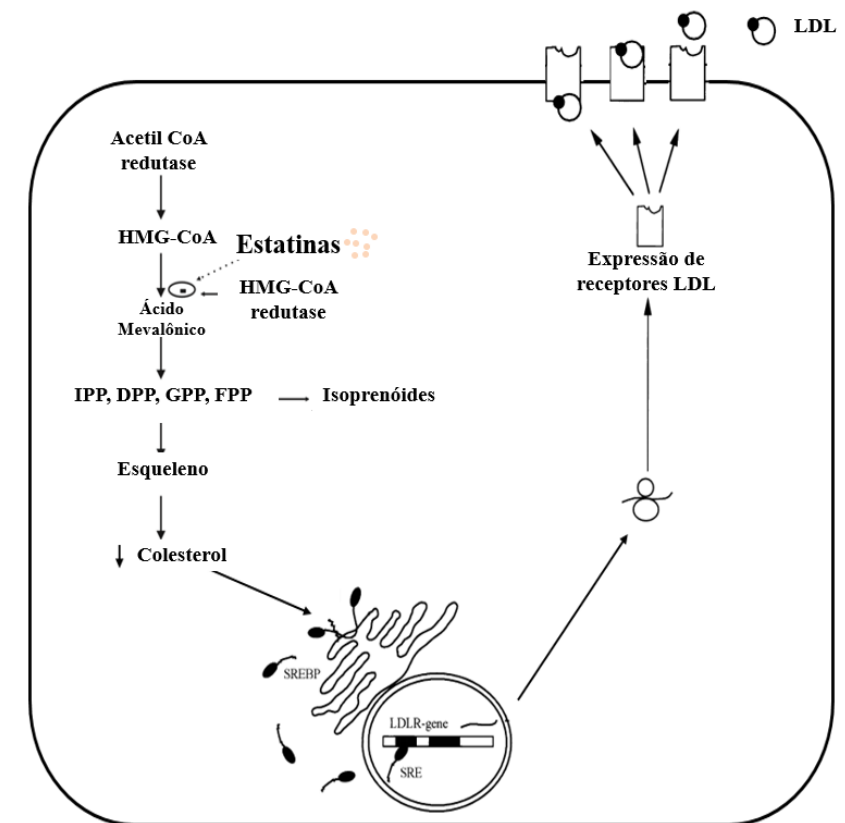
somente o NHE3, mas também o cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2 ou BSC-1). Já no túbulo convoluto distal, o Na^+ é reabsorvido primariamente pelo cotransportador $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC ou TSC) (Knepper et al., 2001). No túbulo conector e ducto coletor a reabsorção de Na^+ pela membrana apical ocorre através do canal epitelial para Na^+ (ENaC), o qual tem sido relacionado com a gênese da Síndrome de *Liddle*, desordem caracterizada pela expansão do volume e hipertensão (Shimkets et al., 1994). A vasopressina aumenta a expressão apical de ENaC, o que leva a um aumento da permeabilidade do ducto coletor ao Na^+ (Ecelbarger et al., 2001). Como mencionado anteriormente, este hormônio é o responsável pela inserção de AQ2 no ducto coletor que, por sua vez conferem permeabilidade à água nas células principais do ducto coletor (Nielsen et al., 2002). Todos estes transportadores renais podem estar envolvidos na natriurese ou reabsorção de Na^+ e água promovidas pelos fármacos Sildenafil e Sinvastatina, respectivamente, e poderiam justificar as diferenças observadas durante a administração dos mesmos em ratos que apresentam diabetes *insipidus*.

2.4 A Sinvastatina

A Sinvastatina pertence à família das estatinas e foi desenvolvida pela indústria farmacêutica como um agente para a terapia da hipercolesteremia e no tratamento das doenças coronarianas (Freedman, Isner, 2001). Os fármacos pertencentes a este grupo são inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) – por serem inibidores competitivos e reversíveis -, enzima limitante para a biossíntese do colesterol por impedir a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico (Goldstein, Brown, 1990; Grundy, 1998) (Figura 5). É importante ressaltar ainda que estatinas reduzem o colesterol por aumentarem a expressão de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (receptores de vLDL, *low density lipoprotein*) nos hepatócitos, promovendo a captação do colesterol LDL via endocitose mediada por receptor, sendo este um mecanismo importante na redução do colesterol LDL no plasma (Vaughan et al., 2009) (Figura 5). Além

disso, sabe-se que estatinas promovem diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e aumento do HDL (*high density lipoprotein*), promovendo melhora no quadro geral da hipercolesterolemia – dislipidemia ou elevação do colesterol total (CT) -, diminuindo a probabilidade do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e lesões arteroscleróticas (Vaughan et al., 2009).

Figura 5 – A inibição da HMG CoA pela estatina reduz os níveis intracelulares de colesterol e isoprenóides



O retângulo representa um hepatócito. A redução nos níveis intracelulares de colesterol ativa proteases que clivam os elementos regulatórios de esteróis ligados a proteínas (SREBPs) do retículo endoplasmático que se translocam para o núcleo aumentando a expressão do gene para o receptor LDL. Há, então, aumento da expressão do receptor LDL, endocitose de LDL e diminuição de seus níveis no plasma.

Fonte: modificado de Vaughan et al., 2009.

Atualmente, há um crescente interesse nos efeitos das estatinas não relacionados com sua ação sobre o colesterol LDL, denominados como pleiotrópicos. Dentre estes efeitos estão: a) tratamento de doença de Alzheimer, já que hoje sabe-se da existência de uma relação entre a acumulação da proteína β -amilóide (relacionada com Alzheimer) no cérebro e o aumento nos níveis séricos de colesterol (Kálman, Janka, 2005; Querfurthe, LaFerla, 2010); b) regressão de cânceres, sendo capaz de inibir a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células tumorais, induzindo apoptose destas. O mecanismo molecular envolvido na ação das estatinas sobre células tumorais não está completamente elucidado mas sabe-se hoje que envolveria o controle de proteínas Ras e Rho (pertencentes a família das guanosinas trifosfatases, GTPases) - proteínas que apresentam mutação em células tumorais -, inibição da atividade de ciclinas dependentes de quinases (CDK) e ativação de inibidores destas CDKs (Jakobisiak, Golab, 2003). Inativação de CDKs, por exemplo, promove o controle da proliferação de células tumorais, já que CDKs ocasionam a entrada na fase G1 do ciclo celular (Deshpande et al., 2005); c) diminuição da disfunção endotelial, controlando a síntese e liberação do óxido nítrico (NO) derivado de endotélio. O NO endotelial inibe a formação de aterosclerose, por exemplo, mediando o relaxamento vascular e inibindo a agregação plaquetária; ou seja, estatinas poderiam restabelecer a função endotelial, em parte, pela diminuição dos níveis de colesterol plasmático. No entanto, foi verificado que o restabelecimento da função endotelial ocorre anteriormente à diminuição do colesterol, o que sugere que efeitos adicionais à redução do colesterol estão envolvidos neste processo, principalmente o aumento de NO endotelial por estimulação e regulação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) (Kalinowski et al., 2002); d) ação antiinflamatória, também pelo aumento do NO endotelial. Isto acontece porque a estatina inibe a biossíntese de L-melovanato e, conseqüentemente, de isoprenoides - tais como geranylgeranylpirofosfato (GGPP) -, envolvidos na regulação de eNOS, com seu aumento ocasionando a inibição de Rho (inibidor endógeno da geração de NO endotelial). Assim, inibindo Rho com Sinvastatina há uma reversão do efeito inibitório e conseqüente aumento de eNOS (Chou et al., 2008).

Ainda com relação aos efeitos pleiotrópicos, sabe-se que a Sinvastatina promove melhora da função renal e prevenção do desenvolvimento de doenças renais em modelos de porcos e ratos (Wilson et al., 2003; Kido et al., 2005). Além disso, em pacientes com cardiopatias e doença renal

associada, estatinas reduzem proteinúria e também promovem melhora da função renal (Tonelli et al., 2003; Sandhu et al., 2006). Em pacientes com doença renal policística, uma disfunção autossômica dominante, estatinas aumentam o ritmo de filtração glomerular (GFR), o fluxo plasmático renal (RPF) e a produção de NO, o que acarreta benefícios para o endotélio renal (vanDijk et al., 2001).

Além destas ações sobre os rins, um estudo com administração de Lovastatina (10 mg/Kg/dia) por quatro semanas em animais espontaneamente hipertensos (SHR), demonstrou que o fármaco diminuiu de forma significativa a pressão arterial média, com esta mudança de pressão sendo acompanhada por alterações em aspectos da função renal: aumento da excreção de Na⁺, do GFR e redução da razão parede-lúmen das arteríolas renais. Tais resultados sugerem que o tratamento crônico com estatinas é capaz de alterar o manejo de sal e a função renal, bem como atenuar o desenvolvimento de hipertrofia vascular renal nestes animais (Jiang, Roman, 1997).

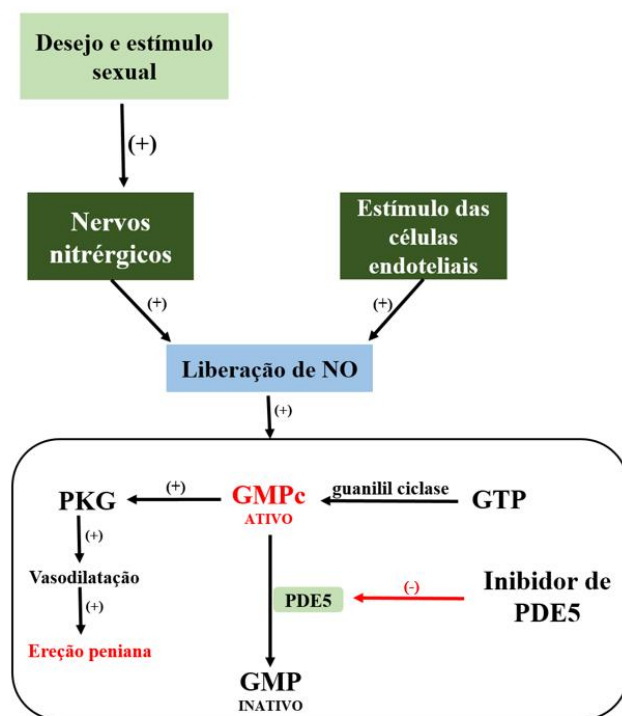
2.5 O Citrato de Sildenafil

O Citrato de Sildenafil é um inibidor da fosfatidilesterase do tipo 5 (PDE5) - uma cGMP fosfatidilesterase (Cheitlin et al., 1999). Esta molécula foi desenvolvida, inicialmente, como um vasodilatador cuja indicação era o tratamento da hipertensão pulmonar. Durante a fase de triagem clínica, um efeito adverso apresentado pelos usuários masculinos foi o retorno ou aumento das ereções penianas, o que propiciou, em 1998, a autorização por parte da *Food and Drugs Administration* (FDA) nos EUA, da sua indicação no tratamento da disfunção erétil masculina (Weidmann, 1998).

A PDE5 é uma isoforma que inativa o GMPC. Os nervos nitrérgicos liberam NO que se difunde nas células musculares lisas do corpo cavernoso, ativando a guanilil ciclase.

Como resultado, acontece aumento do GMPc citoplasmático e vasodilatação - dependente de proteína quinase G (PKG) - e ereção peniana. Assim, a inibição de PDE5 potencializa o efeito sobre o músculo liso vascular peniano do NO derivado do endotélio dos nervos nitrérgicos, que são ativados pelo estímulo sexual (Andersson, 2001; Rang, Dale, 2012) (Figura 6).

Figura 6 - Ação dos inibidores de PDE5 sobre a ereção peniana. O retângulo representa uma célula do músculo liso do corpo cavernoso



Com o desejo e estímulos sexuais há liberação de NO nos vasos nitrérgicos ativando a guanilil ciclase, o que aumenta a produção de GMPc, o qual ativa proteína quinase G (PKG). Esta promove vasodilatação e, conseqüentemente, a ereção peniana. O GMPc torna-se inativo pela ação da PDE5; assim, inibidores desta enzima, potencializam a produção de NO e promovem a ereção peniana.

Fonte: modificado de Rang, Dale, 2012.

Quanto a pressão arterial, o Sildenafil é capaz de promover redução modesta da pressão sistólica (em 8 a 10 mmHg) e diastólica (em 5 a 6 mmHg), com seu pico de ação

sobre a pressão arterial ocorrendo por volta de 60 minutos após sua ingestão e retorno ao basal após quatro horas (Cheitlin et al., 1999). Esta redução na pressão arterial acontece sem alterações na frequência cardíaca e está relacionada ao efeito de vasodilatação periférica produzido por este fármaco que, por aumentar NO (proveniente dos nitratos inorgânicos tais como GTN, trinitrato de glicerila) nos músculos lisos vasculares de forma generalizada, deflagra efeitos hipotensores (Cheitlin et al., 1999; Rang, Dale, 2012).

A inibição farmacológica de PDE5 com aumento do GMPc na forma ativa pode ser utilizada, ainda, para atenuar a progressão da injúria renal em ratos hipertensos. Um estudo de Rodriguez-Iturbe e colaboradores, demonstrou que a administração deste fármaco por quatro semanas (2,5mg/Kg/dia) resulta em normalização dos níveis séricos de creatinina, previne a hipertensão e reduz proteinúria, indicando um atraso na progressão dos danos aos rins (Rodriguez-Iturbe et al., 2005).

Como os fármacos Sildenafil e Sinvastatina promovem uma melhora de aspectos da função renal em determinadas patologias e pelo fato de estudos com a administração destes serem ainda pouco difundidos no meio científico, um entendimento mais detalhado de suas ações sobre os rins se faz necessário.

2.6 Citrato de Sildenafil e Sinvastatina regulam a inserção de Aquaporinas 2 (AQ2) nos rins

O manejo da água e Na^+ pelos rins tem como função primordial manter o balanço destas substâncias e a homeostase nos organismos, com os mecanismos fisiológicos envolvidos dependentes do gradiente osmótico e de transportadores presentes ao longo dos túbulos renais. É importante ressaltar que o controle da osmolaridade pelos rins ocorre através de mecanismos complexos e seu entendimento envolve a análise de duas variáveis importantes: 1) *clearance* osmolar, o volume de urina que contém os solutos numa

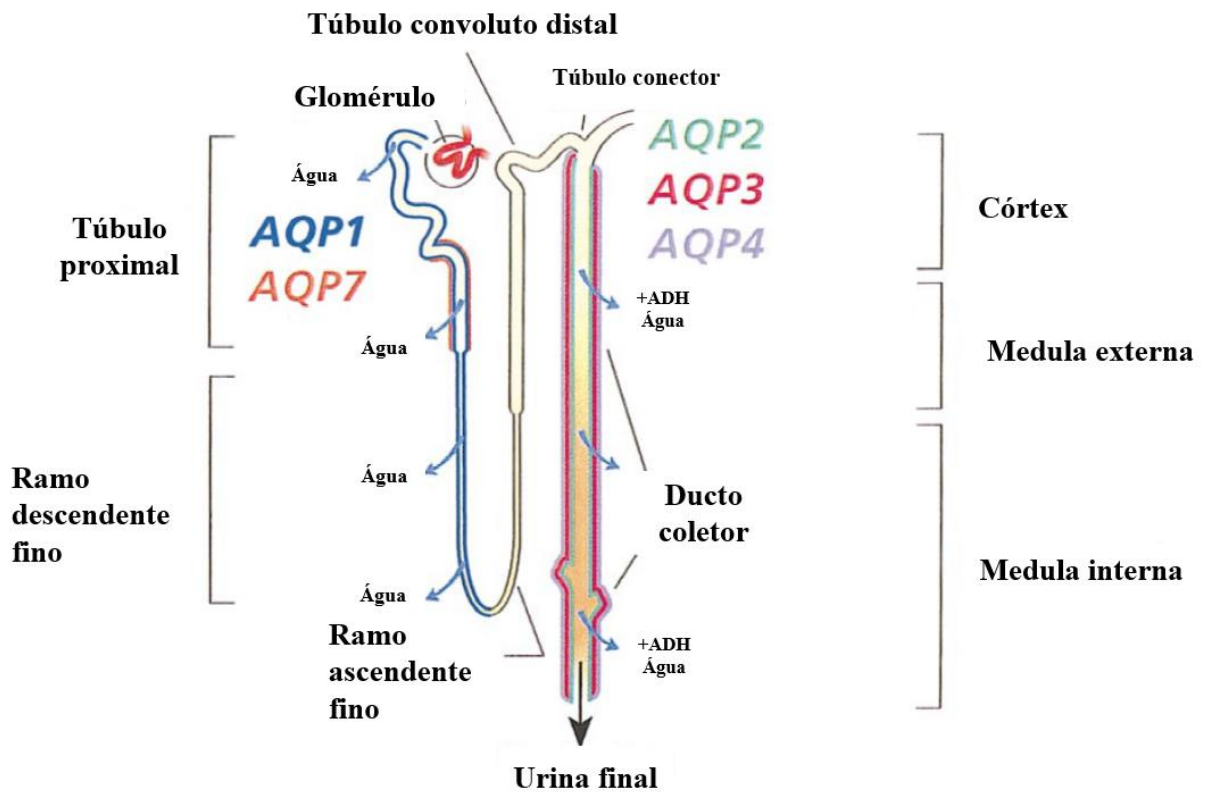
concentração igual à do plasma (isosmótica ao plasma); 2) *clearance* de água livre, o volume de água livre de solutos excretado por unidade de tempo (quantidade de água livre de solutos que torna a urina diluída). Deste modo, num organismo pode ocorrer a formação de: a) uma urina isotônica, quando o fluxo urinário igual ao *clearance* osmolar; b) urina hipotônica (diluída), com o fluxo maior que o *clearance* osmolar; c) urina hipertônica (concentrada), com o fluxo menor que o *clearance* osmolar (*clearance* de água livre negativo). Assim, o estudo mais detalhado destes mecanismos nos permite entender como os rins são capazes de gerar urinas mais concentradas ou diluídas de acordo com as necessidades do indivíduo. Para que isto ocorra, é importante que aconteçam variações de permeabilidade à água nos sistemas de ductos coletores e que a hiperosmolaridade medular seja mantida pela atividade de transportadores expressos nas membranas apicais e basolaterais, principalmente no néfron distal.

A absorção de água ao longo do néfron depende, como já foi mencionado, do gradiente osmótico para a reabsorção desta através do epitélio tubular (Knepper, 1997). Este gradiente de força osmótica é estabelecido, em parte, pelo transporte de Na^+ (Nielsen et al, 2002). Além disso, a geração de uma medula hipertônica é de fundamental importância e se dá também por um complexo mecanismo de contra-corrente, o qual acontece, principalmente, por diferenças de permeabilidade à água e a outros solutos em diferentes segmentos do néfron (Nielsen et al, 2002).

Atualmente, sete aquaporinas estão descritas nos rins. Estas proteínas possuem a capacidade de alterar a permeabilidade de diferentes segmentos tubulares renais à água. A AQ1 é expressa no túbulo proximal e ramo descendente fino da alça de Henle (Figura 7), estando ausente no ramo ascendente fino, no ramo ascendente espesso e no túbulo distal (Nielsen et al., 1993). Em células principais do ducto coletor, são expressas AQ3 e AQ4 (Nielsen et al., 1993; Knepper et al., 1994; Nielsen et al., 1999). AQ6 é expressa em células intercalares α do ducto coletor, sendo expressa de forma subcelular e podendo, ainda, desempenhar importante papel na acidificação de vesículas (Yasui et al., 1999). AQ7 foi identificada na borda em escova do túbulo proximal, mas pouco se sabe sobre seu papel fisiológico nos rins (Nielsen et al., 2002) (Figura 7).

Já as AQ2, são abundantes em células principais do ducto coletor (Figura 7), onde promove variação da permeabilidade à água por sinalização hormonal, através do hormônio anti-diurético (HAD) ou vasopressina (AVP) (Tanner et al., 1973; Nielsen et al., 1993; Nielsen et al., 1999). O ADH é um decapeptídeo sintetizado nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo e secretado pela hipófise, desempenhando um papel essencial na regulação dos processos de concentração e diluição urinárias. Quando secretado, promove aumento da osmolaridade urinária e diminuição do fluxo. Este mecanismo de controle promovido pela secreção de ADH está diretamente relacionado com a manutenção da hipertonicidade medular pelo sistema de contra-corrente - promovendo aumento da permeabilidade à água e fazendo com que o fluido tubular seja exposto à alta osmolaridade na região da medular renal. O ADH também pode ser secretado em situações de aumento da osmolaridade plasmática ou redução do volume sanguíneo, por exemplo. Quando este tipo de variação acontece, a mesma é detectada por neurônios osmorreceptores localizados no hipotálamo e em estruturas associadas à lâmina terminal (o órgão subfornical, o núcleo pré-óptico medial e o órgão vascular da lâmina terminal), estimulando secreção do ADH (Boron, Boulpaep, 2009).

