RAFAEL CANAVEL PEREIRA

**Influência da sobrecarga de sódio em ratos submetidos à
isquemia e reperfusão renal: tratamento com N-acetilcisteína**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa

São Paulo

2018

RAFAEL CANAVEL PEREIRA

**Influência da sobrecarga de sódio em ratos submetidos à
isquemia e reperfusão renal: tratamento com N-acetilcisteína**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Rafael Canavel Influência da
sobrecarga de sódio em ratos submetidos à
isquemia e reperfusão renal :
tratamento com N-acetilcisteína / Rafael Canavel Pereira. -
- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientadora: Luzia Naoko Shinohara Furukawa.

Descritores: 1.Isquemia 2.Reperfusão 3.Lesão renal
aguda 4.Cloreto de sódio 5.Acetilcisteína
6.Albuminúria 7.Fibrose

USP/FM/DBD-127/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8

/

DEDICATÓRIA

**Á minha família, por todo amor, zelo, esforços e sacrifícios
feitos por mim! Obrigado por tudo!**

AGRADECIMENTOS

Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa pela orientação, pela paciência e por tentar nos ajudar sempre! Obrigado por me aceitar como aluno, a levarei sempre com carinho.

À *Carolina M. Romão*, por dividir comigo durante esses quatro anos todas as tristezas, mágoas, dificuldades, assim como as alegrias, as satisfações e as gratificações deste projeto. Levarei para sempre sua amizade com carinho!

A *Ivone Braga de Oliveira* pelas brincadeiras, amizade e apoio! Muito obrigado!

À *Drª Maria Heloísa Shimizu* pelas dosagens de TBARS e pelas dúvidas sanadas durante o percurso!

À *Drª Isis Akemi Katayama Rangel*, a quem me aceitou como aluno de iniciação científica. Agradeço pelos conselhos, amizade e pela oportunidade de entrar no mundo da pesquisa.

Ao *Guilherme Marchesi*, pela amizade que levo com carinho e pelo suporte técnico no projeto. Muito obrigado!

Ao *Prof. Dr. Joel C. Heimann*, obrigado pela oportunidade, pela confiança e por todos estes anos de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Emmanuel A. Burdmann e ao Prof. Dr. Roberto Zatz por terem me aceitado no programa de pós – graduação da Nefrologia e no LIM 16.

Aos amigos *Ellen Dopona, Amanda Albino Fernanda Zambom, Lisienny Rempel, Simone Arias, Karin Carneiro, Ana Paula Calheiros, Viviane Dias* pelo dia a dia, amizade, companheirismo.

Ao grande amigo *Victor Ávila* por todo o companheirismo e amizade durante toda a graduação e no doutorado

Ao *Orestes Neto* por toda amizade e risadas, levarei sua amizade com carinho

À *Mirella* que nos ajudou com a dosagem de proteinúria.

Ao *Dr. Rildo A. Volpini* com o auxílio das quantificações de lesão renal.

Às professoras *Denise* e *Monica* do Instituto de Matemática e Estatística (IME) e suas alunas *Caroline, Gabriella* e *Joyce* pela ajuda com a análise estatística.

À *Nicole Jacob Fantato*, por toda a paciência, amor e carinho durante estes quatro anos. Obrigado pelos incentivos e por acreditar em mim!

Aos meus pais *Alceu* e *Lourdes*, pelo amor incondicional, pelos esforços para me darem a melhor educação, mesmo as vezes com dificuldades. Obrigado por acreditar em mim e nos meus sonhos. A vitória será sempre nossa!

À *Isabel Lopes Canavel*, minha avó, obrigado por ajudar também em minha educação, sempre tentando me proporcionar o melhor!

À *Mariana Canavel Pereira*, minha irmã, pelas brincadeiras, amizade. Acredite sempre em você Mari, você é capaz de conquistar o mundo!

Aos amigos do LIM 16, *Wagner, Solange, Denise, Clarice, Janice, Cláudia, Anderson*, aos alunos de doutorado e I/C por todo o suporte, amizade, companheirismo nestes quatro anos.

À *Faculdade de Medicina e ao programa de Pós-graduação da Nefrologia* por terem me aceitado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, *FAPESP*, pelo apoio financeiro ao projeto (processo no. 2013/25909-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, *CAPES*, pela concessão da Bolsa de estudos.

Normalização adotada

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Injúria Renal Aguda.....	1
1.2. Isquemia e Reperusão renal.....	3
1.3. Fatores envolvidos na progressão da IRA.....	4
1.3.1 Cloreto de sódio.....	4
1.3.2. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.....	6
1.3.3.Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	8
1.4. N-acetilcisteína.....	10
2.HIPÓTESE.....	14
3.OBJETIVOS.....	15
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Protocolo experimental.....	16
4.1.1 Animais.....	16
4.1.2. Isquemia e reperusão.....	17
4.1.3. Parâmetros avaliados.....	19
4.1.4. Coleta de amostras de sangue e urina	19
4.1.5. Evolução ponderal.....	20
4.1.6. Pressão arterial caudal.....	20
4.2. Dosagens bioquímicas.....	20
4.2.1. Proteinúria.....	21
4.2.2. Albuminúria.....	21
4.3. Histologia.....	21
4.3.1 Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS).....	22
4.3.2 Coloração com tricrômio de Masson.....	22
4.4. Expressão gênica de renina renal.....	22
4.4.1. Extração de RNA total.....	22
4.4.2. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	23
4.4.3. Expressão gênica.....	23
4.5. Status total de antioxidantes (TAS).....	24
4.6. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	24
4.7. Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Evolução ponderal.....	26
5.2. Pressão arterial	27
5.3. Consumo de dieta, consumo de água e volume urinário.....	29
5.4. Fração de excreção de sódio e potássio.....	34
5.5. Sódio, potássio, creatinina, uréia séricos.....	38

5.6. Proteinúria, clearance de creatinina e albuminúria.....	44
5.7. Massa cardíaca e renal.....	48
5.8. TAS, ácido úrico e TBARS.....	50
5.9. Análises histológicas.....	53
5.10. Expressão gênica e atividade da renina plasmática e renal.....	57
5.11. Sobrevida.....	59
6.DISCUSSÃO.....	61
6.1.Cloreto de sódio.....	61
6.2. Isquemia e reperfusão.....	63
6.3. N-acetilcisteína.....	66
7.CONCLUSÕES.....	70
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9. ANEXO.....	76

Pereira RC. *Influência da sobrecarga de sódio em ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal: tratamento com N-acetilcisteína* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A injúria renal aguda (IRA) é uma complicação renal que necessita de tratamento com urgência, gerando gastos de bilhões de dólares na saúde pública de diversos países. Dentre os tipos mais comuns de IRA é a IRA isquêmica causada por perfusão abaixo do normal ao tecido renal, gerando maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) local, necrose tubular aguda (NTA). O tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) tem resultados positivos em diversos modelos de lesão renal. Ao reestabelecer a função renal após a IRA, os pacientes devem seguir dietas restritas quanto a quantidade de proteínas e de sal, entretanto, sabe-se que o sal é um dos maiores causadores de doenças renais e é encontrado de forma exacerbada em diversos tipos de alimentos comumente consumidos no dia a dia. **OBJETIVOS:** Avaliar os efeitos da sobrecarga de sódio sobre a isquemia e reperfusão renal e verificar se o tratamento com NAC é capaz de mitigar os danos causados pela isquemia e reperfusão renal bilateral associada ao alto consumo de sódio. **ANIMAIS:** Ratos Wistar machos com seis semanas de vida foram divididos em dois tipos de dieta normossódica (NR) com 2,3% de NaCl e hipersódica (HR) com 8% e submetidos ou não (SHAM) à isquemia e reperfusão renal bilateral e tratados ou não com NAC (600 mg/L) **VARIÁVEIS:** Peso corpóreo, pressão arterial caudal, consumo hídrico e de ração, volume urinário, fração de excreção de sódio e potássio, sódio, potássio, creatinina e uréia sérica, clearance de creatinina, proteinúria e albuminúria, massas cardíaca e renal, diâmetro transverso glomerular e diâmetro transverso do cardiomiócito, fibrose intersticial renal e cardíaca, TAS, TBARS e ácido úrico, expressão gênica de renina, atividade da renina plasmática e renal, taxa de sobrevivência. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A dieta hipersódica associada à isquemia e reperfusão induziu ao aumento da albuminúria, das massas renal e cardíaca e ao desenvolvimento de fibrose intersticial cardíaca e renal, não houve diferença na atividade da renina plasmática e renal, e também no estado REDOX destes animais. NAC foi capaz de prevenir o desenvolvimento de albuminúria, o aumento das massas renal e cardíaca e formação de fibrose.

Descritores: Isquemia; reperfusão; lesão renal aguda; cloreto de sódio; acetilcisteína; albuminúria; fibrose.

Pereira RC. *Influence of sodium overload in rats submitted to renal ischemia and reperfusion; N -acetylcysteine treatment* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

ABSTRACT: Acute kidney injury (AKI) is a renal complication that requires urgent treatment and the most common types is ischemic AKI caused by below normal perfusion to renal tissue, generating high production of reactive oxygen species (ROS), tissue renin angiotensin aldosterone system (RAAS) activation, and acute tubular necrosis (NTA). The antioxidant N-acetylcysteine (NAC) treatment have shown positive results in several renal injury models. After reestablishment of renal function, patients should be submitted to protein and salt restriction diet. Salt is known to be a major cause of kidney disease.

OBJECTIVES: To evaluate the effects of sodium overload on renal ischemia and reperfusion and to verify if NAC treatment was able to mitigate the damage caused by bilateral renal ischemia and reperfusion associated with high sodium consumption in diet.

ANIMALS: Six-week-old male Wistar rats were divided in normal sodium (NS - 1.3% NaCl) or high sodium (HS – 8.0% NaCl) diet group. Both diet group were submitted to bilateral renal reperfusion and ischemia or not (SHAM), treated or not with NAC (600mg/L).

VARIABLES: Body weight, tail blood pressure, water and feed intake, urinary volume excretion, sodium and potassium excretion, sodium, potassium, serum creatinine and urea, creatinine clearance, proteinuria and albuminuria, cardiac and renal masses, transverse diameter glomerular and transverse diameter of the cardiomyocyte, renal and cardiac interstitial fibrosis, TAS, TBARS and serum uric acid, renin gene expression, plasma and renal renin activity, survival curve.

RESULTS AND DISCUSSION: The high sodium diet associated to ischemia and reperfusion induced to albuminuria; increased renal and cardiac mass and to development of cardiac and renal interstitial fibrosis. However, plasma and renal renin activity and REDOX status were not changed. NAC was able to prevent the albuminuria, renal and cardiac hypertrophy, and fibrosis formation.

Descriptors: ischemia; reperfusion; acute kidney injury; sodium chloride; acetylcysteine; albuminuria; fibrosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Injúria Renal Aguda

A injúria renal aguda (IRA) é caracterizada por envolver diversos fatores, difícil diagnóstico e alta taxa de mortalidade, principalmente em ambiente de terapia intensivo (Ali et al.,2007; Hsu et al.,2007). Pacientes com IRA são mais propensos ao desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) e os fatores que contribuem para a IRA e a provável progressão para a DRC podem ser, dentre eles: hipertensão arterial, senilidade, diabetes mellitus, alto consumo de sal, ativação do SRAA e estresse oxidativo (Chawla et al., 2014; Coca et al., 2012; Lo et al., 2009; Lakhmiret al.,2014).

