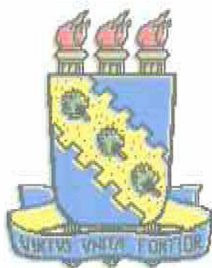


Handwritten notes at the top of the page, including the number 13844011/05 and other illegible markings.



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

AÇÕES FARMACOLÓGICAS DA SER-THR-LYS-GUANILINA EM
SISTEMA DE PERFUSÃO DE RIM ISOLADO DE RATO

Handwritten notes on the left side of the page, including the number 13844011/05 and other illegible markings.

TICIANA MEIRELES SOUSA

FORTALEZA
2005

Handwritten notes and signatures at the bottom of the page, including a signature that appears to be 'T. Sousa'.

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

AÇÕES FARMACOLÓGICAS DA SER-THR-LYS-GUANILINA EM
SISTEMA DE PERFUSÃO DE RIM ISOLADO DE RATO

TICIANA MEIRELES SOUSA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA
2005

S698a Sousa, Ticiania Meireles

Ações farmacológicas da ser-thr-lys-guanilina em sistema de perfusão de rim isolado de rato./ Ticiania Meireles Sousa -- Fortaleza, 2005.

114f.:il.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. Natriuréticos 2. Insuficiência renal aguda 3. Guanilato ciclase ± Monteiro, Helena Serra Azul (orient.) II. Título.

CDD 615.3

TICIANA MEIRELES SOUSA

**AÇÕES FARMACOLÓGICAS DA SER-THR-LYS-GUANILINA EM
SISTEMA DE PERFUSÃO DE RIM ISOLADO DE RATO**

Dissertação aprovada em 25 de julho de 2005

BANCA EXAMINADORA

em
les
irá.
ato
5.3

*À minha mãe, Fátima e à
minha irmã, Lara.
Minhas duas melhores
amigas!*

*A todos os animais utilizados neste
trabalho. A eles, meu eterno
respeito.*

*"Quando o homem aprender a
respeitar até o menor ser da
criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a
amar seu semelhante".*

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai, meu melhor Amigo.

A minha família, por tanto amor em todos os momentos.

Ao Pádua, por sempre apoiar meus projetos normais ou insanos de aprendizado.

À Dra. Helena Serra Azul Monteiro, por ter me aceito como orientanda, pela atenção, paciência, compreensão, confiança e amizade de sempre.

Ao Dr. Manassés Claudino Fonteles, por ter acompanhado minha vida científica desde o início. Por tudo o que me ensinou!

Ao Dr. Paulo Sérgio Ferreira Barbosa, pela força, apoio e amizade incondicional em todas as horas.

Ao Dr. Alexandre Havt Bindá, por ter me levado pela mão durante os anos de iniciação científica, o que fez com que durante este mestrado, mesmo longe, ele estivesse sempre presente.

A todos os doutorandos e mestrandos, pelos bons momentos compartilhados.

Em especial a Daniela Amora, pelo companheirismo e cumplicidade de sempre!

Ao professor e amigo, Nilberto Robson Falcão do Nascimento, pelo apoio e exemplo de simplicidade e competência.

A todos os bolsistas e funcionários do laboratório, pela ajuda sempre bem-vinda.

À Sílvia e Áurea, por resolverem meus problemas com presteza.

Ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes, pela colaboração nas análises histopatológicas.

Ao Messias Simões dos Santos-Neto, pelas planilhas, que tanto facilitaram meu trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo suporte financeiro.

*"Dificuldades reais podem ser
resolvidas; apenas as imaginárias
são insuperáveis".*

Theodore N. Vail

RESUMO

Ações farmacológicas da ser-thr-lys-guanilina em sistema de perfusão de rim isolado de rato. Ticiane Meireles Sousa, Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2005.