Figura 7 - Localização de aquaporinas (AQP) ao longo do néfron



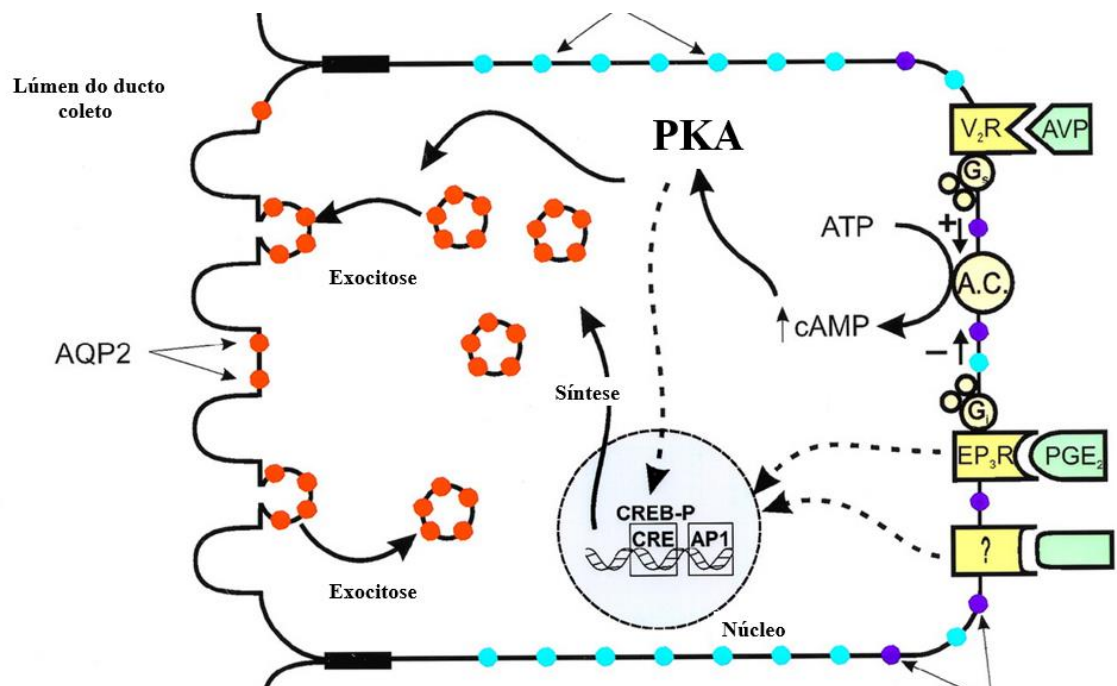
AQP1 (azul), presente no túbulo proximal e ramo fino descendente da alça de Henle; AQP2 (verde), na região apical e subapical de células principais do ducto coletor; AQP3 (vermelho) e AQP4 (roxo), na membrana basolateral de células principais do ducto coletor; AQP7 (laranja), na membrana apical da borda em escova no túbulo proximal.

Fonte: modificado de Nielsen et al., 2002.

Quanto às vias de sinalização intracelulares envolvidas com as ações das AQP2, o que se tem é que o ADH, por ser um hormônio incapaz de atravessar a membrana celular, liga-se a receptores V2 na membrana basolateral de células principais do ducto coletor, como primeiro mensageiro. Depois disso acontece ativação de adenilciclase, uma enzima catalítica. Após estes eventos, acontece ativação de um complexo de proteínas G regulatórias (Gs, ativada pelo próprio ADH ocasionando um aumento da permeabilidade do epitélio à água; Gi, que, quando ativada pela prostaglandina 2 (PG2), antagoniza os efeitos fisiológicos

promovidos pelo ADH). Quando Gs é ativada por ADH, no meio intracelular acontece ativação do segundo mensageiro 3'5' adenosina monofosfato cíclico (AMPC) pela clivagem do ATP. O AMPC ativa: a) proteína quinase A (PKA), que regula a formação de vesículas contendo AQ2 e sua fosforilação, promovendo sua inserção na membrana; b) fatores de transcrição que estimulam o gene codificador de AQ2. A AQ2 atua como canal para água, inserindo-se na membrana apical onde promoverá reabsorção de água (Figura 8) (Marples et al., 1999; Nielsen et al., 2002).

Figura 8 - Vias de sinalização intracelulares envolvidas com as ações das AQ2



O ADH liga-se a receptores V2 na membrana basolateral de células principais do ducto coleto; há ativação de adenilciclase. Após estes eventos, acontece ativação de proteínas Gs; no meio intracelular acontece ativação do segundo mensageiro 3'5' adenosina monofosfato cíclico (AMPC) pela clivagem do ATP. O AMPC ativa proteína quinase A (PKA), proteína que regula a fosforilação de AQ2 e fatores de transcrição que estimulam o gene codificador de AQ2. As AQ2 atuam como canais de água, inserindo-se na membrana apical onde promoverá reabsorção de água.

Fonte: Modificado de Marples et al., 1999.

A Sinvastatina é capaz de promover inserção de aquaporinas 2 (AQ2) no ducto coletor de animais com diabetes *insipidus* neurogênica e, conseqüentemente, corrigir a osmolaridade urinária destes, demonstrando a capacidade que este fármaco apresenta de regulação do volume (Bouley et al., 2005). O Sildenafil (Bouley et al., 2005), tal como a Sinvastatina (Li et al., 2011), é capaz de promover inserção de aquaporinas 2 (AQ2) no ducto coletor de animais com diabetes *insipidus* neurogênica, os quais produzem uma urina diluída. Por outro lado, este medicamento também promoveria natriurese, antagonizando o efeito anti-diurético produzido pela inserção apical de aquaporinas 2 (Li et al., 2011). Os mecanismos pelos quais os rins promoveriam a natriurese nestes animais, permanecem incertos. Como a Sinvastatina é um fármaco capaz de promover alterações no volume dos indivíduos e as ações do Sildenafil envolvem mecanismos que antagonizam seu efeito anti-diurético, faz-se interessante um estudo mais detalhado das ações destes dois medicamentos sobre alterações em parâmetros da função renal relacionados com o volume e balanço de água.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é testar a hipótese de que a Sinvastatina e o Sildenafil modulariam a atividade do trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3) apical em túbulos proximais de ratos Wistar, as vias de sinalização envolvidas, bem como avaliar aspectos da função renal destes animais submetidos ao tratamento com estes fármacos.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- a) Pretendemos avaliar se o Citrato de Sildenafil, a Sinvastatina (e a Pravastatina) alteram a função renal de animais tratados;
- b) Avaliar possíveis alterações no fluxo de bicarbonato (HCO_3^-) dependentes do NHE3 ocasionadas pelo tratamento com Sildenafil, Sinvastatina (e a Pravastatina) utilizando a técnica de microperfusão estacionária do túbulo proximal para avaliar aspectos funcionais do NHE3;
- c) Identificar se as vias de sinalização intracelulares classicamente relacionadas a estes fármacos (cGMP e Rho, para o Sildenafil; Rho para a Sinvastatina e Pravastatina, respectivamente) são as vias promotoras das alterações funcionais do NHE3 frente perfusão tubular com Sildenafil ou Sinvastatina através da técnica de microperfusão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste estudo foram:

- a) Sinvastatina (Zocor), Merck (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ., Brasil) nos experimentos de gaiola metabólica;
- b) Citrato de Sildenafil, Pfizer (Pfizer S.A., São Paulo, SP., Brasil) nos experimentos de gaiola metabólica;
- c) Simvastatin, Pravastatin, Sildenafil Citrate, Concanamicin, Solutol HS 15, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Rafinose, Manitol, Hydrogen Ionophore I, Fluka: Hexamethyldisilazane, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA);
- d) inibidor de Rho quinase, Y-27632 dihydrochloride, Tocris (Tocris, Bristol, UK);
- e) inibidor de GMPc, KT5823, Santa Cruz Biotech (Dallas, Texas, USA);

f) Dopalen (Quetamina); Anazedan (Xilazina), Ceva (Ceva, São Paulo, SP., Brasil); Inibidor específico de NHE3 (S3226) foi doado gentilmente pelo Dr. Jurgen Punter da Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemanha;

Os demais reagentes utilizados neste estudo foram das marcas Synth (São Paulo, SP., Brasil) e Sigma-Aldrich.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos, com peso entre 200 e 350g, para a execução deste trabalho. Estes animais foram obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética CEUA (certificado 003/12/CEUA, datado de 14.02.2012).

Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração (Nuvilab, São Paulo) *ad libitum* e cada gaiola contendo no máximo cinco animais e um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos foram mantidos sob esta dieta padrão até o momento do procedimento de microperfusão ou até serem tratados para os demais experimentos.

4.3 Modelos experimentais

Realizamos experimentos utilizando ratos *Wistar*. Como o Sildenafil é um medicamento de prescrição para uso agudo, decidimos realizar os tratamentos com os fármacos de forma aguda. Estes animais foram tratados por 24 horas com: Veículo (1% de etanol e 4% de Solutol HS 15 - Polietileno glicol 15-hidroxiestearato), Sildenafil (20 mg/kg/dia), Sinvastatina (7 mg/kg/dia) ou ambos, administradas via oral - com fármacos diluídos e oferecidos *ad libitum* ou por gavagem duas vezes ao dia, no caso dos animais submetidos à restrição hídrica (30% da quantidade de água que o animal ingere durante as 24 horas de tratamento).

4.4 Avaliação da excreção renal de sódio: Medida de *Clearance* e Fração de Excreção pelo método de gaiola metabólica

Animais veículo ou tratados com Sinvastatina, Sildenafil ou os dois fármacos de forma concomitante foram colocados em gaiolas metabólicas (Tecniplast, Buguggiate, Italy) pelo período de 24 horas de tratamento. Todos os animais foram deixados na gaiola metabólica por 48 horas para adaptação antes de serem realizadas as coletas das urinas e sangue e análises bioquímicas. Os animais submetidos à restrição hídrica receberam os medicamentos por gavagem. O consumo de ração e o volume de urina produzido foram medidos para este intervalo de 24 horas. Ao final destas 24 horas, os animais eram anestesiados com a associação de Quetamina 100 mg/Kg e Xilazina 10 mg/Kg. Foi, então, coletado o sangue do plexo ocular com auxílio de capilares heparinizados e o mesmo foi centrifugado a 2000 rpm, 4 °C por 10 minutos para obtenção do plasma. Foram mensuradas as concentrações de Na⁺, K⁺ e creatinina urinária e plasmática, e a osmolaridade urinária e plasmática.

A partir do volume urinário obtido no intervalo de 24 horas calculamos o fluxo urinário, em ml/min, que foi calculado dividindo-se o volume urinário total pelo intervalo de tempo, em minutos, entre o início do armazenamento da urina e o momento de sua coleta.

A partir do valor de fluxo obtido, para cada animal, foi calculado o ritmo de filtração glomerular que foi obtido através do *clearance* de creatinina, em ml/min. Este foi calculado multiplicando-se o fluxo urinário, em ml/min, pela concentração urinária de creatinina (em mg/L) e dividindo-se o resultado desta multiplicação pela concentração plasmática de creatinina (mg/L) (equação 1).

$$\text{RFG} = (U_x \cdot V) / P_x \quad (\text{equação 1})$$

Onde: RFG=ritmo de filtração glomerular; U_x=concentração urinária de x na urina; V= fluxo urinário; P_x=concentração de x no plasma.

A partir dos valores plasmáticos e urinários de Na^+ ou K^+ foi calculada a fração de excreção de Na^+ ou K^+ . A fração de excreção é a razão entre a quantidade excretada e filtrada da substância em questão. Para tanto, divide-se a carga excretada pela carga filtrada do composto. A carga excretada (em, mmoles/min ou mEq/min) é a quantidade do composto que foi excretada, por unidade de tempo. A carga excretada é obtida multiplicando-se o fluxo urinário (em ml/min) pela concentração urinária (mM ou mEq/L) de Na^+ ou K^+ . Carga filtrada (em mmoles/min ou mEq/min), por sua vez, é a quantidade do composto que é filtrada no glomérulo por unidade de tempo. A carga filtrada foi obtida multiplicando-se a concentração plasmática (mM ou mEq/L) de Na^+ ou K^+ pelo ritmo de filtração glomerular (este foi obtido a partir do *clearance* de creatinina, como exposto anteriormente).

O *clearance* osmolar, o volume de urina que contém os solutos numa concentração igual à do plasma (isosmótica ao plasma) (ou o volume de plasma que conteria todos os solutos excretados na urina por minuto) foi calculado pela equação 2:

$$\text{Cosm} = (\text{Uosm} \times \text{V}) / \text{Posm} \quad (\text{equação 2})$$

Onde: Cosm = *clearance* osmolar; Uosm = osmolaridade urinária; Posm = osmolaridade plasmática; V = fluxo urinário (mL/min).

Já o *clearance* de água livre, o volume de água livre de solutos excretado por unidade de tempo (quantidade de água livre de solutos que torna a urina diluída) foi calculado pela equação 3:

$$\text{CH}_2\text{O} = \text{V} - \text{Cosm} \quad (\text{equação 3})$$

Onde: Cosm = *clearance* osmolar; CH_2O = *clearance* de água livre; V = fluxo urinário (mL/min).

A creatinina urinária e sérica foi mensurada para obtenção dos dados relacionados mencionados, pelo método de Jaffé, a partir da leitura da absorção de comprimento de onda com leitura a 520 nm em um espectrofotômetro pelo método cinético (TP-analyser, São Paulo, Brasil). A mensuração de Na^+ e K^+ urinário e sérico foi realizada em um Analisador de

eletrólitos AVL 9180 (Roche, São Paulo, Brasil). A osmolaridade foi mensurada no osmômetro por pressão de vapor VAPRO 5520, Wescor.

4.5 Avaliação da excreção renal de sódio: Medida de *Clearance* e Carga Excretada de Na^+ pelo método gravimétrico

Para determinar o efeito do Sildenafil, da Pravastatina (ou ambos) sobre a função renal de ratos Wistar, os mesmos submetidos a infusão com estes fármacos diretamente pela jugular por trinta minutos com solução CTRL, solução contendo Citrato de Sildenafil (0,5 mg/Kg/min), Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) ou os dois fármacos simultaneamente para obtenção das amostras de urina e determinação do fluxo urinário, do ritmo de filtração glomerular e da carga excretada de Na^+ .

O volume urinário foi avaliado - através método gravimétrico -, pela diferença do peso do tubo antes e após a coleta da urina e o fluxo urinário foi estimado dividindo-se o volume urinário pelo tempo de coleta corrigido pelo peso do animal. Os resultados foram expressos em $\mu\text{l}/\text{min}/\text{Kg}$.

A carga excretada de Na^+ representa a quantidade de sódio excretada na urina por unidade de tempo e foi calculada pela fórmula ($U_{\text{Na}} \times V$) (já apresentada no item anterior), sendo U_{Na} a concentração urinária de sódio e V o fluxo urinário. Os resultados foram expressos em $\text{mEq}/\text{min}/\text{Kg}$.

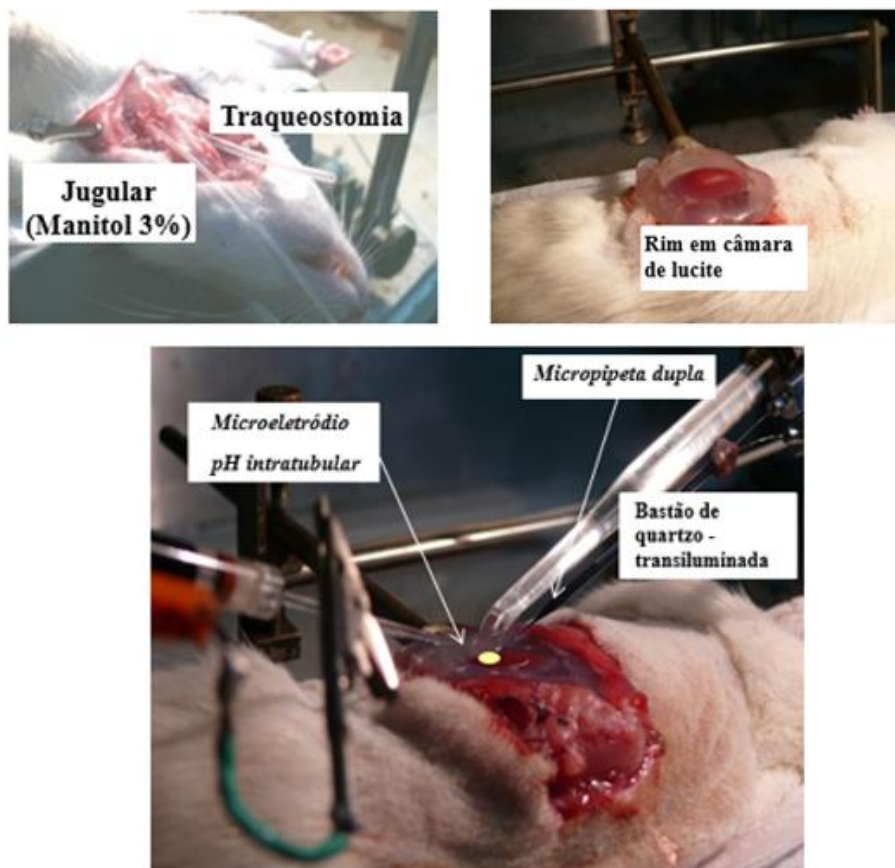
4.6 Microperfusão estacionária *in vivo*

A atividade do NHE3 foi avaliada pela capacidade de acidificação tubular, ou seja pela análise da velocidade de reabsorção tubular de bicarbonato (HCO_3^-) após a perfusão. Esta foi medida com auxílio de microeletrodo de resina sensível a H^+ .

Para o procedimento os ratos foram anestesiados com Quetamina (100 mg/ Kg de peso vivo) associada a Xilazina (10 mg/ Kg de peso vivo) e preparados cirurgicamente. Na gaiola de *Faraday* foram traqueostomizados e tiveram a jugular canulada para a infusão de uma

solução fisiológica com Manitol 3%, a 0,05 ml/min, por meio de bomba peristáltica (*Harvard Apparatus Compact Infusion*, MA, USA). O Manitol foi utilizado para diminuir a reabsorção de água e, desta forma, manter os túbulos renais mais evidentes. Os animais foram colocados em decúbito lateral e então o rim esquerdo foi exposto através de uma incisão para-lombar. O rim exposto foi preparado retirando toda a gordura que o envolvia e então foi fixado e imobilizado com solução de Ringer Agar 5% *in situ* em um suporte para rim de Lucite (Figura 9). Um fio de prata cloretado Ag/AgCl introduzido em tecido que corresponde ao compartimento extracelular do animal, foi utilizado como referência das medidas realizadas.

Figura 9 - Preparo cirúrgico de animais submetidos à microperfusão estacionária *in vivo*



Micropipetas e microeletródio

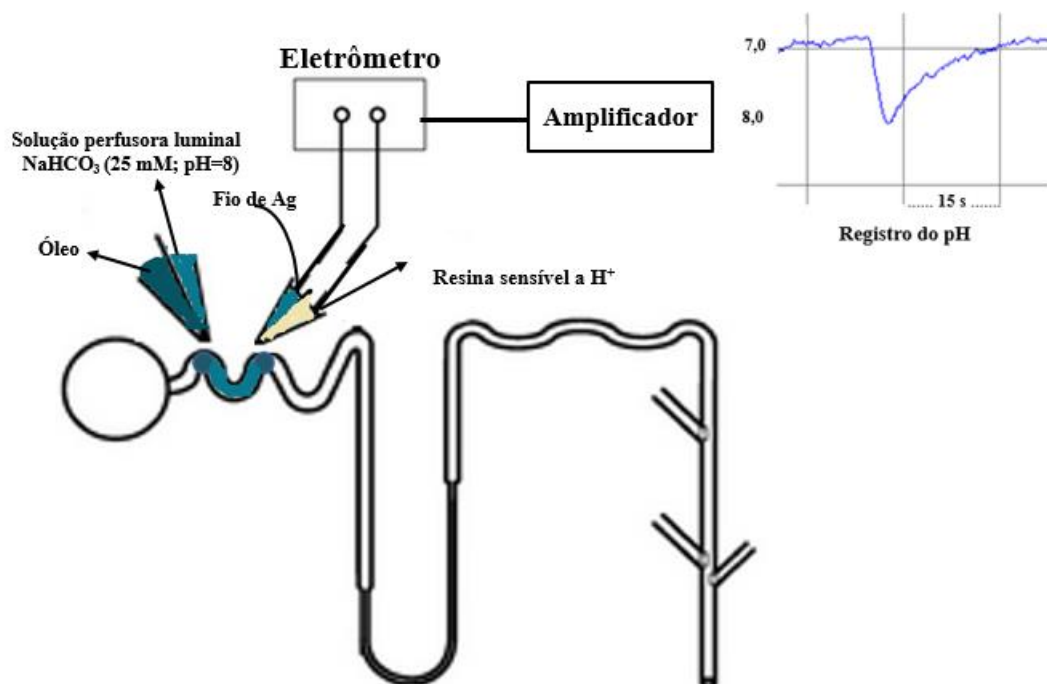
Para realização dos experimentos, como mostrado na figura 9, utilizamos pipetas (de ponta dupla, feitas a partir de capilares duplos) e microeletrodos (de ponta dupla, com um ramo mais grosso) que eram estirados por um estirador com alça de temperatura variável (*Narishige Scientific instrument Lab, Tokyo, Japan*). O ramo mais grosso do microeletrodo era previamente silanizado com vapor de Hexametildisilano que, ao entrar em contato com a parede de vidro, deixava a mesma hidrofóbica.