Considerada uma emergência médica e de alta incidência, a ocorrência da IRA varia em torno de 2.147 a 4.085 casos por milhão de habitantes por ano em países desenvolvidos, gerando preocupação em nível de saúde pública (Ali et al.,2007; Hsu et al.,2007). Dentre todas as admissões hospitalares, 3,6 a 9,2% dos pacientes desenvolvem IRA e a taxa de mortalidade chega aos 20% dentre esses pacientes. Na terapia intensiva a incidência de IRA é em torno de 50% dos pacientes, 4,0 a 6,0% necessitam de terapia de substituição renal, e a taxa de mortalidade chega a ser superior aos 50% (Fang et al.,2010; Lafrance et al.,2010; Uchino et al.,2005).

No guia *Kidney Disease Improving Global Outcome* (KDIGO) caracterizam a IRA como sendo um incremento de $\geq 0,3$ mg/dL na concentração de creatinina

sérica em 48 horas, ou creatinina $\geq 1,5$ mg/dL nos últimos sete dias ou ainda um volume urinário $< 0,5$ L/kg/h por seis horas (KDIGO, 2012). Segundo Yu e colaboradores (2012) a IRA pode ser classificada como:

- IRA pré-renal: a lesão acontece por hipovolemia, levando menor aporte sanguíneo aos rins, e é comumente revertida se houver reposição de fluídos. Caso não haja reposição e não revertida em tempo, pode tornar-se numa IRA renal.

- IRA renal: a lesão acontece por dano ao tecido renal, trata-se da perigosa IRA. Substâncias nefrotóxicas tais como medicamentos quimioterápicos, contraste iodado e peçonhas animais podem causar danos diretos aos rins.

- IRA pós-renal: o insulto acontece nas vias urinárias, bloqueando a passagem de urina, ocorre geralmente nos ureteres e bexiga. Pode ser causada por litíase, hiperplasia benigna da próstata e tumores. Se houver a remoção do agente bloqueador, o fluxo urinário se restaura normalmente e a IRA é revertida.

Anteriormente, considerava-se que após o reestabelecimento da função renal para níveis normais, aqueles acometidos por IRA não apresentariam riscos de progressão para DRC, hoje, entretanto, nota-se que estes pacientes apresentam maiores chances de desenvolvimento de DRC e progressão para doença renal em estágio terminal (ESRD) e este risco aumenta devido ao tempo e ao número de episódios de IRA que acometeram o indivíduo (Chawla et al., 2014; Coca et al., 2012; Lo et al., 2009; Lakhmiret et al., 2014; Mehta et al., 2015).

1.2. Isquemia e reperfusão renal

A lesão renal causada pela isquemia e reperfusão é uma das maiores causas de IRA em ambientes hospitalares, aumentando as chances de morbidade e mortalidade (Turner et al.,2014). A condição de isquemia renal leva a ativação do SRAA local (Djaravan, 2006) e também a desestabilização da membrana dos lisossomos, mudanças na estrutura das células (Sugiyama et al.,1988) e inibição da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ (Kato et al.,1988; Kako et al.,1987). Essa inibição da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, além de ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) leva a retenção de sódio e água no meio intracelular o que acarreta em edema (Kosteradski e Kowinski, 2008).

A isquemia, fase inicial do insulto, diminui o fluxo sanguíneo aos tecidos, a falta de oxigênio e nutrientes provenientes do sangue causam danos à medula renal, esta falta de oxigênio leva a morte celular, especialmente na região tubular, por necrose tubular aguda (NTA). A reperfusão reestabelece o aporte sanguíneo, entretanto, há acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ocorre lesão endotelial o que promove a adesão de plaquetas e infiltração de neutrófilos, interferência na homeostase iônica celular e respostas inflamatórias devido à morte celular causada pela isquemia (Minutolli et al.,2016).

Os rins são particularmente sensíveis à isquemia, pois, apesar de desempenharem sua função praticamente em regime de hipóxia, a região medular necessita de aporte de oxigênio para realizar suas funções. A demanda correta de oxigênio é necessária, pois está envolvida em processos como a formação de adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO) e ROS (Aksu et al.,2011).

1.3. Fatores envolvidos na progressão da IRA

1.3.1. Cloreto de sódio

O cloreto de sódio, também conhecido como sal de cozinha (NaCl) é um dos principais condimentos utilizados na culinária mundial. Atualmente, o acesso ao sal é maior comparado a séculos átras. Há referências que em relação aos primeiros Homo sapiens, o consumo de sal aumentou drasticamente, passando de 0,5 g/dia obtido por meio de alimentos naturais não processados, para 12,0 g/dia em média (McCregor et al.,1998; He et al.,2011), este valor é superior ao dobro do que o indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que seria por volta de 5,0 g/dia (Brown et al.,1988).

A ingestão de sal ao longo dos anos está relacionada a implicações relevantes ao sistema cardiovascular e renal. Meneely e colaboradores (1953) estudaram os efeitos de sete diferentes concentrações de cloreto de sódio na dieta em ratos Sprague Dawley, foram elas: dieta com baixo teor de sal (ração I)-0,01%, dieta controle (ração II)-0,15%, ração III 2,8%, ração IV-5,6%, ração V-7,0%, ração VI-8,4% e ração VII-9,8% de NaCl. Os resultados desse estudo evidenciaram que quanto maior o conteúdo de sal na dieta, maiores efeitos sobre o fenótipo do animal, como edema, maiores massas cardíaca e renal, aumento do fluido intersticial e aumento da pressão arterial em relação à dieta controle (ração II) (Meneely et al.,1953).

Um estudo anterior a esse, demonstrou que ratos alimentados com dieta rica em cloreto de sódio (5,0%) apresentaram um aumento da fibrose intersticial nos rins (Campbell,1946).

Em um estudo publicado em 2007, Spurgeon-Peachman e colaboradores estudaram ratos machos Sprague Dawley que passaram por isquemia e reperfusão renal (I/R) bilateral por 45 minutos ou cirurgia fictícia SHAM pelo mesmo período e foram acompanhados por 63 dias. Trinta e cinco dias após a cirurgia, os grupos foram divididos de acordo com a dieta, antes todos os animais recebiam dieta com baixa concentração de cloreto de sódio (0,4%), o grupo SHAM e o grupo I/R foram divididos em dois, um grupo SHAM continuou com dieta 0,4% de NaCl, e outro passou a ser alimentado com 4,0% de NaCl, assim como o grupo I/R. Os animais foram acompanhados por mais 28 dias, sendo sacrificados 63 dias após a cirurgia. Os resultados mostraram que o incremento do sal na dieta após a I/R aumentou a pressão arterial evidenciando que o dano prévio causado aos rins pela isquemia e reperfusão comprometeu o balanço do sódio. A proteinúria e albuminúria destes animais também estavam aumentadas em relação ao grupo SHAM, o que pode evidenciar problemas na barreira de filtração glomerular. O clearance de creatinina, assim como a análise de fibrose intersticial, tanto na região medular como na região cortical mostraram que os ratos isquemiados com adição de sal perderam função renal em comparação aos outros grupos, evidenciando que o sal piora a lesão causada pela isquemia e reperfusão (Spurgeon-Peachman et al.,2007).

Uma dieta com alto consumo de vegetais e pouco consumo de sódio, no entanto, acarreta em diminuição da excreção do sódio e aumento da excreção de potássio (Denton,1982; Page et al.,1974; Sinnott et al.,1973; Oliver et al., 1975; Oliver et al.,1981). As tribos indígenas Ianomami e da Nova Guiné, as quais a excreção de sódio varia entre 1 – 10 mmol/dia e de potássio entre 80-200 mmol/dia mostraram que a pressão arterial não aumenta com o passar do

tempo e há pouca incidência de doenças cardiovasculares (Denton,1982; Page et al.,1974; Sinnott et al.,1973;Oliver et al., 1975; Oliver et al.,1981). Em estudo publicado na Nature, chimpanzés adultos foram submetidos à dieta rica em sal (15,0 g/dia) e divididos em dois diferentes grupos, por 2,5 anos, neste período ambos os grupos estavam hipertensos, entretanto, após estes 2,5 anos, um dos grupos de animais passou a ser alimentado sem a adição de sal e os resultados mostraram que os animais deste grupo voltaram a apresentar pressão normal (Denton et al.,1995). Estes estudos mostraram que o aumento da pressão arterial está relacionado ao sal, e os mecanismos pelos quais o sal induz a hipertensão arterial podem estar relacionados com o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) (Leenen e Yuan,1998) e a ativação do sistema renina angiotensina e aldosterona tecidual (SRAA) (Hodge et al.,2002; Nishiama et al.,1995; Ferreira et al.,2010; Katayama et al.,2014).

1.3.2. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

O SRAA é um importante regulador da pressão arterial e do balanço hidroeletrolítico. Órgãos como fígado, rins e pulmões e as glândulas adrenais tem importante papel na produção dos componentes do SRAA e o que define sua atividade é o conteúdo de sódio na circulação.

Figura 1. Ativação da via canônica do SRAA (Guyton e Hall, 2006)

O angiotensinogênio, peptídeo sintetizado no fígado é clivado em angiotensina I pela renina, enzima sintetizada pelas células justaglomerulares. A angiotensina I é um decapeptídeo, sem ações biológicas, o epitélio pulmonar sintetiza a enzima conversora de angiotensina (ECA) que cliva a angiotensina I em angiotensina II (ANGII), octapeptídeo com ações biológicas, que age em dois principais receptores transmembranos acoplados a proteína G, chamados de receptor da ANG II do tipo (AT1) ou receptor da ANG II do tipo 2 (AT2), (Figura 1). Quando ligada ao receptor AT1, a ANG II gera efeitos como: antinatriurético, liberação de vasopressina e aldosterona, vasoconstrição, proliferação celular, liberação de espécies reativas de oxigênio, alguns destes efeitos geram respostas pró fibróticas e hipertensivas (Fyhrquist e Saijonman, 2008). Em contrabalanço, quando acoplada ao receptor AT2 gera efeitos como vasodilatação, inibe a proliferação celular, promove a natriurese, o que potencialmente gera respostas antihipertensivas e antifibróticas (Carey e Padia, 2008; Padia et al., 2008).

Ingestão de altas concentrações de sódio inibe o SRAA circulante (Guyton e Hall, 2012), entretanto, há evidências hoje de que há regulação independente do SRAA em tecidos específicos como rins e coração (Katayama et al., 2014; Ferreira et al., 2010). Em estudos prévios realizados em nosso laboratório (Ferreira et al., 2010) ratos Wistar machos foram alimentados com dieta hipersódica I (4% NaCl) ou hipersódica II (8% NaCl), os resultados indicaram que apesar da inibição do SRAA circulante, houve ativação deste sistema no miocárdio, acarretando em hipertrofia miocárdica. Katayama e colaboradores (2014) submeteram a mesma espécie de animal à dieta hipersódica (8,0% NaCl), os resultados indicaram hipertrofia cardíaca e aumento de expressão gênica e proteica do receptor AT1 (Katayama et al., 2014) e estes dados corroboram com os apresentados por Barker e colaboradores (1992) e DeMello et al (2000) que propunham regulação autônoma do SRAA tecidual em relação ao circulante (Barker et al., 1992; DeMello et al., 2000).

A ativação do SRAA está relacionada a diferentes patologias como, hipertrofia miocárdica e hipertensão arterial (Ferreira et al., 2010; Yu et al., 2009; Katayama et al., 2014), DRC e IRA (Nishiyama et al., 2002; Wolff et al., 2003). Além dos efeitos que a ANG II causa quando acoplada ao seu receptor AT1, o que será abordado é a geração de espécies reativas de oxigênio, que em desbalanço geram um fenômeno chamado de estresse oxidativo, associado a muitas enfermidades, entre elas a IRA (Finkel et al., 1999; Shah et al., 2004).

