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

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 remniscent 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 cGPM 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.

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.

1. 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 fluído 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 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (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 prótons, 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 (Na^+ / HCO_3^- , NBC) e pelo trocador cloreto-bicarbonato (Cl^- / 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 (Orlowski, 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 é 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 AQP2) (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 consequente 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 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC2 ou BSC-1). Já no túbulo convoluto distal, o Na^+ é reabsorvido primariamente pelo cotransportador Na^+-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 geranylgeranilpirofosfato (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, consequentemente, 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 hipertoncidade 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.

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 μ M 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.

Grundey 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 Plhysiol Educ*. 2009; 33:275-81.

Kurashima K, D'Souza S, Szaszi K, Ramjeesingh R, Orlowski 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 desease. *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, Paolucci 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, Orlowski 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, KamperAM, 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.