Para a medida do pH intratubular utilizamos um ramo do microeletrodo contendo resina neutra de troca iônica sensível a H^+ (*Fluka Chemika, Buchs, Suíça*), sendo o restante deste ramo preenchido com solução de complemento [130 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 10 mM NaH_2PO_4 ; pH 7,0]. Este ramo foi ligado ao canal A de um voltímetro - com resistência de 10^{19} mOhm, o qual possuía amplificação variável e dois canais (*WPI, Sarasota, FL, USA*). O outro ramo do microeletrodo era menor e continha KCl 1M corada com verde FDC (solução eletrolítica, de referência) e ligado ao canal B do voltímetro por um fio de Ag cloretado. Para a confecção das micropipetas duplas utilizamos capilares duplos tipo *Theta (R & D. Optical Systems, Inc., Spencerville, MD, USA)*. Um dos ramos da foi preenchido com óleo de rícino corado com *Sudan black*; o outro ramo continha a solução microperfusora tubular luminal [10 mM NaCl; 25 mM $NaHCO_3$; 5 mM KCl; 1mM $CaCl_2$; 1,2 mM $MgSO_4$; Rafinose 0,06 g/mL] corada com 0,05% de FDB *blue*. A Rafinose foi utilizado para ajustar a osmolaridade da solução perfusora a 300 mOsm/Kg e, desta forma, minimizar a reabsorção do fluido tubular durante a perfusão. A micropipeta e o microeletrodo confeccionados foram colocados em micromanipuladores mecânicos (*Leitz, Wetzlar*).

Após este prévio preparo, foram iniciados os experimentos de microperfusão estacionária *in vivo*, realizados da forma descrita anteriormente (Malnic, Mello-Aires, 1971; Lessa et al., 2009). Com o auxílio de uma micropipeta dupla, um túbulo proximal foi puncionado. Um ramo da micropipeta foi utilizado para injetar solução de perfusão corada com verde-FDC, e o outro para injetar óleo de rícino corado com *Sudan-black*, utilizado para bloquear as colunas de fluido injetadas no lúmen (Figura 9).

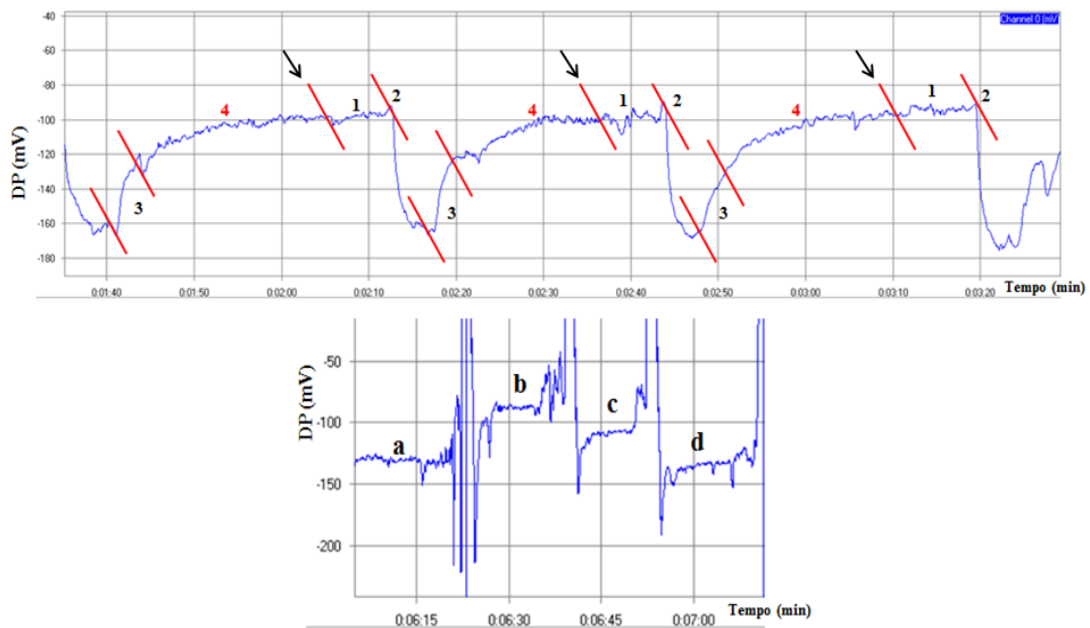
No mesmo néfron, reconhecido pela perfusão com solução corada (com corante FDC verde) foi implantado um microeletrodo de dois ramos, assimétrico, para a medida de pH. Este microeletrodo foi usado para medir o pH intratubular (Figura 10). Para se obter um valor de pH através da medida do potencial do microeletrodo fazíamos calibrações do mesmo, ainda na superfície renal, com soluções de 120 mM de cloreto de sódio e 20 mM de fosfato de sódio ajustadas para três valores diferentes de pH 6,5; 7,0 e 8,0 por meio da adição de soluções de NaOH ou HCl 0,1N. Foi possível, então, calcular o quanto o potencial medido no eletrômetro varia para cada unidade de pH (Figura 11).

Figura 10 - Desenho esquemático do sistema de microperfusão estacionária in vivo em túbulo proximal cortical (segmento S2)



Microeletrodo duplo aparece no esquema à direita: em amarelo está representada a ponta que contém resina sensível à H⁺ e solução de complemento (ligado ao canal A do eletrômetro); na outra ponta foi colocada a solução de referência KCl 1M corada por verde FDC e ligada a um fio de prata cloretado (Ag/AgCl) (ligado ao canal B do eletrômetro). À esquerda está representada uma pipeta *Theta* de ponta dupla: em um dos ramos havia solução perfusora luminal (verde claro); na outra ponta havia óleo de rícino corado (verde escuro).

Figura 11 - Registro representativo de curvas de microperfusão estacionária *in vivo* e de curvas de calibração



Acima estão representadas curvas de microperfusão tubular estacionária *in vivo*: 1) potencial registrado durante o pH intratubular inicial (imediatamente antes da perfusão tubular com a solução de trabalho); 2) perfusão da solução de trabalho e alcalinização do pH intratubular; 3) fase de recuperação do pH (acidificação) depende de CO₂, descartada para os cálculos; 4) fase de recuperação do pH intratubular depende da atividade de transportadores luminiais de H⁺; seta pH estacionário que marca o final da curva de perfusão. Abaixo estão representados os potenciais de calibração obtidos entre os ramos do microeletrodo ao perfundir a superfície renal com soluções de pHs conhecidos: a) potencial com o eletrodo na superfície renal; b) potencial obtido pela perfusão da superfície renal com solução de pH 6,5; c) potencial obtido pela perfusão da superfície renal com solução de pH 7,0; d) potencial obtido pela perfusão da superfície renal com solução de pH 8,0.

Após a calibração inicia-se a aquisição da DDP de curvas experimentais obtidas a partir da perfusão intratubular com solução perfusora inicialmente contendo 25 mM de HCO₃⁻ (pH₀), de pH alcalino, que é reduzido até um valor estacionário da DDP, correspondente ao nível mais ácido do pH luminal (Figura 11). O valor de pH obtido desta maneira foi utilizado para determinar a concentração de bicarbonato na solução tal como demonstra a equação de Henderson-Hasselbalch, considerando a pCO₂ tubular igual à do sangue arterial (Malnic, 1980; Mello-Aires et al., 1990) (Figura 11).

A taxa de acidificação tubular foi expressa como a meia vida da redução da concentração de íon bicarbonato (HCO_3^-) ao nível estacionário ($t_{1/2}$). Admitindo que a acidificação da solução luminal ocorra de forma exponencial, o nível de reabsorção de HCO_3^- ($J_{\text{HCO}_3^-}$) foi calculado através da equação 4:

$$J_{\text{HCO}_3^-} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} (\text{HCO}_3^-_o - \text{HCO}_3^-_s) * \frac{r}{2} \quad (\text{equação 4})$$

Onde $t_{1/2}$ é a meia vida da reabsorção de bicarbonato, r é o raio do túbulo, e $[\text{HCO}_3^-]_o$ e $[\text{HCO}_3^-]_s$ são as concentrações de HCO_3^- injetada e HCO_3^- a nível estacionário, respectivamente. Os fluxos de HCO_3^- assim obtidos foram dados por cm^2 de área de epitélio. Em cada rato foram perfundidos de 1 a 4 túbulos proximais; desta maneira, o valor de “N” indicado para as médias obtidas corresponde ao número de túbulos perfundidos. A aquisição de dados foi feita a cada 0,5 s pelo sistema de aquisição de dados da *Lynx*, São Paulo, sendo os dados depois exportados para o *Excell* (*Microsoft, USA*). No *Excell*, a partir dos valores tubulares em mV e de calibração obtidos para cada eletrodo, os valores de pH, HCO_3^- , $t_{1/2}$ e $J_{\text{HCO}_3^-}$ foram calculados por um programa *VisualBasic* e os valores de $t_{1/2}$, $J_{\text{HCO}_3^-}$, HCO_3^- estacionário e pH estacionário foram analisados estatisticamente para determinar a significância das diferenças entre os grupos experimentais.

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como valores médios com seus erros padrão ($m \pm E.P.$). Para analisar possíveis diferenças entre o grupo controle e grupos com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos realizou-se test t não paramétrico ou por análise de variância de uma via (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de contraste de Tukey (experimentos de microperfusão, onde comparamos, por exemplo, o efeito do S3226 sobre o fluxo de bicarbonato com Sildenafil). Foram considerados significativos valores $P < 0.05$.

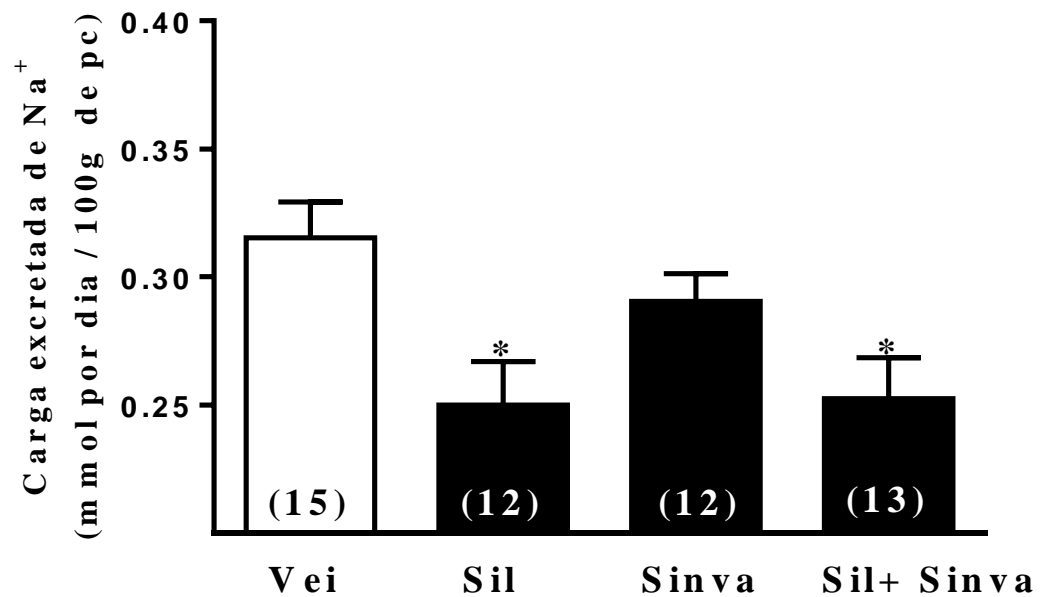
5 RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento por 24 horas com Sildenafil e Sinvastatina sobre a função renal de ratos Wistar

Para determinar o efeito do Sildenafil, da Sinvastatina (ou ambos) sobre a função renal de ratos Wistar, os mesmos foram tratados por 24 horas com Veículo (1% de etanol e 4% de Solutio HS 15), Citrato de Sildenafil (20 mg/Kg/dia), Sinvastatina (7mg /Kg/dia) ou os dois fármacos simultaneamente em água de beber e colocados em gaiola metabólica para obtenção das amostras de urina e determinação do consumo de ração e ingestão de água. Os tratamentos foram realizados após 48 horas de adaptação. Os valores médios \pm erro padrão dos parâmetros de função renal obtidos – e classicamente discutidos na literatura –, estão apresentados na Tabela 1.

A excreção de Na^+ (mmol por dia/100g de peso corpóreo) diminuiu no grupo tratado com Citrato de Sildenafil ou com os dois fármacos administrados de forma concomitante, quando comparado com o veículo: $0,31 \pm 0,01$ (N=15), Veículo *vs* $0,25 \pm 0,02$ (N=12), com Sildenafil ($p < 0,05$); *vs* $0,25 \pm 0,02$ (N=13), com Sildenafil e Sinvastatina ($p < 0,05$) (Figura 12).

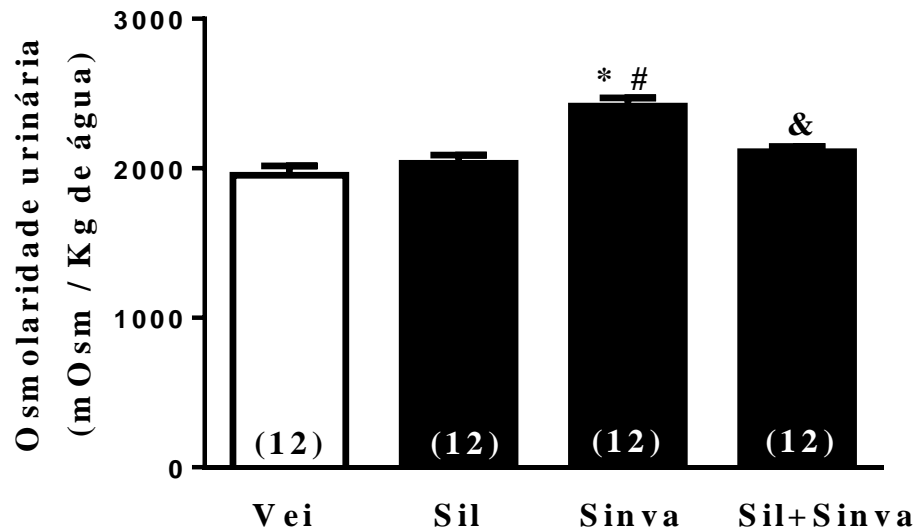
Figura 12 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil ou Sildenafil + Sinvastatina diminui a carga excretada de Na^+



Amostras de urina de animais Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. A excreção diária de Na^+ diminuiu frente ao tratamento com Sildenafil (20 mg/Kg/dia) ou Sildenafil (20 mg/Kg/dia) associado com Sinvastatina (7 mg/Kg/dia); porém, não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina. pc= peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs Vei; n=12-15.

A osmolaridade urinária (mOsm/Kg de água) aumentou no grupo tratado com Sinvastatina: $1954 \pm 63,18$ (N=12), Veículo vs $2417 \pm 55,79$ (N=12), com Sinvastatina ($p < 0,05$) (Figura 13). Embora a osmolaridade urinária tenha aumentado, o que indica que há mais solutos osmoticamente ativos na urina dos animais tratados com Sinvastatina, o *clearance* osmolar e o *clearance* de água não sofreram alterações significativas pelo tratamento com os fármacos por 24 horas.

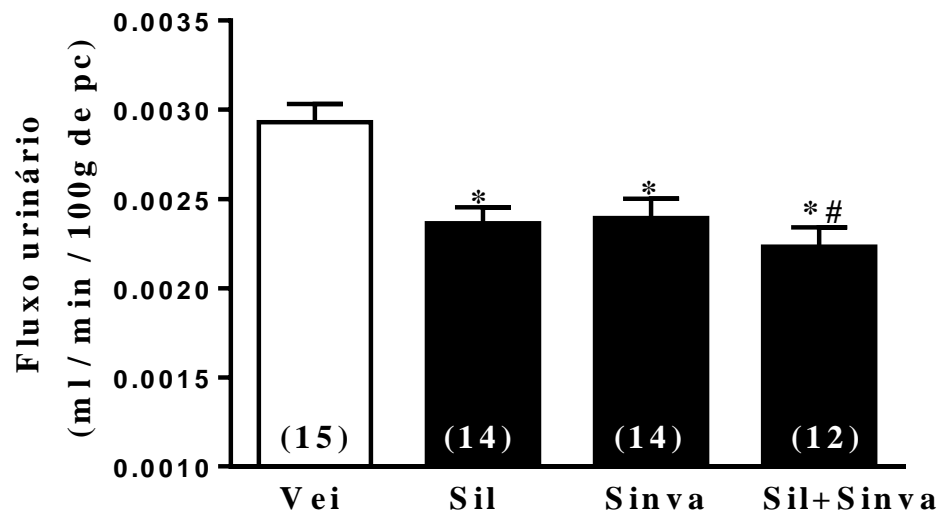
Figura 13 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sinvastatina aumentou a osmolaridade urinária.



Amostras de urina de animais que receberam Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. A osmolaridade urinária não se alterou pelo tratamento com Sildenafil (20mg/Kg/dia) ou Sildenafil (20mg/Kg/dia) + Sinvastatina (7mg/Kg/dia). * $p < 0,05$ vs Veículo; # $p < 0,05$ vs Sildenafil; & $p < 0,05$ vs Sinvastatina; $n = 12$.

Quanto ao Fluxo urinário (ml/min/ 100g de peso corpóreo), a administração de Sildenafil, Sinvastatina ou dos dois fármacos diminuiu o mesmo: $0,003 \pm 0,0001$ (N=15), Veículo vs $0,002 \pm 0,0001$ (N=14), com Sildenafil ($p < 0,05$); vs $0,002 \pm 0,0001$ (N=14), com Sinvastatina ($p < 0,05$); vs $0,002 \pm 0,0001$ (N=12), com Sildenafil e Sinvastatina ($p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil, Sinvastatina ou Sildenafil+Sinvastatina diminuiu o fluxo urinário



Amostras de urina de animais Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. O fluxo urinário não se alterou pelo tratamento com Sildenafil (20mg/Kg/dia). pc=peso corpóreo; *p<0,05 vs Veículo; # p<0,05 vs Sildenafil; n=12-15.

Os demais parâmetros urinários (*clearance* de creatinina, excreção de K⁺, proteína, fração de excreção de Na⁺ e K⁺, consumo de água e ração) não foram alterados pelo tratamento com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios dos parâmetros de função renal de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente

Parâmetro	Veículo	Sildenafil	Sinvastatina	Sildenafil +Sinvastatina
<i>Clearance</i> de Creatinina (ml*min ⁻¹)	0,44 ± 0,02 (N=16)	0,43 ± 0,02 (N=17)	0,47 ± 0,03 (N=17)	0,42 ± 0,03 (N=15)

¹ /100g de peso corpóreo)				
Excreção de Na ⁺ (mmol por dia/100g de peso corpóreo)	0,31 ± 0,01 (N=15)	0,25 ± 0,02 * (N=12)	0,29 ± 0,01 (N=12)	0,25 ± 0,02* (N=13)
Excreção de K ⁺ (mmol por dia/100g de peso corpóreo)	0,84 ± 0,07 (N=12)	0,94 ± 0,06 (N=14)	0,96 ± 0,08 (N=14)	0,86 ± 0,07 (N=12)
Fração de excreção de Na ⁺ (% da carga filtrada)	0,45 ± 0,02 (N=14)	0,48 ± 0,02 (N=12)	0,47 ± 0,03 (N=13)	0,46 ± 0,03 (N=12)
Fração de excreção de K ⁺ (% da carga filtrada)	3,70 ± 0,04 (N=12)	4,53 ± 0,03 (N=12)	4,40 ± 0,05 (N=12)	4,72 ± 0,05 (N=12)
Osmolaridade e urinária (mOsm/Kg de água)	1954 ± 63,18 (N=12)	2033 ± 55,59 (N=12)	2417 ± 55,79 * # (N=12)	2111 ± 34,45 & (N=12)

<i>Clearance Osmolar</i> (mL*min ⁻¹ 100g de pc)	0,018 ± 0,0007 (N=10)	0,019 ± 0,0009 (N=12)	0,022 ± 0,0018 (N=12)	0,019 ± 0,001 (N=12)
<i>Clearance de água livre</i> (mL*min ⁻¹ 100g de pc)	-0,015 ± 0,0006 (N=10)	-0,017 ± 0,0008 (N=12)	-0,019 ± 0,0015 (N=12)	-0,016 ± 0,0009 (N=12)
<i>Excreção de proteína</i> (mmol por dia/100g de peso corpóreo)	5,30x10 ⁻⁵ ± 3,00x10 ⁻⁶ ⁶ (N=12)	6,05x10 ⁻⁵ ± 4,52x10 ⁻⁶ ⁶ (N=12)	5,50x10 ⁻⁵ ± 2,34x10 ⁻⁶ (N=12)	5,57x10 ⁻⁵ ± 4,02x10 ⁻⁶ (N=15)
<i>Fluxo urinário</i> (ml/min/ 100g de peso corpóreo)	0,003 ± 0,0001 (N=15)	0,002 ± 0,0001 (N=14)*	0,002 ± 0,0001 (N=14) *	0,002 ± 0,0001 (N=12) * #
<i>Consumo de ração</i> (g por dia/ 100g de peso corpóreo)	5,51 ± 0,31 (N=16)	5,53 ± 0,40 (N=12)	6,20 ± 0,24 (N=12)	5,27 ± 0,25 (N=12)
<i>Consumo de água</i>	8,51 ± 0,41	8,76 ± 0,50	7,93 ± 0,50	8,19 ± 0,62

(ml por dia/ 100g de peso corpóreo)	(N=13)	(N=12)	(N=12)	(N=12)
---	--------	--------	--------	--------

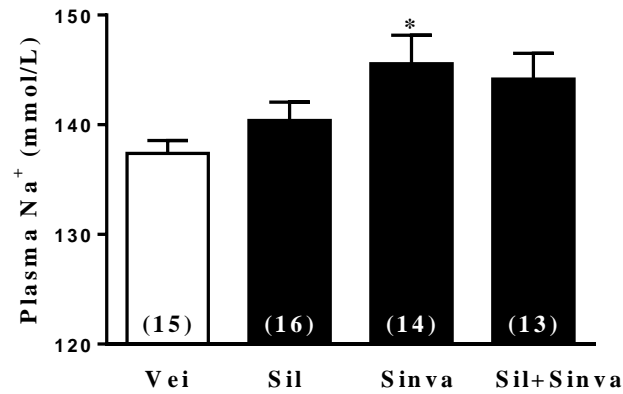
Valores médios \pm erro padrão. N=número de amostras de urinas analisadas. Veículo, 1% de etanol e 4% de Solutol; Citrato de Sildenafil, 20 mg/Kg/dia; Sinvastatina 7 mg/Kg/dia. * $p<0,05$ vs Veículo; # $p<0,05$ vs Sildenafil; & $p<0,05$ vs Sinvastatina.