1.3.3. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) participam de diversos processos fisiológicos tais como, a fecundação, a implantação do ovócito e a fagocitose

(Zaffarulah et al.,2002; Shin et al.,2013). Por serem moléculas reativas, elas podem se acoplar ao DNA, aos lipídeos e proteínas, (Yu, 1994) levando ao dano celular e até a morte celular. De modo sucinto, o mecanismo de defesa contra excesso de ROS inicia-se através de uma cascata que envolve um fator de transcrição nuclear, o *nuclear factor erythroid derived 2 like 2* (NFE2L2 ou NRF2). O NRF2 é um estimulador de antioxidantes, quando há aumento de ROS, o NRF2 é liberado para penetrar ao núcleo, lá ele se associa a proteínas sintetizadas pelo fator de transcrição músculo-aponeurótico fibrosarcoma (MAF), formando elementos responsivos antioxidantes (RES) e por consequência aumentam a síntese da glutatona, superóxido dismutase e a catalase como resposta ao aumento de ROS (Hu et al ,2014; Jeong et al.,2013).

O desequilíbrio entre a produção de antioxidantes e de oxidantes leva a uma situação patológica chamada de estresse oxidativo. Este desequilíbrio pode favorecer o desenvolvimento de patologias, tais como as citadas na figura 2.

Figura 2. Esquema do balanço entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes e doenças relacionadas ao desbalanço entre eles. (adaptado de Finkel et al 1999; Shan e Channon,2001)

A hipóxia causada pela IRA isquêmica, especialmente nos túbulos proximais leva a uma produção exacerbada de ROS, conseqüentemente há a diminuição de diversos antioxidantes, dentre eles a glutathione, o mais abundante tiol intracelular (Enns e Cowan,2017). A concentração intracelular de glutathione varia entre 0.5 μ M até 10 μ M (Enns e Cowan,2017) e é sintetizada no citosol. Sua forma reduzida, conhecida como glutathione reduzida (GSH) é fundamental no controle do estado redox (Cadenas 2004; Lash,2006), atua primariamente no citoplasma, entretanto, tem importante função em organelas como mitocôndria e retículo endoplasmático (Enns e Cowan,2017).

Os estudos sobre espécies reativas de oxigênio aumentaram a partir da década de 1990 e diversos antioxidantes estão sendo estudados e um dos que mais se destacam é a N-acetilcisteína.

1.4. N-acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína é utilizada desde meados dos anos 1950 no tratamento de doenças respiratórias por ser um agente mucolítico, e a partir de 1970 iniciou-se o uso para desintoxicação por sobrecarga de paracetamol (Cotgreave,1997). NAC é caracterizado por ter um grupamento tiol em sua estrutura molecular e o aminoácido cisteína o torna capaz de aumentar a produção da glutathione (Bernard et al.,1984; Smillstein et al.,1988). Estudos em camundongos C57BL/J6 submetidos à uninefrectomia direita e obstrução ureteral tratados ou não com NAC mostraram que a obstrução e uninefrectomia causaram a ativação do SRAA renal, aumentando a produção de H₂O₂, porém, o tratamento com NAC diminuiu colágeno, TGF- β , α -actina, mostrando assim uma capacidade

antifibrótica e anti-inflamatória da NAC (Shen et al., 2016). Em outros estudos, ratos Wistar machos foram tratados com três drogas para avaliação de hipertrofia cardíaca: losartan, cloridrato de hidralazina e NAC. Os animais que foram submetidos à dieta rica em sódio e ao tratamento com losartan e hidralazina reduziram a pressão arterial, entretanto, ao serem avaliados os corações destes animais o grupo que recebeu losartan não apresentou hipertrofia e fibrose cardíaca. O tratamento com hidralazina mostrou um aumento da expressão gênica e atividade do receptor AT1 cardíaco em relação ao grupo controle e ao grupo-losartan indicando que a hipertrofia poderia estar relacionada ao SRAA. O grupo tratado com NAC não diminuiu a pressão arterial, pelo contrário, aumentou consideravelmente, todavia, não apresentou hipertrofia e fibrose cardíaca e a expressão gênica e proteica do receptor AT1 foi menor em relação ao grupo tratado com hidralazina indicando importante participação do SRAA na fibrose e hipertrofia cardíaca e corroborando com os resultados de Shen et al (2016). Em outro estudo, os efeitos da NAC em animais submetidos a tratamento com L-NAME (L- nitro arginina metil éster), antagonista da L-arginina, foram avaliados em ratos adultos machos com 12 semanas de idade separados em dois grupos, um tratado somente com L-NAME (60mg/kd/dia) e outro tratado com L-NAME na mesma dosagem e NAC (1.5g/kg/dia, 20 g/L na água de beber). Os resultados foram interessantes, a pressão arterial diminuiu com a administração de NAC, além disso, os animais tratados com L-NAME apresentaram menor expressão de óxido nítrico sintase (NOS), contudo, o grupo com L-NAME+NAC apresentou maior expressão de NOS (Rauchova et al.,2005), o NO é um importante vasodilatador e isto pode explicar o porquê da diminuição da pressão arterial destes animais.

Em diferente estudo, ratos submetidos a choque hemorrágico receberam somente 33 mL/kg de Ringer lactato como fluido de ressuscitação ou, 33 mL/kg de Ringer com 150 mL/kg de NAC, sabe-se que o choque hemorrágico é uma das condições de IRA pré-renal por hipovolemia e consequente isquemia e reperfusão renal. Foram avaliadas as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), importante marcador de peroxidação lipídica, e outros parâmetros de lesão renal e verificou que o grupo que recebeu NAC diminuiu o TBARS, evidenciando o seu papel antioxidante. No grupo tratado somente com Ringer lactato foram observados dilatação tubular, inflamação intersticial, necrose tubular e apoptose no tecido renal, porém, os animais tratados com Ringer lactato e NAC apresentaram diminuição destes danos renais, sugerindo papel anti-inflamatório e de proteção renal (Moreira et al., 2016).

Também foram estudados os efeitos da NAC em pacientes com DRC e que iriam passar por cirurgia de bypass cardiopulmonar, sabe-se que tanto a DRC quanto essa cirurgia apresentam riscos para o desenvolvimento de IRA. Para dar prosseguimento ao estudo foram aptos a participar 70 pacientes divididos em dois grupos, tratados ou não com NAC. Os resultados mostraram que a incidência de IRA foi de 50,7% dentre os pacientes que não receberam N-acetilcisteína, enquanto que dentre os que receberam NAC, a incidência de IRA foi de 28,6% (Santana et al., 2014).

Os estudos dos efeitos da NAC sobre o consumo da carambola indicam que NAC aumentou o volume urinário em relação ao grupo controle, além disso, melhorou a relação TBARS/GSH e diminuíram a concentração de oxalato urinário, a lesão tubular causada pelo oxalato e a deposição de oxalato de cálcio

nos rins. Além disso, NAC diminuiu a glomeruloesclerose, a infiltração intraglomerular e intersticial de macrófagos nos glomérulos e no interstício (Shimizu et al., 2016).

A senilidade é uma das causas para o desenvolvimento de complicações renais e os efeitos da NAC sobre danos causados pela senilidade foram estudados em ratos Wistar. Os dados mostraram que NAC foi capaz de aumentar a expressão de aquaporina, da expressão da proteína klotho que está relacionada com a juventude celular, diminuir os níveis de TBARS, mostrando que o estresse oxidativo pode estar envolvido com o desenvolvimento de doença renal pela senilidade. Além disso, a NAC aumentou o clearance de inulina e a expressão do co-transportador NKCC2, indicando melhora na filtração glomerular (Shimizu et al., 2012).

Esses estudos mostram que tanto o estresse oxidativo como o SRAA estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de doenças renais, assim como, mostram que a N-acetilcisteína é capaz de atenuar os danos em diversos modelos de doenças renais, entretanto, ainda não foi estudado o efeito da NAC em um modelo de isquemia e reperfusão renal associado à ingestão de dieta com conteúdo elevado de sódio em longo prazo.

2. HIPÓTESE

A hipertensão arterial é um dos maiores problemas de saúde pública em diversos países. O consumo elevado de sal está diretamente associado com a maior incidência e prevalência de hipertensão, ambos, independentemente, são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças renais como IRA e DRC.

Na fisiopatologia da IRA há diversos mecanismos que lesam tanto glomérulos como túbulos, resultando em danos corticais e medulares. Na IRA isquêmica, os túbulos são mais prejudicados em relação aos glomérulos, isto pela necessidade da medula em ter o aporte correto de O₂, gerando desbalanço na produção de antioxidantes e oxidantes, resultando no estresse oxidativo. Diversos estudos indicam que NAC é capaz de atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo em diversos tipos de lesões renais, nossa hipótese seria que a NAC poderia ser capaz de mitigar os danos da IRA associada ao consumo elevado em longo prazo de sódio na dieta em ratos Wistar machos.

3. OBJETIVOS

1. Avaliar os efeitos do consumo crônico com elevado conteúdo de sódio na dieta após o insulto da isquemia e reperfusão;
2. Verificar se N-acetilcisteína é capaz de atenuar os danos causados pela IRA associado ao consumo crônico com conteúdo elevado de sódio na dieta em ratos Wistar machos adultos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Protocolo experimental:

Figura 3. Protocolo experimental e as variáveis avaliadas ao longo do estudo (semanas)

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP, sob o número 175/15.

4.1.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, provenientes do Centro de Biotério da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado a 22°C, ciclo de luz de 12 horas (claro e escuro) e foram fornecidos ração e água *ad libitum*.

Todos os animais receberam dieta comercial (CR-1, QUIMTIA – Colombo PR-Brasil), no período considerado basal, da 6ª até a 8ª semana de vida, quando passaram a ser alimentados com dieta normossódica (1,3% NaCl, 25,0% proteína – NR) ou hipersódica (8,0% NaCl, 25,0% proteína - HR; Harlan Laboratories, Madison, WI 53744-4220, USA). Receberam ou não N-acetilcisteína (NAC, 600mg/L, Sigma - Aldrich) na água de beber.

4.1.2. Isquemia e reperfusão renal (I/R)

A IRA foi induzida por meio de isquemia e reperfusão renal bilateral na 10ª semana de vida nos grupos experimentais. Primeiramente os animais foram anestesiados com 0,15 mL/100g de peso corpóreo da mistura de 20 mg/mL xilazina e 50 mg/mL ketamina (2:5 vol/vol), em seguida, por meio de incisão abdominal, as artérias renais de ambos os rins foram isoladas e clampeadas levando à isquemia renal, mantida por 45 minutos, quando os clamps foram retirados a reperfusão sanguínea foi restabelecida, observada pela mudança de cor do tecido renal. Após a I/R, os animais foram suturados e receberam tratamento analgésico com Tramadol (5mg) (Peachman et al. 2009). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com materiais esterilizados.

Grupos experimentais

SHAM NR: Ratos submetidos à cirurgia SHAM alimentados com dieta normossódica e água *ad libitum*;

SHAM HR: Ratos submetidos à cirurgia SHAM alimentados com dieta hipersódica e água *ad libitum*;

IR-NR: Ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal alimentados com dieta normossódica e água *ad libitum*;

IR-HR: Ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal alimentados com dieta hipersódica e água *ad libitum*;

IR-NR+NAC: Ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal alimentados com dieta normossódica e NAC - 600mg/L na água de beber *ad libitum*;

IR-HR+NAC: Ratos submetidos à isquemia e reperfusão renal alimentados com dieta hipersódica e NAC - 600mg/L na água de beber *ad libitum*.