A guanilina e a uroguanilina foram recentemente descobertas, respectivamente, no intestino e na urina, (Currie *et al.*, 1992; Hamra *et al.*, 1993). Fazem parte da família de peptídeos que ativam a guanilato ciclase de membrana (GC-C), aumentando os níveis intracelulares de cGMP (Schulz *et al.*, 1990). Estão presentes em diversos tecidos, como respiratório, linfonodos, testículos, cérebro e medula adrenal (Field *et al.*, 1978; Forte *et al.*, 1988, 1989; Hamra *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 1992). Foi comprovado que adicionando uma lisina na porção N-terminal, obtêm-se um análogo mais estável e potente que a guanilina. O objetivo desse estudo é pesquisar os efeitos renais de um novo análogo, ser-thr-lys-guanilina em sistema de perfusão. Os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Henseleit modificada com 6g% de albumina bovina. Os dados foram comparados através de teste *t* de Student e ANOVA, com significância $p < 0,05$. Na dose de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, esse peptídeo apresentou efeitos similares aos da uroguanilina, na dose de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, em todos os parâmetros testados. Ambas causaram aumento na pressão de perfusão (PP: de $101,5 \pm 3,7$ para $111 \pm 2,9$ mmHg; de $101,2 \pm 2,6$ para $113,4 \pm 2,5$ mmHg), no fluxo urinário (FU: de $0,158 \pm 0,016$ para $0,223 \pm 0,01$ mL.g⁻¹.min⁻¹; de $0,16 \pm 0,016$ para $0,226 \pm 0,2$ mL.g⁻¹.min⁻¹) e diminuição no transporte tubular total e proximal de sódio (%TNa⁺: de $0,774 \pm 0,06$ para $0,724 \pm 0,035$; de $0,735 \pm 0,065$ para $0,773 \pm 0,084$), potássio (%TK⁺: de $66,89 \pm 2,77$ para $47,29 \pm 3,34$; de $63,54 \pm 3,82$ para $42,54 \pm 8,14$) e cloreto (%TCl⁻: de $85,69 \pm 1,19$ para $73,59 \pm 2,63$). Esses resultados foram similares aos previamente descritos após a administração da toxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa), guanilina, uroguanilina e lys-guanilina no mesmo sistema (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1996 e 1998). A dose maior (1 $\mu\text{g/mL}$) causou ação antidiurética (FU: de $0,165 \pm 0,004$ para $0,111 \pm 0,009$ mL.g⁻¹.min⁻¹) e nenhum efeito sobre o transporte de sódio, embora a diminuição na reabsorção tubular de potássio (%TK⁺: de $72,29 \pm 1,2$ para $49,73 \pm 6,75$) e cloreto (%TCl⁻: de $85,96 \pm 0,79$ para $81,9 \pm 1,47$) continuassem presentes. Nesta dose, não apenas bloqueou o efeito diurético da uroguanilina, como continuou causando um efeito antidiurético significativo (FU: de $0,168 \pm 0,004$ para $0,116 \pm 0,006$). No entanto, não foi capaz de bloquear os efeitos natriuréticos da uroguanilina (%TNa⁺: de $85,35 \pm 2,55$ para $79,92 \pm 1,05$). O mecanismo de ação renal preciso dos peptídeos da família das guanilinas ainda não foi completamente esclarecido. Sabe-se que esses peptídeos se ligam aos receptores GC-C (Schulz *et al.*, 1990), porém há indícios de que existam outras vias de ação renal, independentes desse receptor. Há ainda a possibilidade de que haja duas entidades agindo de modo antagônico no sistema. Talvez haja a necessidade de isolá-los. A descoberta dos peptídeos da família das guanilinas promoveu avanços significativos na compreensão da regulação endógena dos transportes de água e eletrólitos. O completo esclarecimento do seu mecanismo de ação renal oferece perspectivas reais para o tratamento de doenças como a hipertensão arterial.

Palavras-chaves: ser-thr-lys-guanilina, guanilina, uroguanilina, cGMP, perfusão de rim isolado.