Os valores médios \pm erro padrão dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de animais tratados por 24 horas com Veículo (1% de etanol e 4% de Solutol), Citrato de Sildenafil (20 mg/Kg/dia), Sinvastatina (7 mg/Kg/dia) ou com os dois fármacos estão apresentados na Tabela 2.

O Na^+ plasmático (mmol/L) aumentou no grupo tratado por Sinvastatina quando comparado com o Veículo: $137,4 \pm 1,16$ (N=15), Veículo vs $145,6 \pm 2,59$ (N=14), com Sinvastatina ($p<0,05$) (figura 15). Por sua vez, o K^+ plasmático (mmol /L) caiu frente à administração de Sildenafil por 24 horas: $5,49 \pm 0,28$ (N=14), Veículo vs $4,49 \pm 0,11$ (N=15), com Sildenafil ($p<0,05$) (figura 16). Já o Hematócrito, parâmetro que relaciona o volume de células sanguíneas vermelhas pelo volume de sangue total, caiu no grupo tratado com Sildenafil: $50,48 \pm 1,31$ (N=12), Veículo vs $45,53 \pm 0,81$ (N=12), com Sildenafil ($p<0,05$). (figura 17).

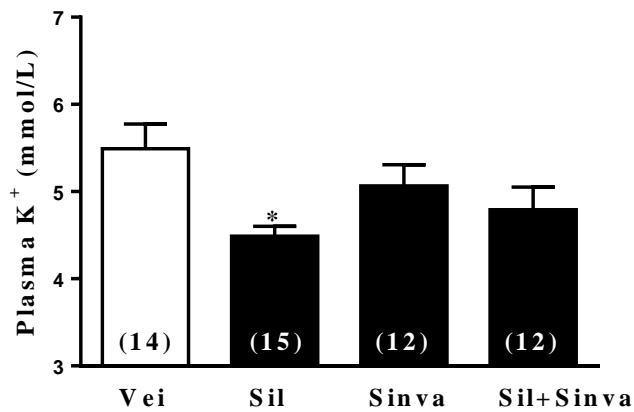
Os demais parâmetros plasmáticos (creatinina, osmolaridade e proteína total) não foram alterados pelo tratamento com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos, como apresentado na Tabela 2.

Figura 15 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sinvastatina aumentou o Na^+ plasmático



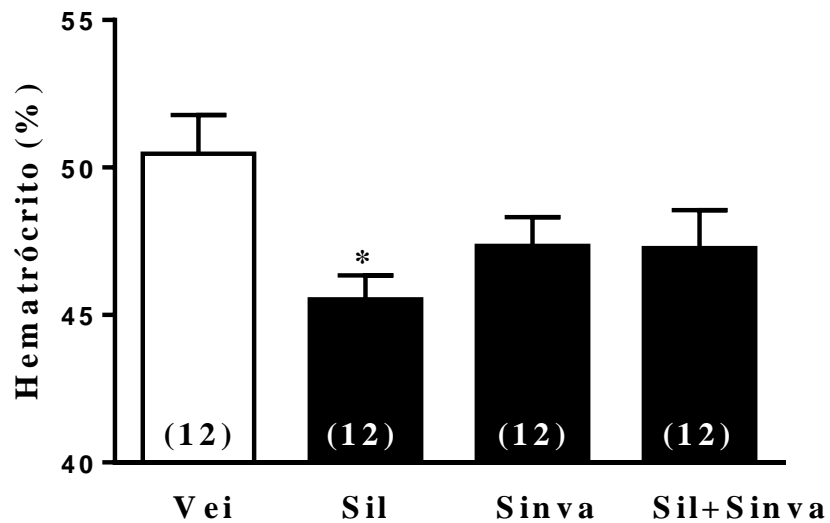
O Na^+ plasmático não se alterou pelo tratamento com Sildenafil (20 mg/Kg/dia) ou Sildenafil (20 mg/Kg/dia) +Sinvastatina (7 mg/Kg/dia). * $p < 0,05$ vs Veículo; n=12-16.

Figura 16 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil diminuiu o K^+ plasmático



O K^+ plasmático não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina (7 mg/Kg/dia) ou Sildenafil (20 mg/Kg/dia) +Sinvastatina (7 mg/Kg/dia). * $p < 0,05$ vs Veículo; n=12-15.

Figura 17 - O tratamento de ratos Wistar durante 24 horas com Sildenafil diminuiu o hematócrito



O hematócrito não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina (7 mg/Kg/dia) ou Sildenafil (20 mg/Kg/dia) +Sinvastatina (7 mg/Kg/dia). * $p < 0,05$ vs Veículo; $n = 12$.

Tabela 2 – Valores médios dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente.

Parâmetro	Veículo	Sildenafil	Sinvastatina	Sildenafil+ Sinvastatina
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,70 ± 0,02 (N=13)	0,69 ± 0,01* (N=12)	0,69 ± 0,02 (N=12)	0,72 ± 0,01 (N=14)
Na ⁺ no	137,4 ± 1,16	140,4 ± 1,69	145,6 ± 2,59*	144,2 ±

plasma (mmol/L)	(N=15)	(N=16)	(N=14)	2,36 (N=13)
K ⁺ no plasma (mmol /L)	5,49 ± 0,28 (N=14)	4,49 ± 0,11* (N=15)	5,07 ± 0,24 (N=12)	4,79 ± 0,26 (N=12)
Hematócrito (%)	50,48 ± 1,31 (N=12)	45,53 ± 0,81* (N=12)	47,34 ± 0,98 (N=12)	47,27 ± 1,28 (N=12)
Osmolaridad e plasmática (mOsmol /Kg de água)	295,2 ± 3,17 (N=13)	290,3 ± 3,99 (N=16)	295,1 ± 3,77 (N=13)	294,6 ± 2,39 (N=14)
Proteína total plasmática (g/dL)	6,14 ± 0,15 (N=12)	6,35 ± 0,17 (N=13)	6,37 ± 0,16 (N=12)	6,42 ± 0,26 (N=12)

Valores médios ± erro padrão. N=número de amostras de urinas analisadas. Veículo, 1% de etanol e 4% de Solutol; Citrato de Sildenafil, 20 mg/Kg/dia; Sinvastatina 7 mg/Kg/dia. * p<0,05 vs Veículo.

5.2 Efeito do tratamento por 24 horas com Sildenafil e Sinvastatina sobre a função renal de ratos Wistar submetidos à 24 horas de restrição hídrica

A funcionalidade do NHE3 – e de outros transportadores renais envolvidos com o manejo de Na⁺ - podem estar envolvidos na natriurese ou reabsorção de Na⁺ e água promovidos pelos fármacos Sildenafil e Sinvastatina, respectivamente, e poderiam justificar as diferenças observadas durante a administração das mesmas em ratos Wistar. Com os experimentos de função renal, obtivemos resultados que contrariam os obtidos com

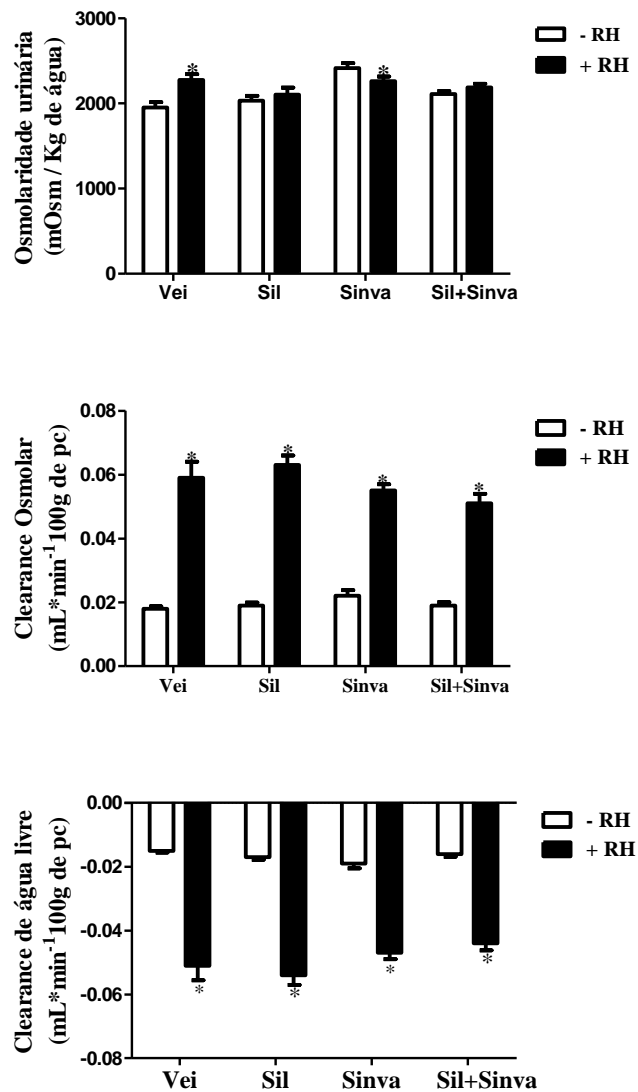
microperfusão tubular estacionária. Então, levantamos a possibilidade de submeter os animais à restrição hídrica.

A ideia da realização desta manobra se deu porque os fármacos podem atuar sobre a AQ2 no túbulo distal de forma independente do hormônio anti-diurético (ADH). Assim, a restrição hídrica - que foi usada apenas como manobra para aumentar as concentrações de ADH - forneceria dados sobre se a capacidade de reter água com aumento de ADH seria maior, igual ou menor que a controle nos grupos tratados com estes dois fármacos, uma vez que ambos aumentam a expressão de AQ2 na membrana apical do ducto coletor/túbulo distal. O objetivo não foi estudar a restrição de água e seu efeito sobre a função renal, mas investigar a ação destes fármacos na capacidade de concentrar urina.

Para determinar o efeito do Sildenafil, da Simvastatina (ou ambos) na função renal, ratos Wistar foram adaptados por dois dias e tratados (através de gavagem duas vezes ao dia) por 24 horas com Veículo (1% de etanol e 4% de Solutol), Citrato de Sildenafil (20 mg/Kg/dia), Simvastatina (7 mg/Kg/dia) ou os dois fármacos simultaneamente, submetidos à restrição hídrica - sendo oferecido aos animais 30% do que normalmente eles ingerem de água - e colocados em gaiola metabólica para obtenção das amostras de urina e determinação do consumo de ração e ingestão de água. Os valores médios \pm erro padrão dos parâmetros de função renal obtidos - e classicamente discutidos na literatura -, estão apresentados na Tabela 3.

Os animais tratados e submetidos à restrição hídrica (RH) apresentaram alterações da osmolaridade urinária quando comparado com os grupos que receberam apenas tratamento. Além disso, o *clearance* osmolar também aumentou e o *clearance* de água livre ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} / 100\text{g}$ de peso corpóreo) ficou mais negativo no grupo RH (Figura 18 e valores na Tabela 3). Estes dados indicam que a manobra de restrição hídrica - que foi usada apenas como manobra para aumentar as concentrações de ADH - foi eficiente e que o tratamento com os fármacos foi efetivo em sua capacidade de concentrar a urina. Além disso, o Sildenafil foi o fármaco que apresentou o *clearance* de água livre mais negativo, indicando que este medicamento foi capaz de aumentar mais o ADH do que a Simvastatina, produzindo uma urina mais concentrada.

Figura 18 - Ratos Wistar submetidos à restrição hídrica durante 24 horas apresentaram aumento de osmolaridade urinária, aumento do clearance osmolar e um clearance de água livre mais negativo

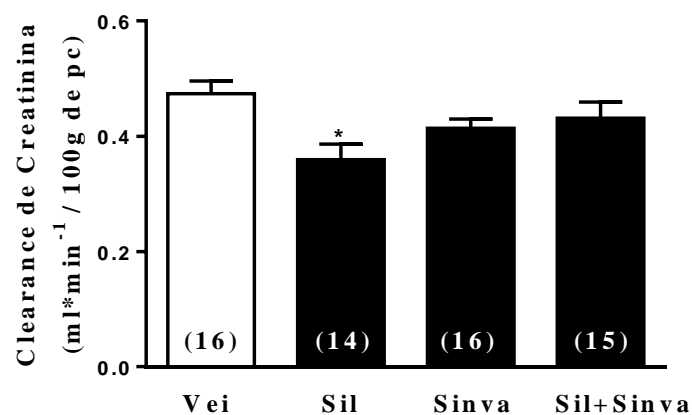


Amostras de urina de animais Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. pc=peso corpóreo; *p<0,05 vs tratados - RH; n=10-15.

O *clearance* de creatinina (ritmo de filtração glomerular) (ml*min⁻¹/100g de peso corpóreo) diminuiu no grupo tratado com Sildenafil: $0,47 \pm 0,02$ (N=16), Veículo vs $0,36 \pm 0,02$ (N=14), com Sildenafil (Figura 19). O Fluxo urinário ((ml/min)/ 100 g de peso corpóreo)

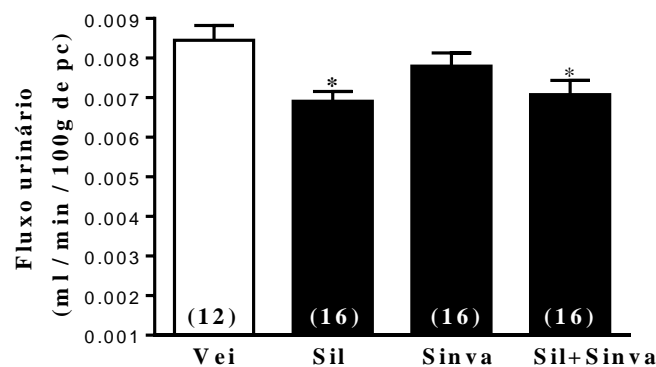
frente a administração de Sildenafil ou dos dois fármacos diminuiu de forma significativa: $0,008 \pm 0,0004$ (N=14), Veículo vs $0,006 \pm 0,0002$ (N=14), com Sildenafil ($p < 0,05$); vs $0,007 \pm 0,0003$ (N=14), com Sildenafil e Sinvastatina ($p < 0,05$) (Figura 20).

Figura 19 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil diminuiu o ritmo de filtração glomerular (clearance de creatinina)



Amostras de urina de animais Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. O RFG não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina ou Sildenafil+Sinvastatina. pc=peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs Veículo; n=14-16.

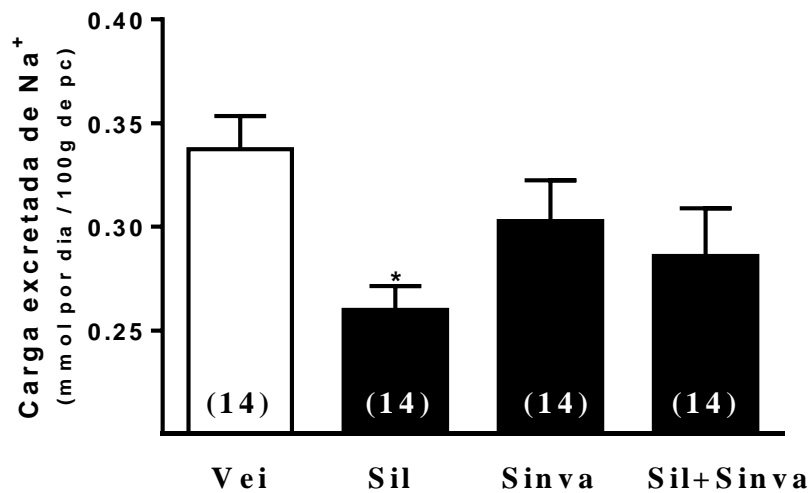
Figura 20 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil ou Sildenafil+Sinvastatina diminuiu o fluxo urinário



Amostras de urina de animais Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. O fluxo não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina. pc=peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs Veículo; n=12-16

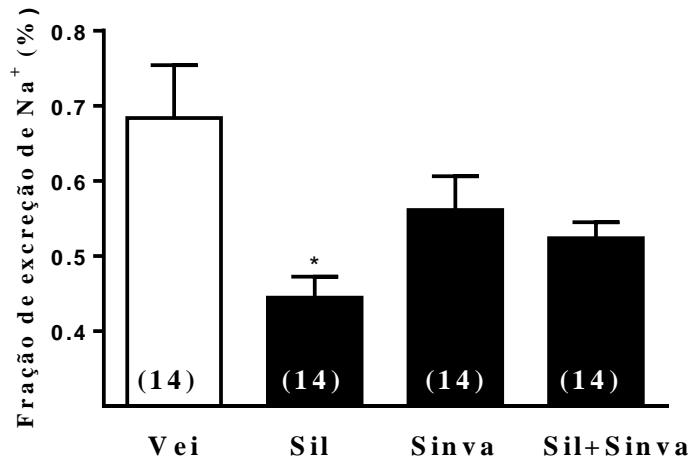
A excreção de Na^+ (mmol por dia/100g de peso corpóreo) diminuiu no grupo tratado com Citrato de Sildenafil ou as duas drogas administradas de forma concomitante, quando comparado com o veículo: $0,34 \pm 0,01$ (N=14), Veículo vs $0,26 \pm 0,02$ (N=14), com Sildenafil ($p < 0,05$) (Figura 21). A fração de excreção de Na^+ (%) também diminuiu no grupo tratado com Sildenafil: $0,68 \pm 0,07$ (N=14), com veículo vs $0,44 \pm 0,03$ (N=14), com Sildenafil ($p < 0,05$) (Figura 22).

Figura 21 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil diminuiu a carga excretada de Na^+



Amostras de urina de animais Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. A CE de Na^+ não se alterou pelo tratamento com Simvastatina ou Sildenafil+Simvastatina. pc=peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs Veículo; n=14.

Figura 22 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil diminuiu a fração de excreção de Na^+ (% da carga filtrada)



Amostras de urina de animais Veículo e tratados foram obtidas em gaiolas metabólicas. A FE de Na^+ não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina ou Sildenafil+Sinvastatina. pc=peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs Veículo; $n=14$.

Os demais parâmetros urinários (excreção e fração de excreção de K^+ , excreção de proteína, osmolaridade urinária, consumo de ração) não foram alterados pela restrição hídrica e pelo tratamento com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos, como demonstrado na **tabela 3**.

Tabela 3 – Valores médios dos parâmetros de função renal de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente e restrição hídrica.