Na 20ª semana de vida, os animais foram anestesiados com 0,20mL/100g peso corpóreo da mistura de 20mg/mL de xilazina e 50mg/mL ketamina (2:5 vol/vol) Para as amostras de plasma e soro, a coleta de sangue foi realizada por punção da aorta abdominal e depois foram removidos rins, coração, tíbias e fêmures. O comprimento da tíbia e de fêmur foi determinado usando o paquímetro (Vonder 150 mm Paraná, Brasil) e as massas renal (esquerda e direita) e cardíaca foram determinadas numa balança analítica e corrigidas pelo comprimento do fêmur de cada animal. Coração e rins foram armazenados em freezer -80°C para análises moleculares e em solução com formol para análises histológicas.

4.1.3. Parâmetros avaliados

Os parâmetros de acompanhamento dos animais durante o protocolo experimental, tais como: massa corpórea, pressão arterial caudal, volume urinário, ingestão hídrica, ingestão de dieta; creatinina, ureia, sódio, potássio séricos e urinários, atividade da renina plasmática foram determinados nos períodos, pré-cirurgia, 1^a, 2^a, 4^a, e 10^a semana pós-cirurgia. A evolução ponderal foi avaliada semanalmente durante todo o protocolo.

4.1.4. Coleta de amostras de sangue e urina durante o período experimental

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da veia caudal dos animais pré-aquecidos a 40°C por 10 a 15 minutos. Para a obtenção do plasma, as amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA 3,8%, pH 5,0 e para obtenção do soro, as amostras de sangue foram coletadas em tubo seco, ambos mantidos em gelo até a centrifugação em 4°C a 3.000 rpm por 15 minutos. Volume urinário, o consumo de ingestão hídrica e de dieta foram avaliados por meio de acondicionamento individual dos animais em gaiola metabólica de acrílico (modelo 650-0100, Nalgene Brand Products - New York, EUA). Primeiramente os animais passaram por um período de 24 horas de adaptação seguido de 24 horas de coleta. Os ratos foram mantidos com quantidades conhecidas de dieta e água, ao término deste período os animais foram retirados das gaiolas e o consumo de ração, água e excreção do volume urinário foram mensurados. Todas as amostras de soro, plasma e urina foram armazenadas à -20°C para análises posteriores.

4.1.5. Evolução ponderal

Os animais foram pesados semanalmente para determinação do seu peso corpóreo a partir da 6ª semana de idade até uma semana antes da sua eutanásia em balança específica para animais (Marte, São Paulo, Brasil).

4.1.6. Pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal (PAC) dos animais foi aferida por método oscilométrico utilizando cuff de oclusão e sensor de pulso (Kent Scientific Corporation, USA, modelo RTBP 2045), ambos colocados suavemente sobre a cauda de cada animal. O princípio deste método é baseado na detecção da distensão do vaso arterial causada pelo pulso do sangue que flui através da cauda e captado pelo sensor de pulso pizo eléctrico altamente sensível, sendo que os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica.

As medidas foram realizadas com os animais acordados e pré-aquecidos a 40° C por 10 a 15 minutos. Foi considerada a média de 5 aferições consecutivas, apenas das medidas obtidas na ausência de movimentação do animal.

4.2. Dosagens bioquímicas

As dosagens de ureia, creatinina e ácido úrico sérico e urinário foram realizadas com os kits Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa, Minas Gerais – Brasil, utilizando o equipamento Cobas Mira Plus (Roche Diagnóstica, Mannheim, Alemanha). Sódio e potássio séricos e urinários foram determinados por meio de fotômetro de chama (FC 280, CELM® – São Paulo, Brasil). Para a análise da atividade proteica de renina renal e plasmática foi utilizado radioimunoensaio seguindo as instruções do kit (Angiotensin I kit, Beckman Coulter, Inc. IMMUNOTECH, Praga, Rep. Checa).

4.2.1. Proteinúria

A proteinúria dos animais foi avaliada pelo método turbidimétrico sulfosalicílico. Para cada 1 mL de urina foi utilizado 3 mL de ácido sulfosalicílico 3% seguido de incubação de 5 minutos. Após este período foi adicionado 6 mL de água destilada seguida da leitura em espectrofotômetro (modelo FC 280, CELM – São Paulo, Brasil) comprimento de onda 620 nm. Expressa em g/volume urinário em 24h.

4.2.2. Albuminúria

Para avaliar a albuminúria destes animais foi utilizado o ensaio de ELISA de acordo com o fabricante. *Rat Albumin ELISA kit* (Bethyl Laboratories, Inc.).

4.3. Histologia

Para a realização do processo de parafinização, rins e corações foram retirados da solução de tampão fosfato em formol 10% e colocados em caixetas perfuradas e identificadas, para a inclusão do tecido em parafina. Este processo de inclusão foi realizado pelo processador automático de tecido “histokinette” (Jung- Histokinette 2000 Leica- Nussloch, Alemanha) por um período de 14 horas. Após este período de inclusão, os blocos foram cortados em cerca de 5µm através de micrótomo (Jung,EUA).

4.3.1. Coloração com ácido periódico de Schiff (PAS)

Após o processo de desparafinização, diafanização e hidratação as lâminas coradas com PAS, foram digitalizadas (Pannoramic Desk, 3D HISTECH, Budapeste, Hungria) para análise do diâmetro transverso dos cardiomiócitos e diâmetro glomerular através do software *Pannoramic viewer* (3D, HISTECH, Budapeste, Hungria) sob um aumento de 400x.

4.3.2. Coloração com tricrômio de Masson

Após o processo de desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram coradas com tricrômio de Masson para medir a porcentagem de fibrose intersticial nos tecidos renal e cardíaco. Estas medidas foram analisadas através do software *Pannoramic Viewer* (3D, HISTECH, Budapeste, Hungria). Foram contados os pontos que correspondem à área ocupada pela fibrose (coloração azul).

4.4. Expressão gênica de renina renal

4.4.1. Extração do RNA total

Os tecidos renais armazenados em *freezer* -80°C foram pesados e colocados em tubo de ensaio de plástico estéril. Foi acrescentado 1 mL de Trizol (Ambion, *Life Tech*, EUA) para cada 100 mg de tecido e homogeneizados em aparelho Ultra- Turrax (T-25, IKA Works Inc., EUA).

O homogenato foi transferido para um tubo de 2 mL, livre de RNase e DNase, e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Este homogenato foi centrifugado a

12.000x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio para separação da amostra em fase orgânica e inorgânica. Esta solução foi homogeneizada no vórtex e incubada à temperatura ambiente por 2 minutos e a seguir foi centrifugada por 15 minutos, a 4°C e 12.000x g. A fase incolor da solução foi transferida para outro tubo ao qual foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico. A solução foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada por 10 minutos, a 4°C e 12.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1 mL de etanol 75 % gelado. Novamente o material foi centrifugado (12.000 x g, 5 minutos, 4°C) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspendido com 100 µL de água MilliQ e esta solução foi incubada em banho seco a 65° C por 10 minutos. As amostras de RNA total isoladas foram armazenadas em freezer -80°C.

4.4.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

A partir do RNA total isolado, foi feita a reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA utilizando o kit o ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para a síntese utilizou-se termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA)

4.4.3. Expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada através do método qPCR utilizando Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha), utilizando os primers de renina e o *housekeeping* GAPDH descritos a seguir.

Tabela 1. Sequências dos primers *sense* e *antisense* para os genes renina e controle GAPDH para *Rattus norvegicus*

Primers	
GAPDH	5' TGA TGC TGG TGC TGA GAT TGT CGT -3'
	5' TTG TCA TTG AGA GCA ATG CCA GCC -3'
Renina	5' CAT TAC CAG GGC AAC TTT CAC -3'
	5' TCA TCG TTC CTG AAG GAA TTC -3'

4.5. Status total de antioxidantes (TAS)

A quantidade total de antioxidantes no soro foi determinada no auto analyzer Cobas Mira Plus (Roche Diagnóstica, Mannheim, Alemanha) utilizando o kit TAS (RANDOX Antioxidant Products, County Antrim, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. A dosagem foi realizada em duplicata e foram utilizadas amostras de soro obtidas logo após o sacrifício dos animais e devidamente congeladas em freezer – 80°C.

4.6. Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

Amostras de 0,2 mL de soro dos animais foram utilizadas e a estas, adicionados 0,8 mL de água destilada, 1mL de ácido tricloroacético 17,5% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6% sempre em gelo. A solução foi então homogeneizada e levada a banho-maria 100°C por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram mantidas no gelo e adicionado 1 mL de ácido tricloroacético 70%. Após esta adição, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C, 3.000 rpm por 10 minutos (5702 R, Eppendorf, Alemanha). A concentração de TBARS das amostras foi determinada através do

espectrofotômetro (Genesis, ThermoCo.Denver, EUA) no comprimento de onda 543nm. O resultado foi calculado através do cálculo de coeficiente de extinção para MDA (malondialdeído) expresso em nanomol/L.

4.7. Análise estatística

Os resultados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, para a análise de variância de dois fatores (Two Way ANOVA), sendo avaliados os efeitos dos fatores dieta e cirurgia, e se houve interação entre estes fatores dos grupos estudados. Para identificar a diferença entre os grupos, o teste foi seguido do pós-teste Bonferroni. Foi adotado nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Evolução ponderal

Para a análise de evolução ponderal foi utilizado o método Two Way ANOVA para medidas repetidas. A massa corpórea dos animais foi mensurada semanalmente, entre a 6ª e 21ª semana de vida. Não houve diferença na massa corpórea entre os grupos SHAM NR e SHAM HR, I/R NR e I/R HR e I/R NR + NAC e I/R HR + NAC. Esses dados mostram que a dieta hipersódica não interferiu no ganho de massa corpórea. O tratamento com NAC também não interferiu na evolução ponderal dos animais (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Evolução ponderal dos animais alimentados com a dieta normossódica (NR) e hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). SHAM NR n=7, SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7

Figura 5. Evolução ponderal (g) dos animais alimentados com a dieta normossódica (NR) e hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) tratados com o NAC (I/R NAC) ou não (I/R). I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR + NAC n=10, I/R HR +NAC n=10

5.2. Pressão arterial

A pressão arterial foi aferida uma semana antes da cirurgia, e posterior a cirurgia; uma semana, duas semanas, quatro semanas e dez semanas. A dieta hipersódica foi fator determinante para o aumento da pressão arterial ($p < 0,0001$). O grupo SHAM HR teve maior pressão arterial entre uma semana e dez semanas após a cirurgia ($p < 0,001$) em relação ao grupo SHAM NR, assim como, o grupo I/R HR apresentou maior pressão arterial que o grupo I/R NR de duas semanas até dez semanas após a cirurgia ($p < 0,01$) (Figura 6). Ao compararmos o grupo SHAM NR e I/R NR, observamos uma maior pressão arterial no grupo I/R NR somente na 2ª semana após a cirurgia (Figura 6).

Figura 6. Pressão arterial caudal (mmHg) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$, e I/R. $p < 0,05$: a- SHAM NR vs. SHAM HR, b- I/R NR vs. I/R HR, c- SHAM NR vs. I/R NR. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$.

Como mostrado na figura 6, os animais I/R HR apresentaram maior pressão arterial em relação aos animais I/R NR. O grupo I/R HR NAC apresentou maior pressão arterial em relação ao grupo I/R NR NAC ($p < 0,05$) em todos os momentos, com exceção da 10ª semana após a cirurgia. O grupo I/R HR NAC apresentou menor pressão arterial em relação ao grupo I/R HR nas duas e quatro semanas após a cirurgia ($p < 0,05$), entretanto não houve diferença na 10ª semana pós-cirurgia, (Figura 7).

Figura 7. Pressão arterial caudal (mmHg) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC. Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$: e- I/R NR vs. I/R HR, f- I/R NR NAC vs. I/R HR NAC, h- I/R HR NAC vs. I/R HR. I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR NAC $n=10$, I/R HR NAC $n=10$

5.3. Consumo de dieta, consumo de água e volume urinário

Foram avaliados também o consumo de dieta, ingestão hídrica e excreção de volume urinário através da exposição de ratos a gaiola metabólica por 24 horas. Não houve diferença no consumo de ração entre os animais do grupo SHAM e do grupo I/R, entretanto os animais I/R HR consumiram mais dieta dez semanas após a cirurgia em relação ao grupo I/R NR (Figura 8). E ao compararmos os grupos I/R e I/R NAC, observamos que o consumo de ração foi menor nos animais do grupo I/R HR comparados ao grupo I/R HR NAC duas e dez semanas após a cirurgia (figura 9).

Figura 8. Consumo de dieta (g/24h) dos animais ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$: d- I/R NR e I/R HR SHAM NR $n=7$, SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$

Figura 9. Consumo de dieta (g/24h) dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC. Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$: e- I/R NR vs. I/R HR, h- I/R HR NAC vs. I/R HR NAC. I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR NAC $n=10$, I/R HR NAC $n=10$

Ao compararmos os animais dos grupos SHAM e I/R podemos observar que os animais dos grupos SHAM HR e I/R HR apresentaram maior consumo hídrico em relação aos grupos SHAM NR e I/R NR, em todos os períodos após a cirurgia respectivamente ($p < 0,001$) e os animais do grupo I/R HR, apresentaram maior consumo hídrico duas semanas após a cirurgia, comparados aos animais do grupo SHAM HR (figura 10).

Figura 10. Consumo hídrico (mL/24h) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$: a- SHAM NR vs SHAM HR, b- I/R NR vs I/R HR, d- SHAM HR vs I/R HR. SHAM NR $n=7$, SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$

Como mostrado na figura anterior, os animais I/R HR apresentaram maior consumo hídrico em relação aos animais I/R NR. Ao serem analisados os dados dos grupos I/R e I/R NAC, verificamos que os animais do grupo I/R HR NAC apresentaram maior consumo hídrico que os animais do grupo I/R NR NAC em

todos os períodos ($p<0,001$), entretanto, o grupo I/R HR apresentou maior consumo hídrico que os animais do grupo I/R HR NAC quatro semanas após a cirurgia (figura 11).

Figura 11. Consumo hídrico dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC, Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p<0,05$ e- I/R NR vs I/R HR, f- I/R NR NAC vs I/R HR NAC, h- I/R HR vs I/R HR NAC. I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR NAC $n=10$, I/R HR NAC $n=10$

De forma esperada, os animais dos grupos SHAM HR e I/R HR apresentaram maior volume urinário, comparados aos dos grupos SHAM NR e I/R NR, respectivamente em todos os períodos ($p<0,001$) (figura 12). O grupo I/R HR apresentou maior volume urinário quando comparado ao grupo SHAM HR nas duas e quatro semanas após a cirurgia.

Figura 12. Volume urinário (mL/24h) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$: a- SHAM NR vs SHAM HR, b-I/R NR vs I/R HR, d-SHAM HR vs I/R HR. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$

Ao serem analisados os dados dos grupos I/R e I/R NAC, temos que, os animais I/R NAC HR apresentaram maior excreção de volume urinário que os animais do grupo I/R NAC NR em todos os períodos ($p < 0,001$), entretanto, os animais do grupo I/R HR apresentaram maior excreção de volume urinário comparado aos do grupo I/R HR NAC duas, quatro e dez semanas após a cirurgia (Figura 13).

Figura 13. Volume urinário (mL/24h) dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC, Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ e- I/R NR vs. I/R HR, f- I/R NR NAC vs. I/R HR NAC, h- I/R HR vs. I/R HR NAC. I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR NAC $n=10$, I/R HR NAC $n=10$

5.4. Fração de excreção de sódio e potássio

A dieta HR influenciou na fração de excreção de sódio neste estudo. Os animais do grupo SHAM HR apresentaram maior fração de excreção de sódio em todos os momentos estudados em relação aos animais do grupo SHAM NR ($p < 0,01$). De forma interessante, os animais do grupo I/R HR também apresentaram maior fração de excreção de sódio em relação aos animais do grupo I/R NR em todos os períodos ($p < 0,05$), exceto quatro semanas após a cirurgia ($p > 0,05$) (Figura 14).

Figura 14. Fração de excreção de sódio (%) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperusão (I/R) ou não (SHAM). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$: a- SHAM NR vs SHAM HR, b- I/R NR vs. I/R HR. SHAM NR $n=7$, SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$

A fração de excreção de sódio dos animais do grupo I/R HR NAC foi maior em relação aos do grupo I/R NR NAC duas e dez semanas após a cirurgia ($p < 0,001$), (Figura 15). E ao comparamos os grupos I/R HR e I/R HR NAC observamos que, no período pré-cirurgia os animais do grupo I/R HR NAC excretaram mais sódio que os do grupo I/R HR, entretanto uma semana após a cirurgia, ocorreu o inverso, os animais do grupo I/R HR excretaram mais sódio em relação ao grupo I/R HR NAC (Figura 15).

Figura 15. Fração de excreção de sódio (%) dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC, Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$ e-I/R NR vs I/R HR, g-I/R HR VS I/R HR NAC h- I/R NR NAC vs I/R HR NAC. I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR NAC $n=10$, I/R HR NAC $n=10$

A fração de excreção de potássio foi avaliada e não houve diferenças entre os animais dos grupos I/R e SHAM (figura 16), entretanto, 10 semanas após a cirurgia de isquemia e reperfusão os animais do grupo I/R HR NAC apresentaram menor fração de excreção de potássio em relação aos dos grupos I/R NR NAC ($p < 0,05$) duas semanas após a cirurgia e I/R HR uma semana após a cirurgia ($p < 0,05$) (figura 17).

Figura 16. Fração de excreção de potássio (%) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). SHAM NR n=7, SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7

Figura 17. Fração de excreção de potássio (%) dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC. $p < 0,05$ - g-I/R HR VS I/R HR NAC h- I/R NR NAC vs I/R HR NAC . I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR NAC n=10, I/R HR NAC n=10

5.5. Sódio, potássio, creatinina e ureia séricas

Foi observado que a concentração do sódio sérico não foi diferente entre os grupos estudados, independentemente da dieta, da cirurgia e do tratamento com o NAC ($p>0,05$) figuras 18 e 20. A concentração de potássio sérico também não foi diferente entre os grupos ($p>0,05$) Figuras 19 e 21.

Figura 18. Na sérico (mEq/L) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). SHAM NR n=7. SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7

Figura 19. K sérico (mEq/L) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). SHAM NR n=7. SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7

Figura 20. Na sérico (mEq/L) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R)), tratados (I/R NAC) ou não com NAC, I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR NAC n=10, I/R HR NAC n=10

Figura 21. K sérico (mEq/L) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC, I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR NAC n=10, I/R HR NAC n=10

A creatinina sérica dos animais do grupo SHAM NR não foi diferente em relação aos do grupo SHAM HR ($p>0,05$). Os animais do grupo I/R NR apresentaram maiores níveis séricos de creatinina em uma e duas semanas após a cirurgia em relação ao grupo I/R HR ($p<0,05$). Quatro semanas após a cirurgia, os animais do grupo I/R HR apresentaram maior creatinina sérica em relação ao grupo I/R NR ($p<0,05$) (Figura 22). Os animais I/R HR, no entanto, apresentaram maiores níveis de creatinina sérica uma e duas semanas após a cirurgia em relação ao grupo SHAM HR ($p<0,05$).

Figura 22. Creatinina (mg/dL) sérica de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$, $p < 0,05$, c: SHAM HR vs I/R HR, d: I/R NR vs I/R HR. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$

Ao analisarmos a creatinina sérica entre os grupos I/R e I/R NAC não foram encontradas diferenças entre os grupos I/R NR NAC e I/R HR NAC. (Figura 23).

Figura 23. Creatinina sérica (mg/dL) dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC. $p < 0,05$. I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR NAC $n=10$, I/R HR NAC $n=10$

A ureia sérica não foi diferente entre os grupos SHAM NR e SHAM HR; I/R NR e I/R HR; SHAM NR e I/R NR e SHAM HR e I/R N/R ($p > 0,05$) (Figura 24), também não houve diferença entre os grupos I/R NR NAC e I/R NR e I/R HR NAC, assim como entre os grupos I/R HR NAC e I/R HR (Figura 25).

Figura 24. Ureia sérica (mg/dL) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM). SHAM NR n=7, SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7

Figura 25. Ureia sérica (mg/dL) dos ratos machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R+NAC) ou não com NAC. I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR + NAC n=10, I/R HR +NAC n=10

5.6. Proteinúria, clearance de creatinina e albuminúria

Não houve diferença na proteinúria entre os animais dos grupos SHAM NR e SHAM HR ($p>0,05$), assim como entre dos grupos I/R NR e I/R HR ($p>0,05$). Ao analisarmos os grupos SHAM NR e I/R NR também não foram observadas diferenças entre eles ($p>0,05$) (Figura 26).

Figura 26. Proteinúria (g/24 h) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM) $p<0,05$, c: SHAM HR vs. I/R HR. SHAM NR $n=7$, SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$

A proteinúria dos animais dos grupos I/R NR NAC e I/R HR NAC não apresentaram diferenças ($p>0,05$), assim como entre os grupos I/R NR e I/R NR NAC, e também entre os grupos I/R HR e I/R HR NAC ($p>0,05$) (Figura 27).

Figura 27. Proteinúria (g/24 h) dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC. I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR NAC n=10, I/R HR NAC n=10

Ao ser analisado o clearance de creatinina entre os grupos SHAM NR e SHAM HR não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$), da mesma forma não houve diferenças entre os grupos I/R NR e I/R HR ($p > 0,05$). O clearance de creatinina dos animais do grupo I/R HR foi menor em relação ao grupo SHAM HR uma e quatro semanas após a cirurgia ($p < 0,05$) (Figura 28).

Figura 28. Clearance de creatinina (mL/min/100g de peso corpóreo) de ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR) submetidos à isquemia e reperfusão (I/R) ou não (SHAM), Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$, $p < 0,05$, c: SHAM HR vs I/R HR. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$

Não houve diferença no clearance de creatinina entre os animais dos grupos I/R NR NAC e I/R HR NAC ($p > 0,05$). Não houve diferença entre os grupos I/R NR e I/R NR NAC e I/R HR e I/R HR NAC (Figura 29).

Figura 29. Clearance de creatinina (mL/min/100g de peso corpóreo) dos ratos Wistar machos alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos à isquemia e reperfusão (I/R), tratados (I/R NAC) ou não com NAC. I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR NAC n=10, I/R HR NAC n=10

A albuminúria foi avaliada na 10ª semana pós cirurgia. Os animais do grupo I/R HR apresentaram maior albuminúria em relação aos dos grupos SHAM HR e I/R NR ($p<0,05$) o que evidencia que a dieta hipersódica associada a uma isquemia e reperfusão renal agravou a função renal dos ratos Wistar. De modo interessante, a NAC preveniu o aumento de albuminúria nos animais do grupo I/R HR NAC quando comparados aos do grupo I/R HR ($p<0,05$) (Figura 30).