Parâmetro	Veículo	Sildenafil	Sinvastatina	Sildenafil +Sinvastatina
Clearance de Creatinina ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} / 100\text{g}$ de peso)	$0,47 \pm 0,02$ (N=16)	$0,36 \pm 0,02^*$ (N=14)	$0,41 \pm 0,01$ (N=16)	$0,43 \pm 0,03$ (N=15)

corpóreo)				
Excreção de Na ⁺ (mmol por dia/100g de peso corpóreo)	0,34 ± 0,01 (N=14)	0,26 ± 0,02* (N=14)	0,30 ± 0,02 (N=14)	0,28 ± 0,02 (N=14)
Excreção de K ⁺ (mmol por dia/100g de peso corpóreo)	0,94 ± 0,04 (N=14)	0,96 ± 0,03 (N=14)	0,97 ± 0,04 (N=14)	0,99 ± 0,06 (N=14)
Fração de excreção de Na ⁺ (% da carga filtrada)	0,68 ± 0,07 (N=14)	0,41 ± 0,03 (N=14)*	0,56 ± 0,04 (N=14)	0,52 ± 0,02 (N=14)
Fração de excreção de K ⁺ (% da carga filtrada)	4,50 ± 0,05 (N=14)	4,16 ± 0,04 (N=14)	5,21 ± 0,03 (N=14)	4,30 ± 0,02 (N=14)
Osmolaridade e urinária (mOsm/Kg de água)	2275±68,62 (N=15)	2103±83,73 (N=15)	2260±57,10 (N=15)	2189±41,34 (N=15)
Clearance	0,059±0,005	0,063±0,003	0,055±0,002	0,051±0,003

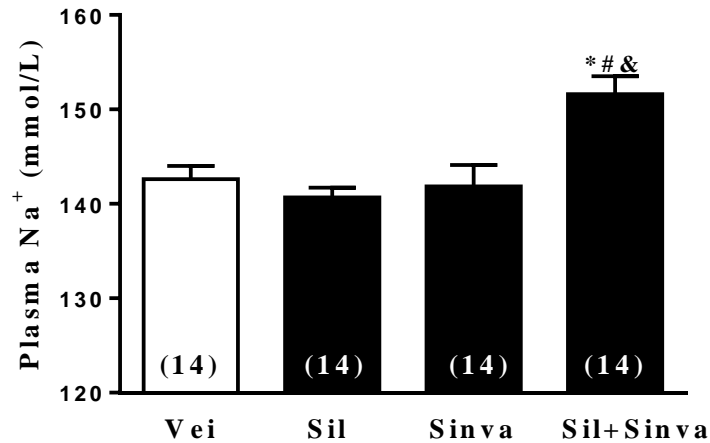
Osmolar (mL*min ⁻¹ 100g de pc)	(N=13)	(N=13)	(N=13)	(N=13)
Clearance de água livre(mL*min ⁻¹ 100g de pc)	-0,051 ± 0,0046 (N=13)	-0,054 ± 0,003 (N=13)	-0,047 ± 0,002 (N=13)	-0,044 ± 0,0022 (N=13)
Fluxo urinário (ml/min/ 100g de peso corpóreo)	0,008 ± 0,0004 (N=14)	0,006 ± 0,0002* (N=14)	0,008 ± 0,0003 (N=14)	0,007 ± 0,0003* (N=14)
Consumo de ração (g por dia/ 100g de peso corpóreo)	16,05 ± 0,58 (N=14)	15,41 ± 0,71 (N=14)	16,12 ± 0,58 (N=14)	14,29 ± 0,76 (N=14)

Valores médios ± erro padrão. N=número de amostras de urinas analisadas. Veículo, 1% de etanol e 4% de Solutol; Citrato de Sildenafil, 20 mg/Kg/dia; Sinvastatina 7 mg/Kg/dia. * p<0,05 vs Veículo; # p<0,05 vs Sinvastatina; & p<0,05 vs Sildenafil e Sinvastatina.

Os valores médios ± erro padrão dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de animais tratados por 24 horas com Veículo (1% de etanol e 4% de Solutol), Citrato de Sildenafil (20 mg/Kg/dia), Sinvastatina (7 mg/Kg/dia) ou com os dois fármacos - e submetidos à restrição hídrica – estão apresentados na Tabela 4.

O Na⁺ plasmático (mmol/L) aumentou no grupo tratado com Sildenafil e Sinvastatina quando comparado com o Veículo: 142,6 ± 1,40 (N=14), Veículo vs 151,6 ± 1,92 (N=14), com Sildenafil e Sinvastatina (p<0,05) (Figura 23).

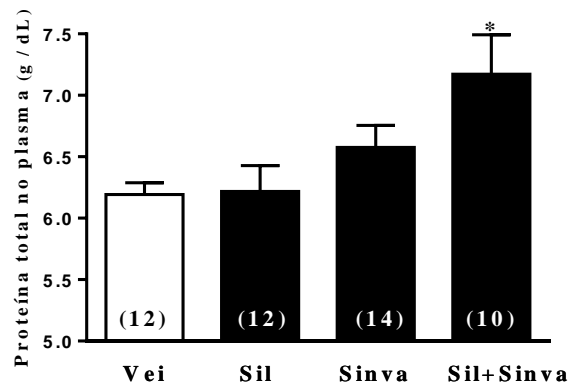
Figura 23 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil+Sinvastatina aumentou o Na^+ plasmático



A concentração plasmática de Na^+ não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina ou Sildenafil. * $p < 0,05$ vs Veículo; # $p < 0,05$ vs Sinvastatina, & $p < 0,05$ vs Sildenafil e Sinvastatina; $n = 14$.

Por sua vez, a proteína total no plasma (g/dL) também aumentou frente à administração dos dois fármacos de forma concomitante: $6,19 \pm 0,09$ (N=12), Veículo vs $7,17 \pm 0,32$ (N=10), com Sildenafil e Sinvastatina ($p < 0,05$) (Figura 24).

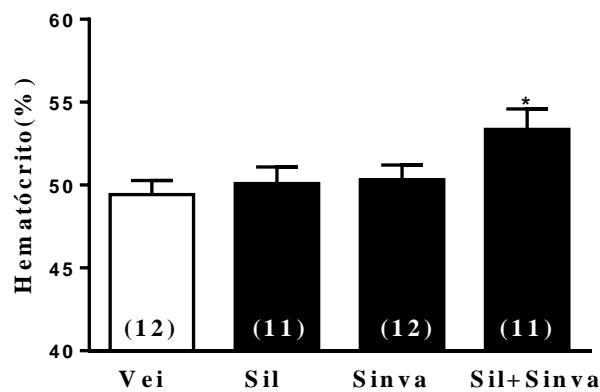
Figura 24 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas com Sildenafil+Sinvastatina, aumentou proteína total plasmática



A concentração PT plasmática não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina ou Sildenafil. * $p < 0,05$ vs Veículo; $n = 10-14$.

Já o Hematócrito (%), parâmetro que relaciona o volume de células sanguíneas vermelhas pelo volume de sangue total, aumentou no grupo tratado com os dois fármacos: $49,42 \pm 0,87$ (N=12), Veículo vs $53,36 \pm 1,28$ (N=11), com Sildenafil e Sinvastatina ($p < 0,05$). (Figura 25).

Figura 25 - O tratamento de ratos Wistar, submetidos à restrição hídrica durante 24 horas, com Sildenafil+Sinvastatina aumentou o hematócrito



O Htc não se alterou pelo tratamento com Sinvastatina ou Sildenafil. * $p < 0,05$ vs Veículo; n=11-12.

Os demais parâmetros plasmáticos (creatinina, osmolaridade e K^+) não foram alterados pelo tratamento com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos, como apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos Wistar após tratamento por 24 horas com Citrato de Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos simultaneamente e submetidos à restrição hídrica.

Parâmetro	Veículo	Sildenafil	Sinvastatina	Sildenafil+Sinvastatina
Creatinina plasmática (mg/dL)	$0,76 \pm 0,02$ (N=14)	$0,78 \pm 0,03$ (N=14)	$0,77 \pm 0,03$ (N=14)	$0,75 \pm 0,03$ (N=14)

Na ⁺ no plasma (mmol/L)	142,6 ± 1,40 (N=14)	140,7 ± 1,01 (N=14)	141,8 ± 2,26 (N=14)	151,6 ± 1,92*#& (N=14)
K ⁺ no plasma (mmol /L)	4,89 ± 0,22 (N=14)	4,37± 0,20 (N=14)	5,03 ± 0,87 (N=14)	5,34 ± 1,23* (N=14)
Hematócrito (%)	49,42 ± 0,87 (N=12)	50,09 ±1,00 (N=11)	47,34 ± 0,98 (N=12)	53,36 ± 1,28 (N=11)
Osmolaridad e plasmática (mOsmol /Kg de água)	292,3 ± 3,10 (N=14)	293,9 ± 2,44 (N=14)	295,9 ± 2,51 (N=14)	294,8 ± 2,38 (N=14)
Proteína total plasmática (g/dL)	6,19 ± 0,09 (N=12)	6,22 ± 0,21& (N=14)	6,58 ± 0,18 (N=14)	7,17 ± 0,32* (N=10)

Valores médios ± erro padrão. N=número de amostras de urinas analisadas. Veículo, 1% de etanol e 4% de Solutol; Citrato de Sildenafil, 20 mg/Kg/dia; Sinvastatina 7 mg/Kg/dia. * p<0,05 vs Veículo, #p<0,05 vs Sinvastatina, &p<0,05 vs Sildenafil e Sinvastatina.

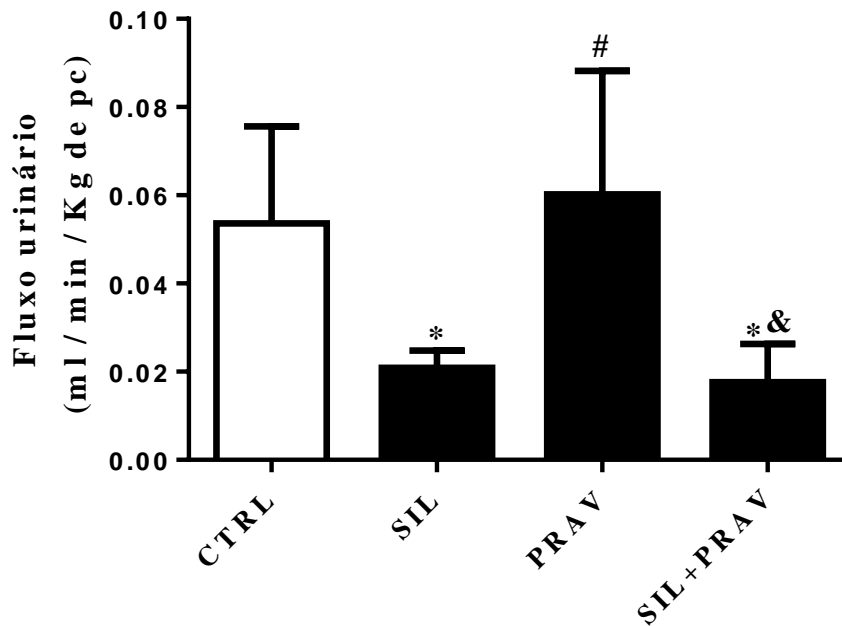
5.3 Efeito da infusão por 30 minutos com Sildenafil e Pravastatina sobre a função renal de ratos Wistar

Pelo fato de a Sinvastatina ser um pró-fármaco (inativo) - e nossos resultados terem sido diferentes do esperado -, optamos por testar o efeito da perfusão intraluminal com o fármaco Pravastatina 100 μ M sobre o JHCO_3^- em ratos Wistar. Em virtude dos achados com microperfusão tubular estacionária, decidimos investigar aspectos da função renal de ratos Wistar,

Para determinar o efeito do Sildenafil, da Pravastatina (ou ambos) sobre a função renal de ratos Wistar, os mesmos submetidos à infusão com estes fármacos diretamente pela jugular por trinta minutos com solução CTRL, solução contendo Citrato de Sildenafil (0,5 mg/Kg/min), Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) ou os dois fármacos simultaneamente para obtenção das amostras de urina e determinação do fluxo urinário, do ritmo de filtração glomerular e da carga excretada de Na^+ .

O fluxo urinário (ml/min/Kg de peso corpóreo) diminuiu no grupo tratado com Citrato de Sildenafil ou com os dois fármacos administrados de forma concomitante, quando comparado com o CTRL: $0,053 \pm 0,009$ (N=6), CTRL *vs* $0,025 \pm 0,001$ (N=8), com Sildenafil ($p < 0,05$); *vs* $0,02 \pm 0,003$ (N=8), com Sildenafil e Pravastatina ($p < 0,05$) (Figura 26).

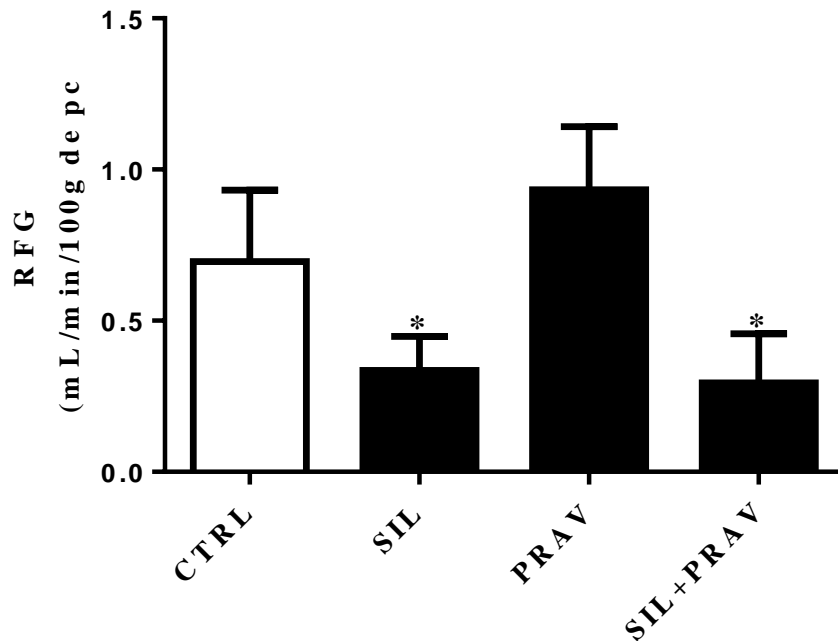
Figura 26 – A infusão pela jugular de ratos Wistar durante 30 minutos com Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) ou Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) + Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) diminui o fluxo urinário



Amostras de urina de animais CTRL e tratados foram obtidas pelo método gavimétrico. O fluxo urinário diminuiu frente ao tratamento com Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) ou Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) associado com Pravastatina (0,3 mg/Kg/min); porém, não se alterou pelo tratamento com Pravastatina. pc= peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs CTRL; & $p < 0,05$ vs Prav n=6-8.

O ritmo de filtração glomerular (ml/min/100g de peso corpóreo) diminuiu no grupo tratado com Citrato de Sildenafil ou com os dois fármacos administrados de forma concomitante, quando comparado com o CTRL: $0,696 \pm 0,097$ (N=6), CTRL vs $0,336 \pm 0,046$ (N=6), com Sildenafil ($p < 0,05$); vs $0,295 \pm 0,061$ (N=7), com Sildenafil e Pravastatina ($p < 0,05$) (Figura 27).

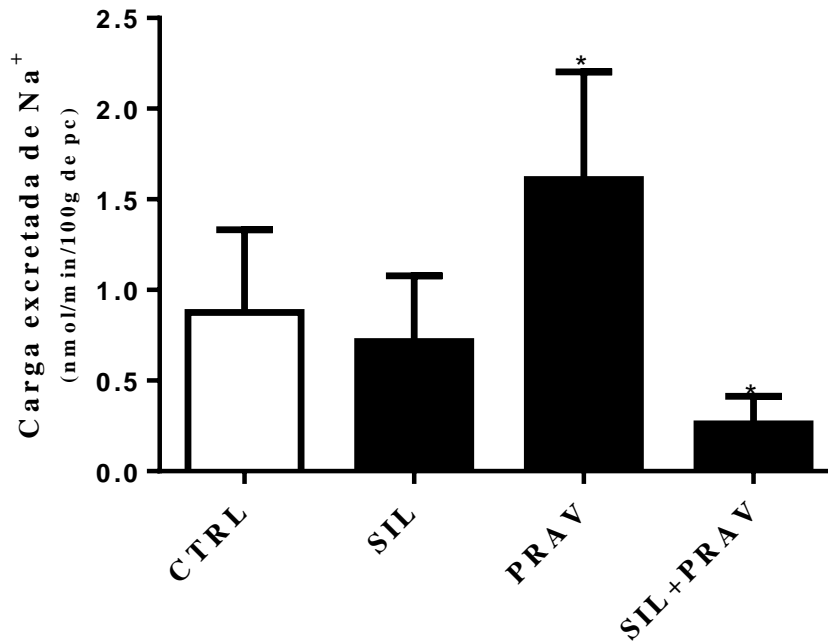
Figura 27 – A infusão pela jugular de ratos Wistar durante 30 minutos com Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) ou Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) + Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) diminui o ritmo de filtração glomerular



Amostras de urina de animais CTRL e tratados foram obtidas pelo método gavimétrico. O RFG diminuiu frente ao tratamento com Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) ou Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) associado com Pravastatina (0,3 mg/Kg/min); porém, não se alterou pelo tratamento com Pravastatina. pc= peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs CTRL; n=6-8.

A carga excretada de Na^+ (mmol/min/100g de peso corpóreo) aumentou no grupo tratado com Pravastatina, quando comparado com o CTRL: $0,877 \pm 0,172$ (N=7), CTRL vs $1,609 \pm 0,266$ (N=6), com Pravastatina ($p < 0,05$); vs $0,261 \pm 0,057$ (N=7), com Sildenafil e Pravastatina ($p < 0,05$) (Figura 28).

Figura 28 - A infusão pela jugular de ratos Wistar durante 30 minutos com Pravastatina (0,3 mg/Kg/min) aumentou a carga excretada de Na^+ e Sildenafil (0,5 mg/Kg/min) reverteu o efeito da Pravastatina (0,3 mg/Kg/min), diminuindo a carga excretada de Na^+



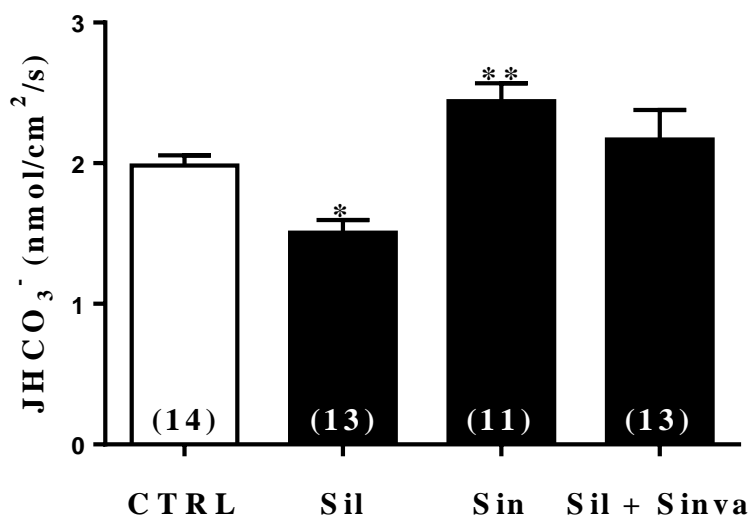
Amostras de urina de animais CTRL e tratados foram obtidas através do método gavimétrico. A excreção diária de Na^+ aumentou frente ao tratamento com Pravastatina (0,3 mg/Kg/min); o Sildenafil reverteu o efeito estimulatório da Pravastatina sobre a carga excretada de Na^+ . pc= peso corpóreo; * $p < 0,05$ vs CTRL; n=6-8.

5.4 Efeito da perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM e Sinvastatina 100 μM no JHCO_3^- no túbulo proximal de ratos Wistar

Com o intuito de determinar o efeito do Sildenafil e da Sinvastatina no transporte de bicarbonato de sódio do túbulo proximal, ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* como descrito nos métodos. Como pode ser visto na Figura 29, a perfusão de Sildenafil 10 μM foi capaz de inibir significativamente o JHCO_3^- comparado ao JHCO_3^- CTRL (JHCO_3^- de $1,506 \pm 0,089$ N=13 vs $1,984 \pm 0,072$ N=14 para o CTRL, $p < 0,05$), enquanto que a perfusão de Sinvastatina 100 μM produziu um estímulo significativo do

JHCO_3^- (JHCO_3^- de $2,441 \pm 0,128$ N=11, $p < 0,0001$ vs CTRL). A perfusão tubular com Sildenafil $10\mu\text{M}$ e Sinvastatina $100\mu\text{M}$ de forma simultânea não promoveu alteração no JHCO_3^- .

Figura 29 - Efeito da perfusão tubular de Sildenafil $10\mu\text{M}$ e Sinvastatina $100\mu\text{M}$ ou os dois fármacos simultaneamente no JHCO_3^- do túbulo proximal de ratos Wistar

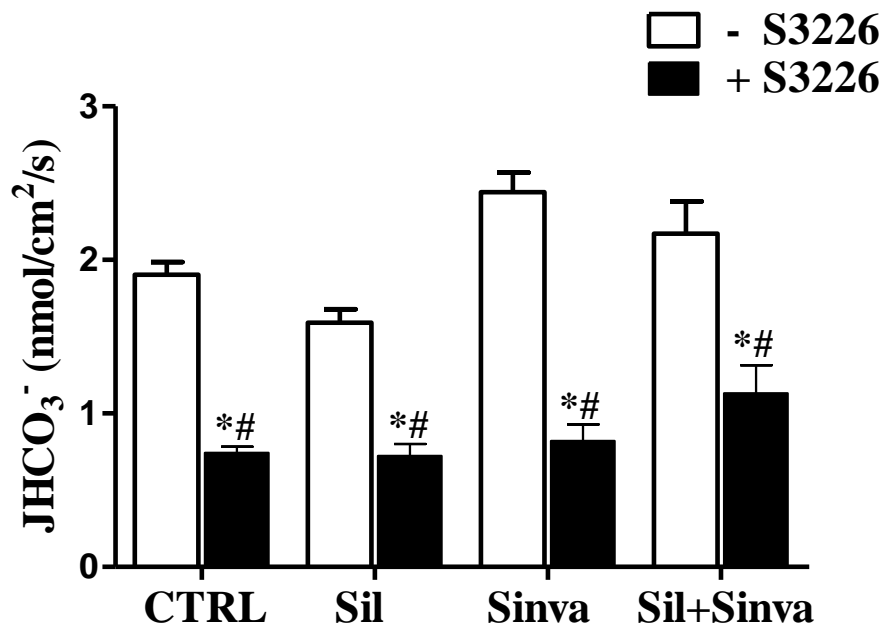


Ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* e tiveram túbulos proximais perfundidos com solução CTRL, Sildenafil $10\mu\text{M}$, Sinvastatina $100\mu\text{M}$ e, Sildenafil $10\mu\text{M}$ + Sinvastatina $100\mu\text{M}$. As barras representam as médias \pm SD. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,0001$ vs CTRL.