Figura 30. Albuminúria (mg/24h) dos animais dos grupos SHAM, I/R e I/R NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$, h: I/R HR vs I/R HR NAC. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR + NAC $n=10$, I/R HR +NAC $n=10$

5.7. Massa cardíaca e renal

Não houve diferenças na massa cardíaca entre os grupos SHAM NR e SHAM HR, no entanto o grupo I/R HR apresentou maior massa cardíaca em comparação ao grupo I/R NR, SHAM HR e I/R HR NAC ($p < 0,05$). Esse resultado sugere que o tratamento com NAC preveniu o aumento da massa cardíaca (Figura 31).

Figura 31. Massa cardíaca (g/cm de fêmur) dos grupos SHAM, I/R e I/R NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ # $p < 0,05$ vs I/R NR, SHAM HR e I/R HR NAC. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR + NAC $n=10$, I/R HR +NAC $n=10$

A massa renal não foi diferente entre os animais dos grupos SHAM NR e SHAM HR, no entanto a massa renal foi maior nos animais do grupo I/R HR em comparação aos dos grupos I/R NR e SHAM HR e I/R HR NAC ($p < 0,05$). Esse resultado também sugere que o tratamento com NAC preveniu o aumento da massa renal nos animais submetidos à isquemia renal associado à dieta hipersódica (Figura 32).

Figura 32. Massa renal (g/cm de fêmur) dos grupos SHAM, I/R e I/R NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ # $p < 0,05$ vs I/R NR, SHAM HR e I/R HR NAC. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR + NAC $n=10$, I/R HR +NAC $n=10$

5.8. TAS, ácido úrico e TBARS

A fim de avaliar o estado redox destes animais, três variáveis foram analisadas na 10ª semana após a cirurgia: o status total de antioxidantes (TAS), o ácido úrico e as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ao analisarmos o TAS, notamos não haver diferenças entre os grupos SHAM NR e SHAM HR, I/R NR e I/R HR, I/R NR NAC e I/R HR NAC ($p > 0,05$). Também não houve diferenças entre os grupos I/R e SHAM e I/R e I/R NAC independentemente da dieta ($p > 0,05$) (figura 33).

Figura 33. TAS (mmol/mL) dos grupos SHAM, I/R e I/R NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). SHAM NR n=7, SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NRNAC n=10, I/R HR NAC n=10

Ao analisarmos o ácido úrico notamos não haver diferenças entre os grupos SHAM NR e SHAM HR, I/R NR e I/R HR, I/R NR NAC e I/R HR NAC ($p>0,05$) (figura 34). Também não houve diferenças entre os grupos I/R e SHAM e I/R e I/R NAC independentemente da dieta ($p>0,05$).

Figura 34. Ácido úrico (mg/dL) dos grupos SHAM, I/R e I/R+NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). SHAM NR n=7. SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR NAC n=10, I/R HR NAC n=10

Ao analisarmos o TBARS notamos não haver diferenças entre os grupos SHAM NR e SHAM HR ($p>0,05$), assim como nos grupos I/R NR e I/R HR. No entanto, NAC atenuou a peroxidação de lipídeos tendo em vista que os animais dos grupos I/R NR NAC e I/R HR NAC apresentaram menor concentração de TBARS em comparação aos animais dos grupos I/R NR e I/R HR respectivamente ($p<0,05$) (figura 35).

Figura 35. TBARS (mmol/mL) dos grupos SHAM, I/R e I/R+NAC alimentados com dieta NR ou dieta HR. Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$, &- I/R NR NAC vs. I/R NR; \$-I/R HR NAC vs. I/R HR. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR NAC $n=10$, I/R HR NAC $n=10$

5.9. Análises histológicas

Em ordem de analisar a estrutura renal foram mensurados o diâmetro glomerular, o score de lesão cortical e a fibrose intersticial através do *software Panoramic viewer*.

Ao analisarmos a porcentagem de fibrose intersticial renal, não foi encontrada diferença entre os animais dos grupos SHAM NR e SHAM HR ($p > 0,05$). Entretanto, os animais do grupo I/R NR apresentaram maior porcentagem de fibrose intersticial renal em relação aos do grupo SHAM NR e I/RNAC NR, e também maior porcentagem de fibrose intersticial renal nos animais do I/R HR em relação aos do grupo I/R HR NAC ($p < 0,05$), o que indica que a isquemia e reperfusão induziu a formação de fibrose. Esse resultado demonstra que o tratamento com NAC diminuiu a porcentagem de fibrose

intersticial nos animais dos grupos I/R NR NAC e I/R HR NAC, o que indica propriedade antifibrótica e proteção a estrutura renal da NAC (Figura 36).

Figura 36. Fibrose intersticial renal (%) dos grupos SHAM, I/R e I/RNAC alimentados com dieta NR) ou dieta hipersódica (HR). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$, * - I/R NR vs. SHAM NR, # - I/R HR vs. SHAM HR. SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR+NAC $n=10$, I/R HR+NAC $n=10$

Não houve diferença no diâmetro glomerular renal nos animais dos grupos SHAM NR e SHAM HR, assim como I/R NR e I/R HR o que indica que tanto a dieta hipersódica, assim como a isquemia e reperfusão não alteraram a estrutura glomerular. Além disso, não houve diferença no diâmetro glomerular nos animais do grupo I/R+NAC, indicando que o NAC também não causou alteração do diâmetro glomerular ($p > 0,05$) (Figura 37).

Figura 37. Diâmetro glomerular (uM) dos grupos SHAM, I/R e I/R+NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). SHAM NR n=7. SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR+NAC n=10, I/R HR+NAC n=10

Para a análise da estrutura cardíaca, foram verificados o diâmetro transverso do cardiomiócito e a fibrose intersticial cardíaca.

Para verificar a hipertrofia cardíaca com a coloração PAS e a fibrose intersticial cardíaca através da coloração de tricrômio de Masson, estas duas variáveis foram mensuradas pelo software *panoramic viewer*.

Ao analisarmos a fibrose intersticial cardíaca, verificamos que a dieta hipersódica não causou a fibrose, entretanto quando associada a isquemia e reperfusão renal, verificamos maior fibrose no grupo I/R HR comparado ao grupo SHAM HR, entretanto o tratamento com NAC preveniu o desenvolvimento de fibrose (Figura 38). O diâmetro transverso do cardiomiócito não apresentou diferença entre os grupos analisados ($p>0,05$) (Figura 39).

Figura 38. Fibrose intersticial cardíaca (%) dos grupos SHAM, I/R e I/R+NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$ $p < 0,05$ # I/R HR vs SHAM HR. @ I/R HR vs I/R HR NAC. SHAM NR $n=7$, SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR+NAC $n=10$, I/R HR+NAC $n=10$

Figura 39. Diâmetro do cardiomiócito (uM) dos grupos SHAM, I/R e I/R+NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). SHAM NR $n=7$, SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR+NAC $n=10$, I/R HR+NAC $n=10$

5.10. Expressão gênica e atividade da renina plasmática e renal

A fim de verificar o papel do SRAA na IRA isquêmica seguida de uma dieta rica em sal foram analisadas a expressão gênica da renina renal através de qPCR e a avaliação da atividade da renina renal e plasmática através da quantificação da angiotensina I por radioimunoensaio.

Ao analisarmos a expressão gênica da renina renal, observamos que os grupos SHAM HR e I/R HR apresentaram menor expressão em relação aos seus grupos controle SHAM NR e I/R NR respectivamente, no entanto o grupo I/R HR NAC não apresentou diferença em sua expressão gênica quando comparado ao seu grupo controle I/R NR NAC (Figura 40).

Figura 40. Expressão gênica (UA) dos grupos SHAM, I/R e I/R NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). $p < 0,05$ SHAM NR $n=7$. SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR+NAC $n=10$, I/R HR +NAC $n=10$

Ao analisarmos a atividade da renina plasmática, verificamos que a dieta hipersódica inibiu a renina plasmática em todos os grupos alimentados com dieta hipersódica ($p<0,05$) (Figura 41), o mesmo ocorreu quando verificamos a atividade da renina renal (Figura 42).

Figura 41. Atividade de renina plasmática (Ang I ng/mL/hr) dos grupos SHAM, I/R e I/R+NAC alimentados com dieta normossódica (NR) ou dieta hipersódica (HR). Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p<0,05$ $p<0,05$ a- SHAM NR vs. SHAM HR, b- I/R NR vs. I/R HR, c- I/R NR + NAC vs. I/R HR+NAC. SHAM NR n=7, SHAM HR n=8, I/R NR n=9, I/R HR n=7, I/R NR + NAC n=10, I/R HR +NAC=10

Figura 42. Atividade renina renal (Ang I ng/mL) dos grupos SHAM, I/R e I/R+NAC alimentados com dieta NR ou dieta HR. Análise Two Way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$, a-SHAM NR vs SHAM HR, b- I/R NR vs I/R HR, c- I/R NR+NAC vs. I/R HR+NAC. SHAM NR $n=7$, SHAM HR $n=8$, I/R NR $n=9$, I/R HR $n=7$, I/R NR+NAC $n=10$, I/R HR+NAC $n=10$

5.11. Sobrevida

A sobrevida dos animais foi avaliada em função da dieta hipersódica, isquemia e reperfusão e o tratamento com o NAC, analisando o número inicial e final dos animais de cada grupo. E ao observarmos o número inicial de animais em cada grupo notamos que, os grupos que sofreram isquemia e reperfusão renal independentemente da dieta, apresentaram uma taxa de mortalidade por volta dos 50%, e nos grupos tratados com NAC este número caiu para cerca de 15%.

Tabela 2. Número inicial e final dos animais alimentados com dieta normossódica (NR) ou hipersódica (HR), submetidos ou não (SHAM) a isquemia e reperfusão (I/R) tratados ou não com N-acetilcisteína (NAC).

Grupo	n (inicial)	n (final)
SHAM NR	8	7
SHAM HR	8	8
I/R NR	16	9
I/R HR	16	7
I/R NR +NAC	12	10
I/R HR + NAC	12	10

6. DISCUSSÃO

6.1 Cloreto de sódio

Os resultados de maior ingestão hídrica (Figura 10), maior volume urinário (Figura 12) e maior pressão arterial (Figura 6) dos animais alimentados com sal e não submetidos à isquemia e reperfusão (SHAM HR) nos levam a concordar com os achados de Campbell (1946), Meneeley (1953), Ferreira et al. (2010) e Katayama et al. (2014), nestes estudos, os autores encontraram resultados semelhantes com os ratos alimentados com dietas ricas em sal (Campbell, 1946; Meneely et al., 1953; Ferreira et al., 2010; Katayama et al., 2014). A teoria da natriurese pressórica pode explicar estes resultados, ao ingerir mais sal, os animais necessitam que seus rins controlem o balanço hidroeletrolítico, para isso os animais devem excretar mais sódio. Ao aumentar sua ingestão hídrica, os ratos do grupo SHAM HR proporcionaram uma menor reabsorção de sódio e água em seus túbulos distais, levando-lhes a formação de maior fluxo urinário, isto explica o porquê de sua maior fração de excreção de sódio, além de manterem seus níveis séricos de sódio praticamente constantes e dentro dos valores normais (135-145 mmol/L) durante todo o protocolo deste estudo (Guyton e Hall, 2006).

Nos achados de Campbell em 1946 e Meneely et al., em 1953, além de observado o aumento nessas variáveis acima citadas, também observaram edema, fibrose intersticial cardíaca e renal, aumento nas massas renal e

cardíaca. Nos trabalhos de Ferreira et al (2010) e Katayama et al (2014), também foram relatados aumento de fibrose intersticial cardíaca, aumento da massa cardíaca e aumento no diâmetro transverso do cardiomiócito. O presente estudo diverge dos estudos acima citados, já que os animais do grupo SHAM HR não apresentaram edema, fibrose intersticial cardíaca (Figura 38), fibrose renal (Figura 36), aumento das massas renal (Figura 32) e cardíaca (Figura 31), aumento do diâmetro transverso do cardiomiócito (Figura 39) e do diâmetro transverso glomerular (Figura 37) o que nos leva a indagar o porquê destes resultados.

O trabalho realizado por Fujita et al. (2011) pode sugerir o motivo desta divergência de resultados, os autores estudaram o efeito da dieta hipersódica (8,0%) em ratos uninefrectomizados, com diferentes períodos para o início da administração dessa dieta. Um grupo recebeu a dieta logo após o desmame, ou seja, por volta de três semanas de vida, enquanto o outro grupo recebeu a mesma dieta após dez semanas de vida. O grupo que recebeu a dieta após o desmame, assim como, os outros estudos (Campbell, 1946, Meenely et al., 1953, Ferreira et al., 2010 e Katayama et al., 2014) apresentou como esperado aumento da pressão arterial, aumento de proteinúria e de forma esperada diminuição da aldosterona plasmática com a dieta hipersódica. Os resultados do grupo que recebeu a dieta após 10 semanas de vida também indicaram aumento na pressão arterial, todavia, este aumento não foi tão exacerbado em comparação aos animais alimentados logo após o desmame, além disso, não apresentaram níveis elevados de aldosterona plasmática em relação ao grupo alimentado com dieta hipersódica a partir das três semanas de idade e proteinúria. Resultados esses que estão de acordo com o presente estudo, onde

os animais do grupo SHAM HR não apresentaram proteinúria (Figura 26). Estes resultados podem nos sugerir que o início de uma dieta hipersódica a partir da 3ª semana de vida causa uma sobrecarga repentina de sódio, pois os animais recebiam somente o sódio oriundo do leite materno desde o nascimento até o desmame. Essa mudança induziria a uma adaptação fisiológica dos sistemas renal e cardíaco. No entanto, o início da administração da dieta hipersódica mais tardiamente parece não trazer mudanças fisiológicas importantes.

6.2 Isquemia e reperfusão

A taxa de mortalidade em torno de 50% (tabela 2) dos grupos submetidos à isquemia e reperfusão independente da dieta, vão de acordo com resultados encontrados em outros estudos que caracterizam a IRA como uma emergência médica, de demorado diagnóstico e de difícil tratamento (Ali et al., 2007; Hsu et al., 2007) com uma taxa de mortalidade variando entre 30 % a 50 % (Fang et al., 2010; Lafrance et al., 2010; Uchino et al., 2005). A piora da IRA acontece cerca de 48 horas após o início do insulto, com o aumento da creatinina (KDIGO, 2012). A disfunção renal induzida pela isquemia e reperfusão pode levar ao acúmulo de excretas nitrogenadas, aumento na produção de ROS, ativação do SRAA local, inflamação local e NTA (Dejaravan et al., 2006, Minutolli et al., 2016) aumentando os riscos de morte após o processo de IRA.

Ao analisarmos os dados de fração de excreção de sódio (Figura 14) notamos que os animais do grupo I/R NR apresentaram diferenças na primeira semana após o insulto, o que pode indicar dificuldade no manejo do sódio pela

porção tubular renal. É importante frisar que a área mais afetada pela isquemia e reperfusão é justamente a região tubular, já que ao diminuir o aporte de oxigênio, esta região que necessita deste gás para realizar suas funções de maneira satisfatória, fica susceptível ao desenvolvimento de necrose tubular aguda o que pode levar a morte de células tubulares que controlam a reabsorção e excreção de sódio (Aksu et al.,2011).

Ao analisarmos a dosagem de creatinina sérica (Figura 22) observamos um aumento desta variável nos animais do grupo I/R NR em relação ao grupo I/R HR, uma e duas semanas após a cirurgia, entretanto, quatro semanas após a cirurgia observamos um aumento do grupo I/R HR em relação ao grupo I/R NR, sabe-se que a dosagem da creatinina sérica não é o método mais eficaz para a análise de função renal, por esse motivo, realizamos também o clearance de creatinina (Figura 28) e através deste observamos que não houve diferença entre os grupos I/R NR e I/R HR. Entretanto ao compararmos os animais SHAM HR e I/R HR notamos que o grupo I/R HR apresentou menor clearance uma e quatro semanas após a isquemia e reperfusão, indicando piora no ritmo de filtração glomerular, Spurgeon- Peachman et al (2007) relataram resultados semelhantes ao associarem uma dieta rica em sal em animais submetidos à isquemia e reperfusão à diminuição do clearance de creatinina (Spurgeon- Peachman et al.,2007).

A utilização da dosagem de albuminúria como um marcador de dano a barreira de filtração glomerular é bem estabelecida (Parving et al.,1982; Viberti et al.,1982). A albumina é uma proteína com peso molecular relativamente grande, cerca de 66 kDa e não deve ser filtrada, ao encontrar grandes concentrações de

albuminúria, podemos supor que há danos à barreira de filtração glomerular (Parving et al., 1982; Viberti et al., 1982) e ao analisarmos a albuminúria dos grupos estudados neste trabalho (Figura 30) podemos notar que os animais do grupo I/R HR apresentaram maior albuminúria em relação aos grupos I/R NR, SHAM HR, o que indica possível dano a barreira de filtração glomerular destes animais.

A dieta hipersódica já foi relatada como fator de aumento de massa cardíaca e renal (Campbell, 1946; Meneely et al., 1953; Ferreira et al., 2010; Katayama et al., 2014), entretanto neste trabalho não foram observadas tais mudanças somente em virtude da dieta hipersódica. Entretanto ao submeter animais alimentados com dieta hipersódica a isquemia e reperfusão, notamos aumento da massa cardíaca (Figura 31) e aumento da massa renal (Figura 32). A fim de investigar quais os motivos para o aumento das massas destes órgãos analisamos o diâmetro transverso do cardiomiócito (Figura 39) e o diâmetro transverso glomerular (Figura 37) e não encontramos diferença dentre os grupos, portanto, diferentemente dos trabalhos de Ferreira et al., 2010 e Katayama et al., 2014 estes animais não sofreram hipertrofia cardíaca e renal.

O aumento de deposição de colágeno no interstício celular pode aumentar a massa de órgãos alvo, como coração e rins após o processo de isquemia e reperfusão (Spurgeon-Peachman et al., 2007). Ao analisarmos a fibrose intersticial renal (Figura 36) e cardíaca (Figura 38) do grupo I/R HR notamos diferença em relação aos grupos I/R NR e SHAM HR, o que pode ter ocasionado o aumento da massa cardíaca e renal neste grupo, corroborando com os dados encontrados por Spurgeon-Peachman et al (2007). Esta inflamação gerada pelo

quadro de isquemia e reperfusão acarreta no aumento da deposição de colágeno e consequente fibrose cardíaca e renal, o músculo cardíaco perde com o passar do tempo sua contratilidade, aumento dos riscos cardiovasculares e consequente óbito (Ferreira et al.,2010; Katayama et al.,2014).

6.3. N-acetilcisteína

NAC é uma substância química que possui um aminoácido cisteína, sendo assim capaz de auxiliar na produção de glutathione e também um grupo sulfídrico livre, o que o torna eficaz no rompimento de ligações dissulfeto promovendo ações mucolíticas (Zaffarulah et al.,2003). Além disso, a doação de elétrons livres, no caso o grupo sulfídrico pode estabilizar radicais livres como OH⁻, NO₂ e CO₃ (Samuni et al.,2013).

Apresentou um aumento da pressão arterial no grupo I/R HR NAC (Figura 7). Os efeitos da NAC sobre a pressão arterial já haviam sido descritos previamente, Rauchova et al (2005) e Liu et al (2005) mostraram que a NAC favoreceu a produção de NO na medula renal, este gás de meia vida relativamente curta promove relaxamento da musculatura lisa e consequente vasodilatação, promovendo assim uma diminuição da pressão arterial (Liu et al., 2005; Rauchova et al.,2005). Outra possível via da diminuição da pressão arterial seria através do SRAA já que foi observado que a infusão de NAC (5mmol/kg/hr) preveniu o aumento da pressão arterial em ratos inconscientes, e diminuiu também a ANG II plasmática o que indicaria efeitos diretos sobre a ação do SRAA por diminuir a atividade da ECA (Boesgaard et al., 2003). Já em ratos que passaram por obstrução ureteral, NAC mostrou resultados positivos ao

diminuir a fibrose relacionada a ativação do SRAA via ANG II (Shen et al.,2016)

No presente estudo, ao analisarmos a expressão gênica de renina (Figura 40), notamos que a dieta hipersódica diminuiu esta expressão nos grupos SHAM HR e I/R HR, este resultado é esperado já que é bem estabelecido na literatura que altas concentrações de sal diminuem a ativação do SRAA (Guyton e Hall, 2006; Ferreira et al., 2010; Katayama et al., 2014), entretanto NAC aumentou a expressão gênica do grupo I/R HR NAC a ponto de não apresentar diferença em relação ao grupo I/R NR NAC, no entanto, não é possível por qual motivo ocorreu este aumento e se seria importante no desenvolvimento de lesão renal, já que ao analisar a atividade da renina plasmática (Figura 41) e renal (Figura 42) encontrava-se menor em relação aos grupos que receberam a dieta normossódica (SHAM NR, I/R NR e I/R NAC).

NAC como agente protetor renal fora previamente descrito em diversos estudos, promovendo aumento da proteína e gene klotho (Shimizu et al., 2012; Shimizu et al., 2016), diminuindo a fibrose intersticial, dilatação tubular e necrose tubular (Moreira et al.,2016). Os achados do presente trabalho são promissores, NAC foi capaz de prevenir o desenvolvimento de albuminúria nos animais com a isquemia e reperfusão associada a uma dieta hipersódica (Figura 30), indicando que atua como protetor da barreira de filtração glomerular. Resultado semelhante foi mostrado por Shimizu e colaboradores ao observar a diminuição do clearance de inulina, marcador de filtração glomerular em ratos tratados com NAC (Shimizu et al., 2012).

A NAC é conhecida também por ser um agente antioxidante e com efeito benéfico sobre variáveis como TBARS e TAS (Katayama et al.,2014; Shimizu et

al.,2016). O estresse oxidativo está relacionado a danos a macromoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (Zaffarulah et al.,2002; Shin et al., 2013). Os animais que receberam NAC neste estudo não apresentaram menor TAS (Figura 33), nem ácido úrico (Figura 34) em relação ao grupo sem o tratamento, entretanto, ao dosarmos o TBARS (Figura 35) observamos a sua diminuição, tanto no grupo I/R NR NAC como no grupo I/R HR NAC, estes resultados indicam que a NAC diminuiu a peroxidação de lipídeos, corroborando com os dados apresentados por Katayama et al (2014) e Shimizu et al (2016).

A isquemia e reperfusão associada a uma dieta hipersódica está diretamente associada ao desenvolvimento de fibrose intersticial renal (Figura 36) e fibrose intersticial cardíaca (Figura 38). A fibrose é consequência de inflamação nestes tecidos, com a deposição de colágeno nestes órgãos, aumentando suas respectivas massas. O tratamento com NAC impediu a formação de fibrose intersticial renal e cardíaca, como observado nas figuras 36 e 38 respectivamente. Shen et al (2016) e Liu et al (2005) já haviam reportado ações anti-inflamatórias do NAC, provavelmente devido sua capacidade de doar elétrons e estabilizar radicais livres. Ao impedir a formação de fibrose, nota-se também a diminuição das massas renal e cardíaca, corroborando com os dados apresentados por Katayama et al.,2014 quando verificaram menor massa cardíaca em animais alimentados com dieta hipersódica e tratados com NAC (Katayama et al.,2014).