Com o intuito de determinar se o efeito verificado no JHCO_3^- deveu-se somente à modulação da atividade do NHE3 - e não à de outra proteína extrusora de H^+ -, túbulos renais foram perfundidos com as drogas Sildenafil e Sinvastatina (ou ambas) e um inibidor específico do NHE3, S3226. Como demonstrado na Figura 30, a adição de S3226 $5\mu\text{M}$ foi capaz de inibir drasticamente o JHCO_3^- em todos os grupos estudados: JHCO_3^- $0,7449 \pm 0,03883$ nmol/cm²/s CTRL+S3226 (N=15) vs $1,903 \pm 0,08321$ nmol/cm²/s CTRL (N=14) com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226; JHCO_3^- de $0,7230 \pm 0,07751$ nmol/cm²/s (N=11) para Sil + S3226 com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226; JHCO_3^- de $0,8219 \pm 0,1072$ nmol/cm²/s (N=12) para Sinva + S3226 com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226; JHCO_3^- de $1,132 \pm 0,1828$ nmol/cm²/s (N=12) para Sil+ Sinva + S3226 com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226. Estes resultados ressaltam a importância do NHE3 na reabsorção de HCO_3^- proximal. O fluxo de bicarbonato residual observado na presença de S3226 $5\mu\text{M}$,

inibidor específico do NHE3, possivelmente, ocorreria pela funcionalidade de outros mecanismos de transporte responsáveis pela secreção de prótons neste segmento do néfron. Vale ressaltar, ainda, que não foi observada diferença estatística entre os fluxos residuais de bicarbonato na presença concomitante das duas drogas e o inibidor específico de NHE3, o que indica que apenas o NHE3 é modulado pelo Citrato de Sildenafil e pela Sinvastatina.

Figura 30 - Determinação do papel do NHE3 na modulação da reabsorção de HCO_3^- proximal pelo Sildenafil 10 μM , Sinvastatina 100 μM ou os dois fármacos combinados, na presença ou ausência de S3226 5 μM , um inibidor específico de NHE3

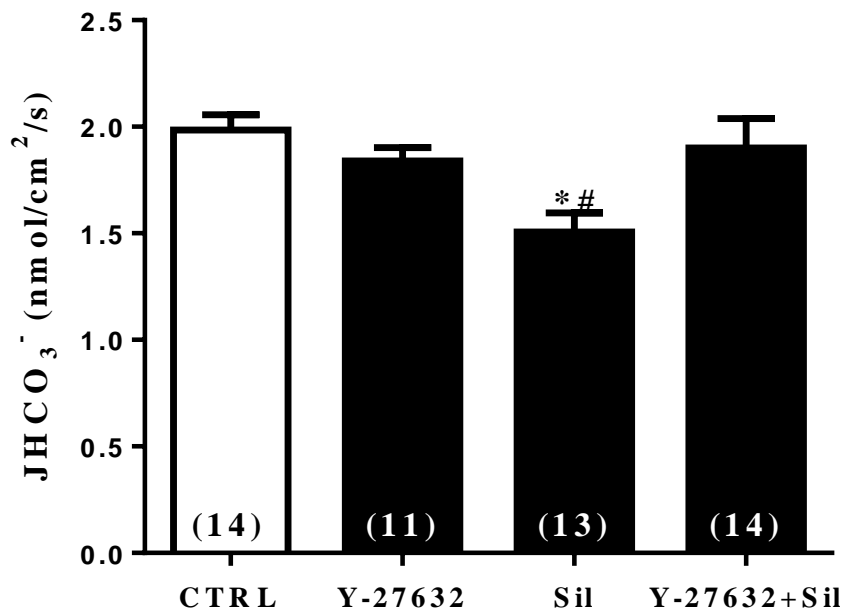


Representação das médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), Sil 10 μM (N=13), Sinva 100 μM (N=11), Sil 10 μM + Sinva 100 μM (N=11), CTRL + S3226 5 μM (N=15), Sil 10 μM + S3226 5 μM (N=11), Sinva 100 μM + S3226 5 μM (N=12), Sil 10 μM + Sinva 100 μM + S3226 5 μM (N=12). Realizado teste t sozinho vs S3226 * $p < 0,0001$. Realizado Anova, # $p < 0,0001$ vs CTRL.

5.5 Vias de sinalização envolvidas no efeito promovido pela perfusão intraluminal do túbulo proximal de ratos Wistar com Sildenafil 10 μ M e Sinvastatina 100 μ M sobre o JHCO_3^-

Com o intuito de investigar o papel da via Rho sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μ M e Sinvastatina 100 μ M em túbulos isolados, ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* como descrito nos métodos. Como pode ser visto na Figura 31, a perfusão de Sildenafil 10 μ M foi capaz de inibir significativamente o JHCO_3^- , comparado ao CTRL (JHCO_3^- de $1,506 \pm 0,089$ N=13 vs $1,984 \pm 0,072$ N=14 para o CTRL, $p < 0,05$). A perfusão tubular com Y-27632 10 μ M – inibidor da família das Rho GTPases – não produziu efeito significativos no JHCO_3^- , comparado ao CTRL. A perfusão tubular com Sildenafil 10 μ M e Y-27632 10 μ M de forma simultânea promoveu uma reversão do efeito inibitório promovido pelo Sildenafil no JHCO_3^- . Como o Sildenafil inibe a via RhoA, uma via que quando ativada promove aumento na atividade do NHE3, nós perfundimos túbulos proximais de ratos Wistar com Sildenafil e a droga Y-27632 (que inibe as Rho GTPases). O uso das duas drogas de forma concomitante produziu reversão da inibição promovida pelo Sildenafil, podendo-se inferir que o efeito do Sildenafil 10 μ M sobre o JHCO_3^- , ou seja, sobre a atividade do NHE3, se dá via Rho.

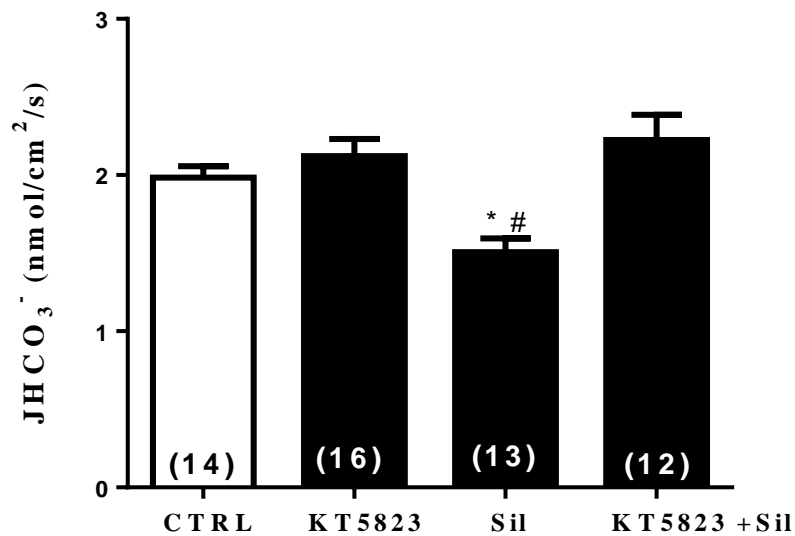
Figura 31 - Papel da via Rho sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sildenafil $10 \mu\text{M}$ no túbulo proximal de ratos Wistar



Ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* e tiveram túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), Y-27632 $1 \mu\text{M}$ (N=11), Sildenafil $10 \mu\text{M}$ (N=13), Sildenafil $10 \mu\text{M}$ e Y-27632 $10 \mu\text{M}$ (N=14). As barras representam as médias \pm SD. * $p < 0,05$ vs CTRL, # $p < 0,05$ vs Y-27632+Sil.

Com o intuito de investigar o papel da via GMPc sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sildenafil $10 \mu\text{M}$ em túbulos isolados, ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* com o KT5823 $1 \mu\text{M}$, inibidor da via PKG dependente de GMPc. Como pode ser visto na Figura 32, a perfusão de Sildenafil $10 \mu\text{M}$ foi capaz de inibir significativamente o JHCO_3^- , comparado ao CTRL (JHCO_3^- de $1,506 \pm 0,089$ N=13 vs $1,984 \pm 0,072$ N=14 para o CTRL, $p < 0,05$). Quando utilizamos o inibidor de PKG dependente de GMPc, verificamos que o efeito inibitório do Sildenafil foi abolido. Este resultado sugere que o efeito de diminuição sobre o JHCO_3^- promovido pelo Sildenafil deu-se via GMPc.

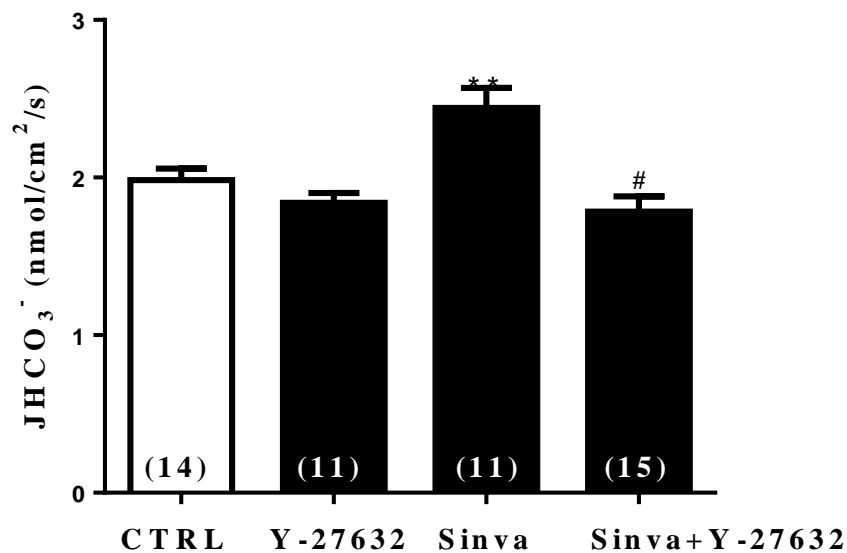
Figura 32 - Papel da via GMPc sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM no túbulo proximal de ratos Wistar



Ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* e tiveram túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), KT5823 1 μM (N=16), Sildenafil 10 μM (N=13), Sildenafil 10 μM e KT5823 1 μM (N=12). As barras representam as médias \pm SD. * $p < 0,05$ vs CTRL; # $p < 0,05$ KT5823+Sil.

Como pode ser visto na Figura 33, a perfusão de Sinvastatina 100 μM promoveu um aumento significativamente no JHCO_3^- , comparado ao CTRL (JHCO_3^- de $2,441 \pm 0,128$ N=11 vs $1,984 \pm 0,072$ N=14 para o CTRL, $p < 0,05$). A perfusão tubular com Y-27632 10 μM – inibidor da família das Rho GTPases não produziu efeito significativo no JHCO_3^- , comparado ao CTRL. A perfusão tubular com Sinvastatina 100 μM e Y-27632 10 μM de subtração do efeito estimulatório promovido pela Sinvastatina sobre o JHCO_3^- (JHCO_3^- de $1,785 \pm 0,095$ N=16 para Y-27632+Sinvastatina vs $2,441 \pm 0,128$ N=11 para Sinvastatina, $p < 0,05$). Estes experimentos de microperfusão estacionária de túbulos proximais de ratos Wistar com Sinvastatina demonstram que seu efeito estimulatório sobre a atividade do NHE3 ocorre de forma independente da via Rho.

Figura 33 - Papel da via Rho sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sinvastatina 100 μM no túbulo proximal de ratos Wistar



Ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* e tiveram túbulos proximais perfundidos com solução Sinvastatina 100 μM (N=11), Y-27632 10 μM (N=11), Sinvastatina 100 μM + Y-27632 10 μM (N=15). As barras representam as médias \pm SD. **p<0,0001 vs CTRL, #p<0,05 vs Sinvastatina.

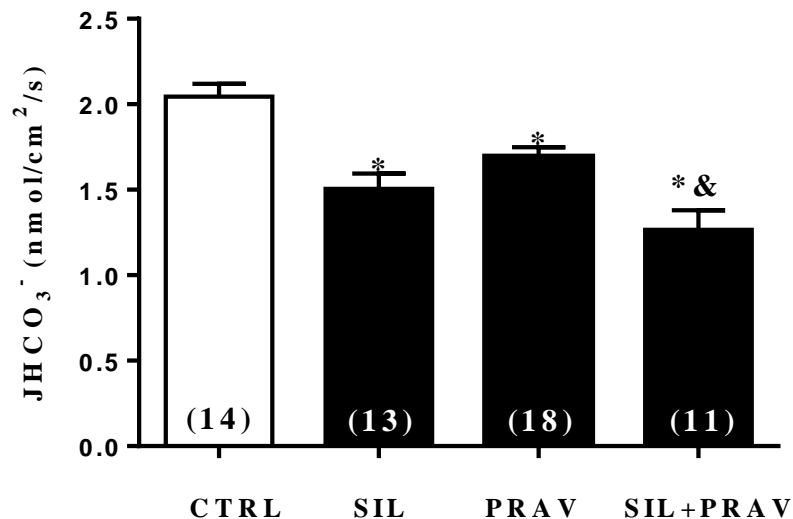
5.6 Efeito da perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM e Pravastatina 100 μM no JHCO_3^- no túbulo proximal de ratos Wistar

Pelo fato de a Sinvastatina ser um pró-fármaco inativo - e nossos resultados terem sido diferentes do esperado -, optamos por testar o efeito da perfusão intraluminal com o fármaco Pravastatina 100 μM sobre o JHCO_3^- em ratos Wistar.

Com o intuito de determinar o efeito do Sildenafil e da Pravastatina no transporte de bicarbonato de sódio do túbulo proximal, ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo*, como descrito nos métodos. Como pode ser visto na Figura 34, a perfusão de Sildenafil 10 μM foi capaz de inibir significativamente o JHCO_3^- comparado ao JHCO_3^- CTRL (JHCO_3^- de $1,506 \pm 0,089$ N=13 vs $1,984 \pm 0,072$ N=14 para o CTRL, p<0,05); da mesma forma, a perfusão de Pravastatina 100 μM produziu uma inibição significativa do

JHCO_3^- (JHCO_3^- de $1,692 \pm 0,057$ N=18 para Pravastatina vs $1,984 \pm 0,072$ N=14 para o CTRL, $p < 0,05$). A perfusão tubular com Sildenafil $10 \mu\text{M}$ e Pravastatina $100 \mu\text{M}$ de forma simultânea promoveu uma inibição mais acentuada no JHCO_3^- (JHCO_3^- de $1,265 \pm 0,115$ N=11 para Sildenafil+Pravastatina vs $1,984 \pm 0,072$ N=14 para o CTRL, $p < 0,05$).

Figura 34 - Efeito da perfusão tubular de Sildenafil $10 \mu\text{M}$ e Pravastatina $100 \mu\text{M}$ ou os dois fármacos simultaneamente no JHCO_3^- do túbulo proximal de ratos Wistar

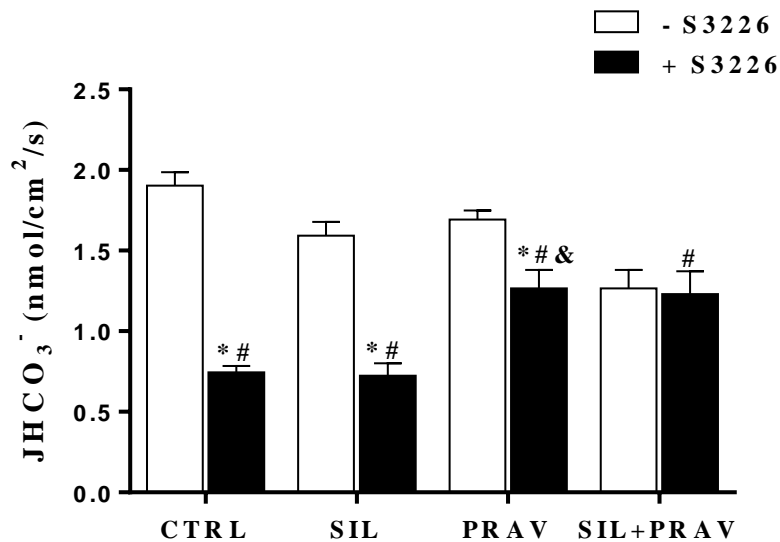


Ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* e tiveram túbulos proximais perfundidos com solução CTRL, Sildenafil $10 \mu\text{M}$, Pravastatina $100 \mu\text{M}$ e, Sildenafil $10 \mu\text{M}$ + Pravastatina $100 \mu\text{M}$. As barras representam as médias \pm SD. * $p < 0,05$ vs CTRL; e & $p < 0,05$ vs PRAV.

Com o intuito de determinar se o efeito verificado no JHCO_3^- deveu-se somente à modulação da atividade do NHE3 - e não à de outra proteína extrusora de H^+ -, túbulos renais foram perfundidos com as drogas Sildenafil e Pravastatina (ou ambas) e um inibidor específico do NHE3, S3226. Como demonstrado na Figura 35, a adição de S3226 $5 \mu\text{M}$ foi capaz de inibir drasticamente o JHCO_3^- em todos os grupos estudados: JHCO_3^- $0,7449 \pm 0,03883$ nmol/cm²/s CTRL+S3226 (N=15) vs $1,903 \pm 0,08321$ nmol/cm²/s (N=14) com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226; JHCO_3^- de $0,7230 \pm 0,07751$ nmol/cm²/s (N=11) para Sil + S3226 com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226; JHCO_3^- de $1,2650 \pm 0,1147$ nmol/cm²/s (N=11) para Prav + S3226 com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226; JHCO_3^-

de $1,231 \pm 0,1231$ nmol/cm²/s (N=11) para Sil+ Prav + S3226 com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + S3226. Estes resultados ressaltam a importância do NHE3 na reabsorção de HCO₃⁻ proximal. O fluxo de bicarbonato residual observado na presença de S3226 5 μM, inibidor específico do NHE3, possivelmente, ocorreria pela funcionalidade de outros mecanismos de transporte responsáveis pela secreção de prótons neste segmento do néfron. Vale ressaltar, ainda, que não foi observada diferença estatística entre os fluxos residuais de bicarbonato na presença concomitante das duas drogas e o inibidor específico de NHE3, o que indica que apenas o NHE3 é modulado pelo Citrato de Sildenafil e pela Pravastatina.

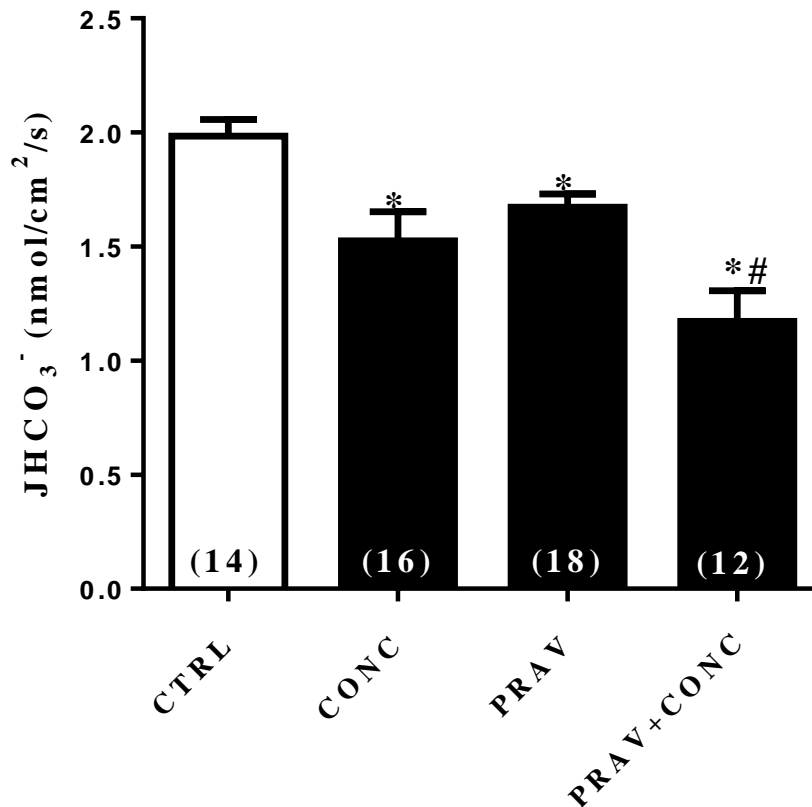
Figura 35 - Determinação do papel do NHE3 na modulação da reabsorção de HCO₃⁻ proximal pelo Sildenafil 10 μM, Pravastatina 100 μM ou os dois fármacos combinados, na presença ou ausência de S3226 5 μM, um inibidor específico de NHE3



Representação das médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), Sil 10 μM (N=13), Prav 100 μM (N=18), Sil 10 μM +Prav a 100 μM (N=11), CTRL + S3226 5 μM (N=15), Sil 10 μM + S3226 5 μM (N=11), Prav 100 μM + S3226 5 μM (N=11), Sil 10 μM + Prav 100 μM + S3226 5 μM (N=11). Realizado teste t sozinho vs S3226 * $p < 0,0001$. Realizado Anova, # $p < 0,0001$ vs CTRL. & $p < 0,05$ vs CTRL+S3226.