Os dados de sobrevida (Tabela 2) observados com NAC também são promissores, pois a mortalidade dos animais submetidos a isquemia e reperfusão foi em cerca de 50%, o que corrobora com os dados encontrados na

literatura sobre a taxa de mortalidade da IRA (Ali et al.,2007; Hsu et al.,2007), no entanto NAC diminuiu a mortalidade dos animais com isquemia e reperfusão para 20%. Provavelmente o favorecimento da produção de óxido nítrico (Rauchova et al.,2005, Liu et al.,2005), e a diminuição da geração de ROS (Katayama et al.,2014, Shimizu et al.,2013, Shimizu et al.,2016) contribuíram para minimizar os danos causados pela isquemia e reperfusão. Esse dado é um indicativo que NAC poderia ser utilizado no tratamento após a ocorrência de IRA, corroborando com o estudo em que pacientes submetidos a bypass cardiopulmonar tratados com NAC reduziram o risco de IRA para 28.6% (Santana et al.,2014).

7. CONCLUSÕES

Ao analisarmos os dados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. A dieta hipersódica por si só não foi capaz de causar fibrose intersticial renal e cardíaca, aumento de massa cardíaca e renal e desenvolvimento de proteinúria.
2. Ao associarmos à isquemia e reperfusão a uma dieta hipersódica, houve um aumento da mortalidade destes animais e observamos dano a barreira de filtração glomerular tendo em vista o aumento da albuminúria. Além disso, também observamos o desenvolvimento de fibrose renal e cardíaca e o aumento de massa renal e cardíaca.
3. O tratamento com NAC mitigou os danos causados pela peroxidação de lipídeos, além disso, preveniu o desenvolvimento de fibrose e aumento da massa de renal e cardíaca. A utilização da NAC também diminuiu a mortalidade dos animais após a isquemia e reperfusão.

Tendo em vista estas conclusões, podemos afirmar que a administração de NAC foi eficaz para mitigar os danos causados por uma IRA isquêmica associada a uma dieta rica em sódio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksu U, Demirci C, Ince C. The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide. *Contrib Nephrol.*174:119-128,2011.

Ali T, Khan I, Simpson W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population – based study. *J Am Soc Nephrol.*18:1292-1298, 2007.

Barreiros ALB, David JM. Estresse Oxidativo:Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim.Nova.*29:113-123.2006.

Boesgaard S, Aldershville J, Poulsen HE, Christensen S, Digepetersen H, Giese J, N-acetylcysteine inhibits angiotensin converting enzyme in vivo. *Journ Pharmac and exp. Theraup.* 265 (3): 1239-44,1993.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.*121:4210-4221, 2011.

Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliot P. Salt intakes around the world: implication for public health. *Int Journal of Epidemiology*, 38: 791-813.2009.

Cadenas E. Mitochondrial Free Radical Production and Cell Signaling. **Mol. Asp. Med.**, 25, 17–26, 2004.

Campbell HL. Sodium chloride as an adjunct to a diet of whole wheat and whole milk. *Am.J.Physiol.* 147:340-342,1946

Carey RM, Padia SH. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab.* 19: 84-87,2008.

Chawla MD, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and Chronic kidney disease as interconected Syndromes. *N Engl. Journ Med.* 371 (1),58-66,2014.

Cooper G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Ann Rev Med.* 1997; 48:13-23.

Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol.* 38:205-227,1997.

Enns GM, Tina M. Glutathione as a Redox Biomarker in Mitochondrial Disease—Implications for Therapy. *Journal of Clinical medicine*, 6:50, 2017

Fang Y,Ding X,Zhong Y et al. Acute kidney injury in a Chinese hospitalized population.*Blood Purif.*30:120-126,2010.

Feng Y, Chetan H, McIlwain E, Varner KJ, Lazartigue E. AngiotensinConverting Enzyme 2 over expression in the central nervous system reduces angiotensin II mediated cardiac hypertrophy. *Plos one.* 7 (11), e48910, 2012.

Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, Rosa KT, Coelho MS, Casarini DE, Heimann JC. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in Wistar rats. *J Nutr.*; 140: 1742-51, 2010.

Finkel T, Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol*; 65:337-40,1999.

Fuhrquist F, Saijonmaa O. Plasma renin activity: an assay ongoing clinical relevance. *Clin Chem.* 54:1400,2008.

Gustafsson AB,Gotlieb RA.Heart mitochondria: gates of life and death.*Cardiovasc Res.*77:334-343.2008.

He FJ, Burnier M, MacGregor GA. Nutrition in cardiovascular disease: salt in hypertension and heart failure. *European Heart Journal.* 32;3073-3080,2011.

He FJ, MacGregor GA. Reducing population intake worldwide: from evidence to implementation. *Prog Cardiovascular Dis.* 52:363-380,2010.

Hodge G, Ye VZ, Duggan KA. Dysregulation of angiotensin II synthesis is associated with salt sensitivity in the spontaneous hypertensive rat. *Acta Physiol Scand.* 174:209-215, 2002.

Hsu CY, McCulloch CE, Fan D, et al. Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney Int.* 72:208-212,2007.

Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ.* 297:319-328.1988.

Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 298:229-317. 2012.

Katayama, IA ; Pereira, RC. ; Dopona, EPB. ; Shimizu, MHM. ; Furukawa, LNS; Oliveira, IB, Heimann, JC. . High-Salt Intake Induces Cardiomyocyte Hypertrophy in Rats in Response to Local Angiotensin II Type 1 Receptor Activation. *The Journal of Nutrition*. 144:1571-1578, 2014.

KDIGO. Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int* ;(Suppl) 2:1-138, 2012.

Kosteradzki M, Kowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc*. 40:3279-3288. 2008.

Lafrance JP, Miller DR. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *J Am Soc Nephrol*. 21:345-352, 2010.

Lash, L.H. Mitochondrial Glutathione Transport: Physiological, Pathological and Toxicological Implications. *Chem. Biol. Interact*. 163, 54–67, 2006.

Leenen FH, Yuan B. Dietary sodium induced cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rat versus Wistar-Kyoto rat. *Journal Hypertension*. 16:885-892, 1998.

Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282:C227-C241. 2002.

Marenzi G, Assanelli E, Marana I et al: N-acetylcysteine and contrast – induced nephropathy in primary angioplasty. *N Engl J Med*. 354:2773-2382, 2006.

Mehta RL, Cerda J, Burdmann EA, et al., International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet* .385; 1-28, 2015.

Moreira MA, Irigoyen MC, Saad KR, Saad PF, Koike MK, Montero EFS, Martins JL. N-acetylcysteine reduces the renal oxidative stress and apoptosis induced by hemorrhagic shock. *Journal of surgic resear* .203: 113 -120, 2016.

Munshi R, Hsu C, Himmerfalb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Med*. 9:11. 2011.

Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca: antitrombóticos em pacientes com fibrilação arterial é similar a demonstrada na prevenção secundária. *Rev. Brasileira de Hipertensão*.8:63-75,2001.

Nishiyama A, Yoshizumi M, Rahman M, Kobori H, Seth DM, Miyatake A, Zhang GX, Yao L, Hitomi H, Shokoji T, Kiyomoto H, Kimura S, Tamaki T, Kohno M, Abe Y. Effects of AT1 receptor blockade on renal injury and mitogen –activated protein activity in Dahl salt-sensitive rats. *Kidney Int*. 65:972-981, 2004.

Parving HH, Oxenboll B, Svendsen PA, Christiansen JS, Andersen AR. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion. *Acta Endocrinol*, 100: 550–555, 1982.

Peng TI, Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci*.1201:183-188.2010.

Rauchova H, Pechanova O, Kunes J, Vokurkova M, Dobesova ZChronic N-Acetylcysteine Administration Prevents Development of Hypertension in N-Nitro-LArginine Methyl Ester-Treated Rats: The Role of Reactive Oxygen Species , *Hypert. Res*, 28 (5),475-82, 2005.

Ruiz FJ, Salora MG, Ingles AC, Quesada T, Vicente E, Carbonell LE.N-acetyl-Lcysteine potentiates depressor responds to captopril and enalapril in SHR. *Am J Physiol*; 267:R767-772,1994.

Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia/reperfusion in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transpl*. 5(2):52-67.2015.

Santana-Santos E,Gowdak LHW, Gaiotto FA, Puig LB, Hajjar LA, Zeferino SP, Drager LF, Shimizu MHM, Bortolotto LA, Lima JJG. High dose of N-acetylcystein prevents acute kidney injury in chronic kidney disease patients undergoing myocardial revascularization, *Ann Thorac Surg*; 97:1617-23,2014.

Schroppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function:from mechanism to translantion. *Kidney Int*. 86:251-258.2014.

Shah AM, Channon KC. Free Radicals and Redox Signaling in cardiovascular disease. *Heart*. 90:485-87.2004.

Shen Y, Miao NJ, Xu JJ, Gan XX, Xu D, Zhou L, Xue H, Zhang W, Lu LM. N-acetylcysteine alleviates angiotensin II-mediated renal fibrosis in mouse obstructed kidneys. *Acta pharm*.37: 637-644,2016.

Shimizu MH, Gois PH, Volpini RA, Canale D, Luchi WM, Froeder L, Heilberg IP, Seguro AC. N-acetylcysteine protects against star fruit induced acute kidney injury. *Renal fail.* 39:193-202,2017.

Shimizu MHM, Volpini RA, Bragança AC, Campos R, Canale D, Sanches TR, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. *Experimental Gerontology*, 48-..298-303,2013.

Shin JH, Gun-Hwa K, Ki-Hak S, Yong – Gil N, Chong-Koo S, Jae – Sung L. Protective effect of N-acetylcysteine against ischemia/reperfusion injury in rat urinary bladders. *Cell Biochem Funct.* 32 (1), 24-30, 2013.

Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *New Engl Journ Med.* 319:1557-1562,1988.

Spurgeon-Pechman KR, Donohoe DL, Mattson DL, Lund H, James L, Basile DP. Recovery from acute renal failure predisposes hypertension and secondary renal disease in response to elevated sodium. *Am J Renal Physiol.*;293(1):F269-78,.2007.

Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA.* 294:813-818, 2005.

Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Zak R, Schumacker PT, Becker LB. Reperfusion injury on cardiac myocytes after stimulated ischemia. *Am J Physiol.* 270:H1334-H1341.1996.

Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*, 1: 1430–1432, 1982.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74:139-162.1994.

Yu L, Burdmann EA, Seguro AC, Helou CMB, Zatz R. Insuficiência (injúria) renal aguda in: Zatz R, Seguro AC, Malnic G. *Bases Fisiológicas da Nefrologia*. Ed. Atheneu:291-315.2012.

Zaffarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*, 60: 6-20,2003.

9. ANEXOS

PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL

Método osciloscópio

{ PA sistólica
Frequência cardíaca

Figura 1: Representação esquemática do aparelho utilizado para a medida de pressão arterial caudal.

Legenda:

1. Orifício para ventilação do ambiente
2. Recipiente para água
3. Área para acondicionamento do animal
4. Recipiente para armazenamento de ração
5. Coletor de água
6. Coletor de fezes
7. Coletor de urina

Figura 2: Representação esquemática da gaiola metabólica utilizada para a avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário e coleta de amostra urinária.