Com o intuito de determinar se o efeito verificado no JHCO₃⁻ deveu-se à modulação da atividade de outra proteína extrusora de H⁺, túbulos renais foram perfundidos com as drogas Pravastatina e Concanamicina 10⁻⁸M um inibidor específico da H⁺ ATPase vacuolar.

Figura 36 - Determinação do papel da H^+ ATPase na modulação da reabsorção de HCO_3^- proximal pela Pravastatina 100 μ M, na presença ou ausência de Concanamicina 10⁻⁸ M, um inibidor específico da H^+ ATPase



Representação das médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), Concanamicina 10⁻⁸ M (N=16), Pravastatina 100 μ M (N=18) e Pravastatina 100 μ M + Concanamicina 10⁻⁸ M (N=12). * $p < 0,05$ vs CTRL; # $p < 0,05$ vs PRAV.

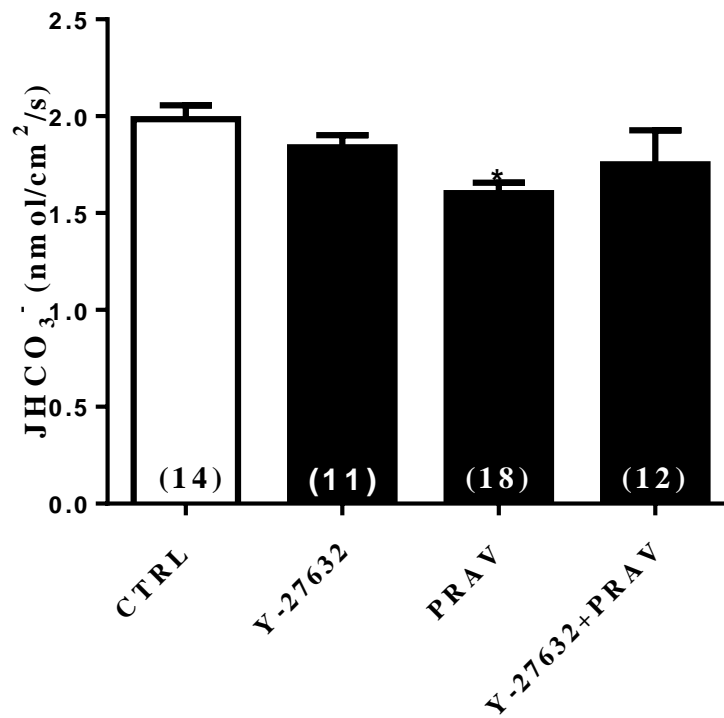
Como demonstrado na Figura 36, a adição de Concanamicina 10⁻⁸ M foi capaz de inibir o $JHCO_3^-$: $JHCO_3^-$ 1,525 \pm 0,129 nmol/cm²/s CTRL+CONC (N=16) vs 1,903 \pm 0,08321 nmol/cm²/s (N=14) com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + CONC; $JHCO_3^-$ de 1,172 \pm 0,1340 nmol/cm²/s (N=12) para PRAV + CONC com $p < 0,0001$ por teste t sozinho vs + CONC (Figura 36). Estes resultados ressaltam a importância da H^+ ATPase Vacuolar na reabsorção de HCO_3^- proximal. Assim, o fluxo de bicarbonato residual observado na presença de S3226 5 μ M - inibidor específico do NHE3 - e Pravastatina 100 μ M ocorrerá pela funcionalidade da

H⁺ ATPase, mecanismo de transporte responsável por parte da secreção de prótons neste segmento do néfron.

5.7 Vias de sinalização envolvidas no efeito promovido pela perfusão intraluminal do túbulo proximal de ratos Wistar com Pravastatina 100 µM sobre o JHCO₃⁻

Com o intuito de investigar o papel da via Rho sobre o JHCO₃⁻ pela perfusão intraluminal de Pravastatina 100 µM em túbulos isolados, ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* como descrito nos métodos. Como pode ser visto na Figura 37, a perfusão de Pravastatina 100 µM foi capaz de inibir significativamente o JHCO₃⁻, comparado ao CTRL (JHCO₃⁻ de 1,692 ± 0,057 N=18 para Pravastatina vs 1,984 ± 0,072 N=14 para o CTRL, p<0,05). A perfusão tubular com Y-27632 10 µM – inibidor da família das Rho GTPases – não produziu efeito significativos no JHCO₃⁻, comparado ao CTRL. A perfusão tubular com Pravastatina 100 µM e Y-27632 10 µM de forma simultânea não foi capaz de promover uma reversão do efeito inibitório promovido pela Pravastatina no JHCO₃⁻. Assim, podemos inferir que o efeito da Pravastatina 100 µM sobre o JHCO₃⁻, ou seja, sobre a atividade do NHE3, acontece de forma independente da via Rho.

Figura 37 - Papel da via Rho sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Pravastatina 100 μM no túbulo proximal de ratos Wistar



Ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* e tiveram túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), Y-27632 10 μM (N=11), Pravastatina 100 μM (N=18), Pravastatina 100 μM e Y-27632 10 μM (N=12). As barras representam as médias \pm SD. * $p < 0,05$ vs CTRL.

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeitos sobre a função renal promovidos pelo tratamento de ratos Wistar com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos por 24 horas

O ritmo de filtração glomerular (RFG), medido através do *clearance* de creatinina, foi utilizado para determinar o efeito dos fármacos Sildenafil e Sinvastatina na função glomerular. Em todos os grupos submetidos ao tratamento com os fármacos e colocados em gaiola metabólica sem restrição hídrica não observamos alterações neste parâmetro. Porém, nos animais tratados por 24 horas com Sildenafil e submetidos à restrição hídrica e nos animais nos quais infundimos os fármacos via jugular pelo método gravimétrico observamos diminuição do RFG e do fluxo urinário. Estudos demonstraram que o Citrato de Sildenafil é um fármaco que inibe a via da Rho-quinase e que também é eficaz para o tratamento da hipertensão pulmonar (Abe et al., 2004.; Fagan et al., 2004). Além disso, evidências apontam que a RhoA desempenha um importante papel na regulação de aspectos estruturais de células vasculares (Somlyo, Somlyo, 2000; Mack et al., 2001). Assim, por sua ação vasodilatadora, esperávamos que o Sildenafil promovesse queda da pressão glomerular e, conseqüentemente, do RFG e do fluxo urinário ($RFG=(U_x.V)/P_x$), o que foi verificado somente com a manobra de restrição hídrica. Um estudo com pacientes apresentando quadro clínico estabelecido de cirrose e ascite associada (acúmulo de líquido na cavidade peritoneal) demonstrou que na maioria dos pacientes o Sildenafil não altera o RFG. Porém, em alguns destes pacientes detectou-se uma queda do RFG promovida pelo fármaco (120 a 180 minutos após sua administração), além de um efeito antinatriurético (Thiesson et al., 2005). Este achado corrobora não apenas os dados de RFG, mas também o fato de termos verificado uma diminuição na carga excretada de sódio promovida pelo Sildenafil.

Como mencionado, a excreção urinária de Na^+ diminuiu no grupo tratado com Citrato de Sildenafil ou os dois fármacos administrados de forma concomitante quando comparado com o Veículo. Quando submetemos os animais a manobra de restrição hídrica observamos que a excreção urinária de Na^+ e a fração de excreção de Na^+ diminuíram apenas no grupo tratado com Sildenafil - apresentando tendência de diminuição nos demais grupos. Estes

resultados podem estar relacionados não apenas com o tratamento, mas também com a própria manobra de restrição hídrica, já que esta altera a atividade de proteínas envolvidas no manejo de Na^+ pelos rins, aumentando, por exemplo, a atividade do NHE3 na medula externa renal de ratos submetidos à privação hídrica (Amla, Wilke, 2003). Assim, a manobra de restrição diminuiu o sódio urinário nos animais que tratamos com Sildenafil, enquanto que nos animais apenas tratados com os fármacos observamos diminuição do sódio urinário não apenas no grupo tratado com Sildenafil, mas também no grupo tratado com os dois fármacos; ou seja, o Sildenafil foi capaz de diminuir o sódio na urina, sugerindo que este promove estímulos de mecanismos de transporte envolvidos com a reabsorção deste íon ao longo do néfron. Além disso, o grupo tratado com os dois fármacos e submetidos à restrição hídrica apresentou um aumento no Na^+ plasmático, o que também sugere que o Sildenafil seja capaz de reter sódio no organismo. Um estudo publicado por Tian et al. (2005) demonstrou que animais submetidos à manobra de restrição hídrica apresentam aumento da expressão de NKCC2 e NCC, o que acarretaria uma diminuição no sódio urinário. Estes dados sugerem que a administração do fármaco Sildenafil por 24 horas pode alterar mecanismos de transporte de sódio ao longo do néfron.

Dados da literatura demonstraram que o Sildenafil é um fármaco capaz de promover inserção de aquaporinas 2 (AQ2) no ducto coletor de animais com diabetes *insipidus* neurogênica, os quais produzem uma urina diluída. Por outro lado, este medicamento também promoveria natriurese, antagonizando o efeito anti-diurético produzido pela inserção apical de aquaporinas 2 (Bouley et al., 2005). Assim, os trabalhos de Bouley et al. (2005) contradizem os nossos dados, já que o Sildenafil, surpreendentemente, diminuiu o sódio urinário. Porém, o trabalho de Thiesson et al. (2005) apoia nossos dados, já que pacientes com retenção de NaCl e ascite tratados com Sildenafil apresentaram diminuição da carga excretada de Na^+ . Vale lembrar que o tratamento com Sildenafil diminuiu o K^+ plasmático e o hematócrito e, ao mesmo tempo, diminuiu o fluxo urinário dos animais tratados por 24 horas, o que sugere que este fármaco esteja produzindo um efeito de hemodiluição. Por outro lado, o grupo tratado com os dois fármacos e submetidos à restrição hídrica apresentou um aumento no Na^+ plasmático, na proteína total do plasma e do hematócrito, sugerindo quadro de desidratação característico da manobra de restrição hídrica.

Porém, o fluxo urinário neste grupo diminuiu, o que pode ter ocorrido de modo a compensar este efeito de desidratação, com retenção hídrica.

Ao analisarmos a excreção de K^+ (mmol por dia/100 g de peso corpóreo) e a fração de excreção de K^+ não encontramos diferenças nos animais que não foram submetidos à restrição hídrica e nos animais em que esta manobra foi realizada. Vale ressaltar ainda que, apesar da Sinvastatina não ter promovido alterações na $CENa^+$ e na $FE Na^+$ em nenhum dos grupos estudados, a mesma foi capaz de aumentar o Na^+ plasmático e, ao mesmo tempo, diminuir o fluxo urinário e aumentar a osmolaridade urinária. Embora a osmolaridade urinária tenha aumentado, o que em teoria indicaria um aumento de solutos osmoticamente ativos na urina dos animais tratados com Sinvastatina, o *clearance* osmolar e o *clearance* de água (gerado pelos segmentos diluidores impermeáveis à água, ramo ascendente grosso da alça de Henle e túbulo distal inicial) não sofreram alterações significativas pelo tratamento com o fármaco por 24 horas. De qualquer forma, apesar destes parâmetros não terem sido significativos, o grupo tratado com Sinvastatina tendeu a apresentar uma urina hipertônica ou concentrada – com o transporte renal de água reabsorvida pelo túbulo coletor (*clearance* de água livre mais negativo), sugerindo que está havendo aumento dos níveis de ADH. A Sinvastatina é um fármaco capaz de promover alterações no volume dos indivíduos, em parte, pela sua capacidade de inserir AQ2 no ducto coletor e corrigir a osmolaridade urinária em estados patológicos em que se produz urina diluída, como no diabetes (Bouley et al., 2005). Além disso, sabe-se que a absorção de água ao longo do néfron depende do gradiente osmótico para a reabsorção desta através do epitélio tubular (Knepper, 1997). Este gradiente de força osmótica é estabelecido, em parte, pelo transporte de Na^+ por mecanismos específicos (Nielsen et al., 2002). Estes achados poderiam explicar nossos resultados, já que observamos aumento da osmolaridade urinária pelo tratamento com Sinvastatina sem aumento do Na^+ urinário, mas com diminuição do fluxo provavelmente pela inserção de AQ2 na membrana e conseqüente aumento da reabsorção de água. Além disso, nossos experimentos com microperfusão estacionária *in vivo* demonstraram que a perfusão tubular com Sinvastatina promoveu um estímulo no NHE3, o que poderia explicar o aumento no Na^+ plasmático nestes animais e diminuição do fluxo urinário - no sentido de reter volume.

Por outro lado, os resultados obtidos com gaiola metabólica contradizem de forma parcial os nossos resultados obtidos através da técnica de microperfusão tubular estacionária: a perfusão de Sildenafil 10 μM inibiu o JHCO_3^- comparado ao JHCO_3^- CTRL, enquanto que a perfusão de Sinvastatina 100 μM produziu um estímulo no JHCO_3^- ; já a perfusão tubular com Sildenafil 10 μM e Sinvastatina 100 μM de forma simultânea não promoveu alteração no JHCO_3^- . Como o Sildenafil agiu inibindo NHE3, esperávamos que houvesse um aumento de Na^+ excretado na urina dos animais tratados com este fármaco. Já a Sinvastatina, por ter promovido um estímulo no NHE3, esperávamos que ocasionasse diminuição na excreção de Na^+ destes animais. Apesar de ter havido uma tendência da Sinvastatina em diminuir a CENa^+ - tanto nos animais tratados quanto nos tratados e submetidos à restrição hídrica, como já mencionado -, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Realizamos, então, a manobra de restrição hídrica (de forma concomitante ao tratamento) para verificar se alterando parâmetros relacionados à osmolaridade, a carga excretada e a fração de excreção de Na^+ não apresentariam valores diferentes dos animais que foram submetidos apenas aos tratamentos com os fármacos. A manobra de restrição hídrica ocasionou aumento da osmolaridade urinária, aumento do *clearance* osmolar e um *clearance* de água livre mais negativo. Estes dados indicam que estes animais estão produzindo uma urina hipertônica (mais concentrada) e que toda a água livre de soluto, produzida no ramo ascendente espesso da alça de Henle e túbulo distal inicial, é reabsorvida pelo túbulo distal e pelo sistema de ductos coletores, indicando que os níveis de ADH estão altos. Porém, apesar de a restrição ter sido efetiva, não houve mudanças no padrão da CENa^+ e da FENa^+ promovidas por estes fármacos.

Estes resultados sugerem que outros mecanismos envolvidos com o manejo de Na^+ podem estar sendo modulados ao longo do néfron quando estes animais são tratados com estes fármacos por 24 horas. No ramo ascendente espesso da alça de Henle (responsável pela reabsorção de 20-25% do NaCl filtrado), por exemplo, há, não somente o NHE3, mas também o cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC2 ou BSC-1). Este transportador poderia estar tendo sua expressão aumentada por Sildenafil, o que explicaria a diminuição da carga excretada de Na^+ na urina que foi verificada. Vale lembrar que este segmento é impermeável à água, portanto, a ação deste fármaco neste, ajudaria a entender o porquê de, embora tenha

haveria diminuição do Na^+ urinário, não tenha havido alterações na osmolaridade da urina final dos animais, apesar da diminuição do fluxo. Ou seja, o Sildenafil teria promovido diminuição da atividade do NHE3 no túbulo proximal (o que foi demonstrado pela técnica de microperfusão) e, hipoteticamente, aumento de Na^+ no filtrado que, ao chegar no ramo espesso ascendente da alça de Henle, poderia ter sido reabsorvido pelo NKCC2, com o fluido ficando “diluído”. Embora tenha supostamente havido inserção de AQ2 no ducto coletor (em virtude do tratamento com Sildenafil) e o manejo de sódio por outros mecanismos de transporte distais, tais mecanismos - e a inserção de AQ2 - não teriam sido capazes de promover aumento do Na^+ urinário.

Já no túbulo convoluto distal, o Na^+ é reabsorvido primariamente pelo cotransportador $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC ou TSC) (Knepper et al., 2001). No túbulo conector e ducto coletor a reabsorção de Na^+ pela membrana apical ocorre através do canal epitelial para Na^+ (ENaC), o qual tem sido relacionado com a gênese da Síndrome de *Liddle*, desordem caracterizada pela expansão do volume e hipertensão (Shimkets et al., 1994). A vasopressina aumenta a expressão apical de ENaC, o que leva a um aumento da permeabilidade do ducto coletor ao Na^+ (Ecelbarger et al., 2001). Como mencionado anteriormente, este hormônio é o responsável pela inserção de aquaporinas 2 no ducto coletor as quais conferem permeabilidade à água nas células principais do ducto coletor (Nielsen et al., 2002). Todos estes transportadores renais podem estar envolvidos no efeito antinatriurético ou no aumento da reabsorção de Na^+ e água promovidos pelos fármacos Sildenafil e Sinvastatina, respectivamente, e poderiam justificar as diferenças observadas durante a administração dos mesmos em ratos Wistar. Além disso, atualmente sabe-se que um aumento ou diminuição no transporte de sódio no TP, pode ser compensado por mecanismos que alteram o transporte deste íon nos segmentos mais distais do néfron ou até mesmo pelo ritmo de filtração glomerular via *feedback* tubuloglomerular (Wang et al., 2009).

Quando analisamos a osmolaridade urinária (mOsm/Kg de água), verificamos, como mencionado, que a Sinvastatina promoveu um aumento da osmolaridade urinária e uma diminuição do fluxo urinário e que o Sildenafil não foi capaz de promover este efeito. Porém,

quando os dois fármacos foram administrados de forma concomitante, não houve diferença de osmolaridade - embora o fluxo tenha diminuído -, sugerindo que o Sildenafil é capaz de atenuar o efeito de concentração urinária promovido pela Sinvastatina. Vale ressaltar, ainda, que nos animais submetidos a restrição hídrica por 24 horas observamos que o fluxo urinário diminuiu nos grupos tratados com Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos, sugerindo que estes fármacos possivelmente estejam aumentando a reabsorção de água ao longo do néfron destes animais.

Apesar do tratamento com estes fármacos terem alterado em alguns grupos os eletrólitos plasmáticos, a osmolaridade não foi alterada pelo tratamento com Sildenafil, Sinvastatina ou ambos. Interessantemente, em uma situação de alteração da concentração plasmática de potássio sem comprometimento do volume circulante, os transportadores NCC, também expressos nos segmentos distais do néfron, diminuem sua expressão (Mc Donough et al., 2013). Isso permite que a homeostase de K^+ seja mantida sem o comprometimento da homeostase de volume, uma vez que apesar de ocorrer um aumento da captação de sódio pelo ENac, ocorre queda da absorção deste íon pelo NCC (Mc Donough et al., 2013). Este fato justificaria os resultados do presente trabalho, no qual verificou-se alterações na homeostase de K^+ (emboras pequenas e dentro da normalidade) sem comprometimento da homeostase de volume.

Investigamos a carga excretada de proteínas por ser o túbulo proximal o local onde ocorre a reabsorção da maior parte desta substância e por este aspecto depender de diversos transportadores, entre eles o NHE3, e da integridade do citoesqueleto. Com o tratamento de ratos Wistar por 24 horas com Sildenafil, Sinvastatina ou os dois fármacos, não observamos alterações significativas na carga excretada de proteínas.

Nossos resultados com microperfusão tubular estacionária *in vivo* ressaltam a importância do NHE3 na reabsorção de $JHCO_3^-$ proximal. O fluxo residual de bicarbonato, observado na presença do inibidor específico do NHE3, ocorre pela funcionalidade de outros mecanismos de transporte responsáveis pela secreção de prótons neste segmento do néfron. Vale ressaltar que não foi observada diferença estatística entre os fluxos residuais de bicarbonato na presença concomitante dos fármacos com o inibidor específico de NHE3, o que indica que apenas o NHE3 seria modulado pelo Citrato de Sildenafil e pela Sinvastatina.

Como fechamos o N e não obtivemos diferenças significativas, decidimos não investigar a ação dos dois fármacos combinados sobre a atividade da H^+ -ATPase Vacuolar.

Devido aos nossos resultados com a Sinvastatina terem sido diferentes do esperado, fomos investigar de forma mais detalhada a farmacologia da molécula e verificamos que a mesma é um pró-fármaco, necessitando ser metabolizada para se tornar ativa. Então, decidimos utilizar a Pravastatina (uma estatina mais atual e ativa) para investigarmos seu efeito sobre a atividade do NHE3 e a função renal de ratos Wistar e verificamos que Pravastatina 100 μ M diminui o $JHCO_3^-$ em túbulos proximais de ratos Wistar via NHE3. Porém, o efeito da Pravastatina gerou um $JHCO_3^-$ residual – quando comparado com o grupo no qual os animais foram perfundidos com S3226 (inibidor específico de NHE3) somente em solução controle.

Como contra-transportador Na^+/H^+ (isoforma NHE-3) constitui a via predominante para a secreção de H^+ pelo túbulo proximal e usa o gradiente lúmen/célula para Na^+ como forma de impulsionar este processo (Mello Aires, Malnic, 1979; Brenner, Rector, 2008), mas não exclusiva, já que até 40% da secreção de H^+ neste segmento é independente de Na^+ e sensível a Bafilomicina, um inibidor da H^+ -ATPase do tipo vacuolar (H^+ -ATPase_v) (Kinne-Saffran et al., 1982; Wagner et al., 2004), fomos investigar se outro mecanismo de extrusão de prótons estaria envolvido no efeito residual sobre o $JHCO_3^-$ que encontramos e verificamos, ao utilizarmos Concanamicina 10^{-8} M, que este fluxo residual acontece via H^+ ATPase Vacuolar.

Embora não existam outros estudos dos efeitos dos inibidores da HMGCoA redutase sobre as atividades das isoformas de NHE apical (NHE3 e/ou NHE2) *per se*, achados sugeriram uma redução na atividade de NHE1 por Simvastatina e Lovastatina (Weber et al., 1991; Ng et al., 1992). Vale lembrar que nossos resultados com canulação da jugular e infusão dos fármacos por 30 minutos demonstraram um aumento da carga excretada de Na^+ promovido pela Pravastatina e uma diminuição da mesma quando infundimos os dois fármacos (Sildenafil e Pravastatina) de forma concomitante. Estes resultados com Pravastatina nos auxiliam a entender os efeitos da perfusão intraluminal com a Pravastatina, já que encontramos – através da técnica de microperfusão tubular estacionária - que este fármaco

produz uma diminuição do fluxo de bicarbonato via NHE3. Assim, era esperado que a carga excretada de Na^+ aumentasse nos animais tratados.

6.2 Papel da via Rho sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM , Sinvastatina 100 μM e Pravastatina 100 μM no túbulo proximal de ratos Wistar

Realizamos experimentos com perfusão tubular de Y-27632 (inibidor da via Rho-quinase) para determinar se a via promotora das alterações funcionais do NHE3 nos experimentos de microperfusão se deu via Rho. Estudos sugerem que algumas das proteínas acessórias que modulam a atividade do NHE3 se relacionam com a ezrina, sendo que esta se liga a filamentos de actina servindo como ponte entre proteínas de membrana, entre elas o NHE3, e o citoesqueleto. Assim, a atividade do NHE3 pode ser controlada pelo seu estado de associação com o citoesqueleto de actina e com a ezrina (Kurashima et al., 1999). Szász et al., (2001) sugeriram que a inibição do NHE3 pela PKA envolve remodelamento do citoesqueleto e inativação da via RhoA (proteína que integra a família Rho GTPase) alterando a fosforilação do NHE3 no resíduo Ser⁶⁰⁵ e indireta no resíduo Ser⁶³⁴.

Evidências apontam que a RhoA desempenha um importante papel na regulação de aspectos estruturais de células vasculares, tais como a organização do citoesqueleto de actina e diferenciação (Somlyo, Somlyo, 2000; Mack et al., 2001). Na musculatura lisa vascular, a RhoA é inibida pela via NO / cGMP, é fosforilada pelo cGMP dependente de proteína quinase (PKG) (Sauzeau et al., 2000), e portanto, a ativação da via NO / cGMP (que ocorre durante a terapia com Sildenafil) pode levar a alterações na via da RhoA e conseqüentemente na organização do citoesqueleto de actina (Sauzeau et al., 2000;. Gudi et al., 2002.). Assim, apesar do Sildenafil não agir diretamente na via da RhoA, este aumenta os níveis intracelulares de cGMP, o que torna provável que este fármaco promova alterações no citoesqueleto semelhantes às produzidas por fármacos que atuam diretamente na RhoA, tal como a Sinvastatina. Este pode ser um dos mecanismos comuns pelos quais estes fármacos atuam no ducto coletor promovendo a inserção de aquaporinas. Quando fizemos o grupo Sildenafil 10 μM + Y-27632 10 μM observamos que houve o inibidor de Rho aboliu o efeito inibitório promovido pelo Sildenafil no JHCO_3^- , demonstrando que o efeito do fármaco Citrato de Sildenafil sobre a atividade do NHE3 ocorre via Rho. Com o intuito de investigar

o papel da via GMPc sobre o JHCO_3^- pela perfusão intraluminal de Sildenafil 10 μM em túbulos isolados, ratos Wistar foram submetidos à microperfusão estacionária *in vivo* com o KT5823 1 μM , inibidor da via PKG dependente de GMPc. A perfusão de Sildenafil 10 μM foi capaz de inibir significativamente o JHCO_3^- , comparado ao CTRL. Quando utilizamos o inibidor de PKG dependente de GMPc, verificamos que o efeito inibitório do Sildenafil foi abolido. Este resultado sugere que o efeito de diminuição sobre o JHCO_3^- promovido pelo Sildenafil deu-se via GMPc. Estes dados são corroborados pela literatura, a qual apresenta que a fosfatidilesterase do tipo V (PDE5) degrada GMPc na forma ativa gerando GMP inativo. A PDE5 está presente em tecido vascular, coração e rins. Nos rins, PDE5 aumenta NO nos glomérulos (Takimoto et al., 2005; Senzaki et al., 2006). Assim, inibidores de PDE5, como o Citrato de Sildenafil, poderiam agir aumentando a biodisponibilidade de GMPc ativo nos rins, ativando PKG que inibiria a atividade do NHE3 (Jin et al., 2001; Cha et al., 2005). Além disso, sabe-se que a regulação do NHE3 também pode ser exercida por estimulação de proteínas quinases, como a PKA, PKC e a PKG, as quais induzem significativa inibição do trocador Borgese et al., 1992; (Kandasamy et al., 1995; Cha et al., 2005). Estudos apontam a participação de proteínas acessórias (NHERF1 e NHERF2) necessárias para a inibição do NHE3 mediada por PKA e por PKG (Weinman et al., 1995; Yun et al., 1997; Cha et al., 2005). Assim, a produção de cGMP com a consequente ativação da PKG, também promove inibição do NHE3 (Roczniak, Burns, 1996; Jin et al., 2001; Cha et al., 2005). Estes achados corroboram nossos resultados obtidos pela técnica de microperfusão estacionária, os quais sugerem que o Sildenafil inibe a atividade do NHE3 pelo aumento de GMPc e ativação de PKG, o que envolve remodelamento do citoesqueleto e inativação da via RhoA (proteína que integra a família Rho GTPase).

O efeito promovido pela Sinvastatina sobre o JHCO_3^- foi estimulatório. Quando realizamos os estudos de investigação do papel da via Rho no efeito promovido pela Sinvastatina sobre o JHCO_3^- , observamos que o inibidor Y-27632 10 μM não foi capaz de promover uma reversão do estímulo da Sinvastatina sobre o JHCO_3^- . Assim, o efeito estimulatório da Sinvastatina sobre o JHCO_3^- resultante da atividade do NHE3 ocorre de forma independente da via Rho. Quando utilizamos a Pravastatina – uma estatina ativa – verificamos que sua perfusão em túbulos proximais de ratos Wistar promoveu inibição da atividade do NHE3 via Rho, como esperado e que o inibidor da via Rho não foi capaz de

produzir efeitos significativos sobre o JHCO_3^- . Estes resultados demonstraram que o efeito estimulatório da Sinvastatina e inibitório da Pravastatina sobre a atividade do NHE3 em túbulos proximais de ratos Wistar ocorre de forma independente da via Rho.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho verificamos que a Sinvastatina e o Sildenafil modulam de maneira oposta a atividade do trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3) apical em ratos Wistar.

O Sildenafil 10 μM inibe a atividade do NHE3 e diminui a carga excretada de Na^+ , sugerindo que outros mecanismos envolvidos no manejo de Na^+ estariam sendo modulados pelo fármaco.

A Sinvastatina 100 μM aumenta a funcionalidade deste trocador. Já a Pravastatina 100 μM diminui o JHCO_3^- via NHE3 e H^+ ATPase Vacuolar. Além disso, a Pravastatina produz um efeito de aumento da carga excretada de Na^+ , o que corrobora seu efeito inibitório de NHE3.

Quanto às vias de sinalização envolvidas com as alterações promovidas pela perfusão tubular com Sildenafil, Sinvastatina e Pravastatina, verificamos que:

a) O efeito inibitório promovido pelo Sildenafil sobre o fluxo de bicarbonato em túbulos proximais de ratos Wistar ocorreu via ativação de PKG dependente de GPMc e inibição de Rho;

b) O efeito estimulatório da Sinvastatina sobre o fluxo de bicarbonato em túbulos proximais de ratos Wistar ocorre de forma independente da via Rho;

c) O efeito inibitório promovido pela Pravastatina 100 μM sobre o fluxo de bicarbonato em túbulos proximais de ratos Wistar não ocorre via Rho.

REFERÊNCIAS¹

Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res.* 2004; 94: 385–93.

Alexander RT, Dimke H, Cordat E. Proximal tubular NHEs: sodium, protons and calcium? *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 305:F229-F36.

Alexander RT, Grinstein S. Tethering, recycling and activation of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3. *J. Exp. Biol.* 2009; 212,1630-37.

Amlal H, Wilke C. Resistance of mTAL Na⁺-dependent transporters and collecting duct aquaporins to dehydration in 7-month-old rats. *Kidney Int.* 2003; 64: 544-54.

Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev.* 2001; 53:417-50.

Biemesderfer D, Pizzonia J, Alfa AA, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *APS.* 1993;. Rapid communication.

Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, Aronson PS. Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am. J. Physiol.* 1997; 273, F289-F99.

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology.* 2ed. Phyladelphia Saunders: Elsevier; 2009. 1352p.

Bouley R, Pastor-Soler N, Cohen O, McLaughlin M, Breton S and Brown D. Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288: F1103- F12.

Brant SR, Yun CH, Donowitz M, Tse CM. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform, NHE3. *Am. J. Physiol.* 1995; 269, C198-C206.

¹De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver). Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 July 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Brenner BM, Rector FC. Brenner and Rector's. The Kidney. 7ed. Editora Philadelphia Saunders; 2008 p. 1382.

Brett CL, Donowitz M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005; 288, C223-C39.

Brown D, Hirsch S, Gluck, S. Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J. Clin. Invest.* 1998; 82: 2114-26.

Brown, EM e McLeod, RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiological Reviews.* 2001; 81: 240-97.

Cha B, Kim JH, Hut H, Hogema BM, Nadarja J, Zizak M, Cavet M, Lee-Kwon W, Lohmann SM, Smolenski A, Tse CM, Yun C, de Jonge HR, Donowitz M. cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G- anchoring protein. *J Biol Chem.* 2005; 280: 16642–50.

Cha B, Tse M, Yun C, Kovbasnjuk O, Mohan S, Hubbard A, Arpin M, Donowitz M. The NHE3 juxtamembrane cytoplasmic domain directly binds ezrin: dual role in NHE3 trafficking and mobility in the brush border. *Mol. Biol. Cell.* 2006; 17, 2661-73.

Cheitlin MD, Hutter Jr AM, Brindis RG, Ganz P, Kaul S, Russell Jr RS, Zusman RM. Use of Sildenafil (Viagra) in Patients With Cardiovascular Disease Circulation. 1999; 99:168-177.

Chou TC, Lin YF, Wu WC, Chu KM. Enhanced nitric oxide and cyclic GMP formation plays a role in the anti-platelet activity of simvastatin. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(6): 1281–87.

Collazo R.; Fan, L.; Hu, M.C.; et al.. Acute regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis. *J Biol Chem.* 2000; 275: 31601-608.

De la Horra MC, Calonge ML, Ilundain AA. Effect of dehydration on apical Na⁺-H⁺ Exchange activity and Na⁺-dependent sugar transport in brush-border membrane vesicles isolated from chick intestine. *Pflugers Arch.* 1998; 436: 112-16.

Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene.* 2005; 24:2909–15.

Donowitz M, Mohan S, Zhu CX, Chen TE, Lin R, Cha B, Zachos NC, Murtazina R, Sarker, Li X. NHE3 regulatory complexes. *J Exp Biol.* 2009; 212: 1638-46.

Duarte CG, Watson JF. Calcium reabsorption in proximal tubule of the dog nephron. *Am J Physiol.* 1967; 212: 1355–60.

Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, Knepper MA. Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol.* 2001; 171: 227–34.

Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, Mcmurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol Physiol.* 2004; 287: L656–L64.

Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 379-93.

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevanate pathway. *Nature.* 1990; 343:425-30.

Grundy SM. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy. *Circulation.* 1998; 97:1436-39.

Hoffert JD, Pisitkun T, Knepper MA. Phosphoproteomics of vasopressin signaling in the kidney. *Expert Rev Proteomics.* 2011; 8: 157-63.

Hummel CS, Lu C, Loo DD, Hiramayama BA, Voss AA, Wright EM. Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300(1): C14-C2.

Jakobisiak M, Golab J. Potential antitumor effects of statins (Review). *Int J Oncol.* 2003; 23(4): 1055-69.

Jiang J, Roman RJ. Lovastatin Prevents Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension.* 1997; Vol. 30(4): 968-74.

Jin XH, Siragy HM, Carey RM. Renal interstitial cGMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism. *Hypertension.* 2001; 38(3): 309-16.

Kalinowski L, Dobrucki LW, Brovkovich V, Malinski T. Increased Nitric Oxide Bioavailability in Endothelial Cells Contributes to the Pleiotropic Effect of Cerivastatin. *Circulation.* 2002; 105: 933-38.

Kálmán J, Janka Z. Cholesterol and Alzheimer's disease. *Orv Hetil.* 2005; 146(37):1903-11.

Kinne-saffran E, Beauwens R, Kinne R. An ATP driven proton pump in brush-border membranes from rat renal cortex. *J. Membr. Biol.* 1982; 64: 67-77.

Knepper MA. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1997; 272: F3–12.

Kido M, Ando K, Oba S et al. Renoprotective effect of pravastatin in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res.* 2005; 28: 1009–15.

Knepper MA, Brooks HL. Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; 10: 655–59.

Knepper MA, Nielsen S, Chou CL, Digiovanni SR. Mechanism of vasopressin action in the renal collecting duct. *Semin Nephrol.* 1994; 14: 302–21.

Koeppen BM. The Kidney and acid-base regulation. *Adv Physiol Educ.* 2009; 33:275-81.

Kurashima K, D'Souza S, Szaszi K, Ramjeesingh R, Orłowski J, Grinstein S. The apical Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 29843-49.

Lennernäs H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet.* 1997; 32(5): 403-25.

Lessa LM, Amorim JB, Fonteles MC, Malnic G. Effect of uroguanylin on hydrogen/bicarbonate ion transport in rat renal tubules. *Regul Pept.* 2009.

Li W, Zhang Y, Bouley R, Chen Y, Matsuzaki T, Nunes P, Hasler U, Brown D, Lu HA. Simvastatin enhances aquaporin-2 surface expression and urinary concentration in vasopressin-deficient Brattleboro rats through modulation of Rho GTPase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 301: F309-18.

Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* 2001; 276: 341–47.

Malnic G. CO₂ equilibria in renal tissue. *Am J Physiol.* 1980; 239: F307-18.

Marples D, Frøkiaer J, Nielsen S. Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 1999; vol. 276 no. 3, F331-39.

Mello Aires M, Malnic G. Sodium in renal tubular acidification kinetics. *Am. J. Physiol.*, 1979; 236: F434-41.

Mello Aires M, Lopes MJ, Malnic G. PCO₂ in renal cortex. *Am J Physiol.* 1990; 259: F357-65.

Mello-Aires M, Oliveira-Souza M. Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on pHi regulation in MDCK cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000; 279:F944-53.

McDonough, AA, Youn, J H. Need to quickly excrete K⁺? Turn off NCC. *Kidney Int.* 2013; 83(5): 779–782.

- Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol. Rev.* 2000; Vvol. 80, N° 4.
- Nielsen S, Digiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressinregulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 11663–67.
- Nielsen S, Smith B, Christensen EI, Knepper MA, Chip AP. 28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol.* 1993; 120: 371–83.
- Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, Frokiaer J, Marples D. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 647–63.
- Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 2002; 82: 205–44.
- Ng L. L., Davies J. E. Lipids and cellular Na^+/H^+ antiport activity in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1992; 41:872–76.
- Orlowski J, Grinstein S. Na^+/H^+ Exchangers. *Comprehensive Physiology.* John Wiley e Sons, Inc. Hoboken. NJ, USA; 2011.
- Orlowski J, Grinstein S. Emerging roles of alkali cation/próton exchangers in organellar homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19, 483-92.
- Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 9331-39.
- Pastoriza-Munoz, E.; Harrington, R.M.; Graber, M.L. Parathyroid hormone decreases HCO_3^- reabsorption in the rat proximal tubule by stimulating phosphatidylinositol metabolism and inhibiting base exit. *J. Clin. Inves.* 1992; 89: 1485-95.
- Querfurth HW, LaFerla FM. Mechanisms of disease: Alzheimer's desesase. *N Engl J Med.* 2010; 363: 329-44.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Gardner P. *Farmacologia.* Elsevier, 7 ed. 2012.
- Roczniak A, Burns KD. Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. *Am J Physiol.* 1996; 270(1 Pt 2): F106-15..
- Rodríguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, Vaziri ND. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney International.* 2005; vol. 68, pp. 2131–42.

Ruiz, O.S.; Qiu, Y.Y.; Wang, L.J.; Arruda, J.A. Regulation of the renal Na-HCO₃ cotransporter: V. Mechanism of the inhibitory effect of parathyroid hormone. *Kidney Int.* 1996; 49: 396-402.

Sandhu S, Wiebe N, Fried LF et al. Statins for improving renal outcomes: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2006–16.

Seldin DW. Renal handling of calcium. *Nephron* 81. 1999; Suppl 1: 2–7.

Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM, Kass DA. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta- adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. 2746 *Journal of the American Society of Nephrology J Am Soc Nephrol.* 2001; 17: 2742–2747, 2006 *FASEB J* 15: 1718 – 26.

Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV and Findling JW. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994; 79: 407–14.

Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000; 522 (Part 2): 177–185.

Szaszi K, Kurashima K, Kapus A, Paulsen A, Kaibuchi K, Grinstein S, Orłowski J. RhoA and rho kinase regulate the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. Role of myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 28599-606.

Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2005; 11: 214 –22.

Tanner GA, Sloan KL, Sophasan S. Effects of renal artery occlusion on kidney function in the rat. *Kidney Int.* 1973; 4: 377–89.

Thiesson HC, Jensen BL, Jespersen B, de Muckadell OBS, Bistrup C, Walter S, Ottosen PD, Veje A, Skøtt O. Inhibition of cGMP-specific phosphodiesterase type 5 reduces sodium excretion and arterial blood pressure in patients with NaCl retention and ascites. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2005; vol. 288 n. 5, F1044-52.

Tonelli M, Moye L, Sacks FM et al. Effect of pravastatin on loss of renal function in people with moderate chronic renal insufficiency and cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 1605–13.

- Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J, Donowitz M. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 9340-46.
- vanDijk MA, Kamper AM, vanVS et al. Effect of simvastatin on renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16: 2152–57.
- Vaughan CJ, Gotto AM, Basson CT. The Evolving Role of Statins in the Management of Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; Vol. 35, No. 1.
- Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP. Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev.* 2004; 84:1263-14.
- Wang X, Armando I, Upadhyay, Pascua A, Jose PA. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009; 18(5): 412–20.
- Wang T. Flow-activated transport events along the nephron. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15:530-36.
- Weder A. B., Serr C., Torretti B. A., Bassett D. R., Zweifler A. J. Effects of lovastatin treatment on red blood cell and platelet cation transport. *Hypertension.* 1991; 17:203–9.
- Weinman EJ, Wang Y, Wang F, Greer C, Steplock D, Shenolikar S. A C-terminal PDZ motif in NHE3 binds NHERF-1 and enhances cAMP inhibition of sodium-hydrogen exchange. *Biochemistry.* 2003b; 42, 12662-68.
- Wilson SH, Chade AR, Feldstein A et al. Lipid-lowering-independent effects of simvastatin on the kidney in experimental hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 703–9.
- Yasui M, Kwon TH, Knepper MA, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-6: an intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 5808–13.
- Zhu Y, Casey PJ, KUMAR AP, Pervaiz S. Deciphering the signaling networks underlying simvastatin-induced apoptosis in human cancer cells: evidence for non-canonical activation of RhoA and Rac1 GTPases. *Cell Death and Disease.* 2013; 4, e568.