ABSTRACT

Pharmacological actions of ser-thr-lys-guanylin in isolated perfused rat kidney. Ticiana Meireles Sousa. Advisor: Prof. Dr. Helena Serra Azul Monteiro. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmacology. Faculty of Medicine. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, 2005.

Guanylin and uroguanylin are members of a family of peptides that stimulates cGMP production in several organic tissues, as intestine, kidney, airway, linfonodes, testis, brain and adrenal medulla (Field *et al.*, 1978; Forte *et al.*, 1988, 1989; Hamra *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 1992). Their 15 amino acid structures have been identified from rat intestine and opossum urine, respectively (Currie *et al.*, 1992; Hamra *et al.*, 1993), and they seem to be the link between intestine and kidney functions in controlling blood pressure, as the "intestinal natriuretic hormone" suggested by some authors (Carey, 1978; Lennane *et al.*, 1975). It was demonstrated that a Lysine-1 analog of guanylin is a more potent natriuretic and kaliuretic peptide. The aim of this study was to evaluate the renal effects of a novel analog of guanylin: ser-thr-lys-guanylin. Its effects were examined using isolated perfused kidneys from Wistar rats. All experiments were preceded by a 30 minutes internal control period and an external control group (C), in which the kidneys were perfused only with Krebs-Henseleit solution containing 6g% of a previously dialysed bovine albumine serum. The data was analyzed by Student *t*-test and ANOVA. The level of significance was set at $p < 0.05$. Ser-thr-lys-guanylin, at the lowest dose (0.1 $\mu\text{g/mL}$) and uroguanylin (0.5 $\mu\text{g/mL}$) caused similar effects. Both groups were able to increase perfusion pressure (PP: 101.5 ± 3.7 to 111 ± 2.9 mmHg; 101.2 ± 2.6 to 113.4 ± 2.5 mmHg), urinary flow (UF: 0.158 ± 0.016 to 0.223 ± 0.019 $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$; 0.16 ± 0.016 to 0.226 ± 0.2 $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) and to decrease sodium (%TNa⁺: 0.774 ± 0.06 to 0.724 ± 0.035 ; 0.735 ± 0.065 to 0.773 ± 0.084), potassium (%TK⁺: 66.89 ± 2.77 to 47.29 ± 3.34 ; 63.54 ± 3.82 to 42.54 ± 8.14) and chloride (%TCl⁻: 85.69 ± 1.19 to 73.59 ± 2.63) tubular reabsorption. Similar effects were also found in response to the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa), guanylin, uroguanylin and lys-guanylin in the same system (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1996 e 1998). However, a greater dose (1 $\mu\text{g/mL}$), not only caused significantly decrease in the urinary flow (UF: 0.165 ± 0.004 to 0.111 ± 0.009 $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$), but was also able to block the diuretic effects of uroguanylin (UF: 0.168 ± 0.004 to 0.116 ± 0.006 $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$), although it still decreased potassium (%TK⁺: 72.29 ± 1.2 to 49.73 ± 6.75) and chloride (%TCl⁻: 85.96 ± 0.79 to 81.9 ± 1.47) tubular reabsorption. The precise renal mechanism of action of this family of peptides has not yet been fully elucidated. Deletion of GC-C genes in transgenic mice reveals that intestinal fluid secretion responses to STa are completely lost (Schulz *et al.*, 1997 & Mann *et al.*, 1997), but the natriuretic responses to STa and uroguanylin are retained (Carrithers *et al.*, 1999), suggesting that other receptors are involved. There is a possibility that there are to peptides causing antagonic effects. Further isolation may be necessary. Further studies are required to elucidate the specific renal mechanism of action of this new peptide. The discovery of guanylin and its family has promoted significant advances in the understanding of endogenous control of salt, water and eletrolites. The study of its analogs in perfused rat kidneys could help in elucidating their specific renal mechanism of action and bring great perspectives in the control of blood pressure.

Key-words: ser-thr-lys-guanylin; guanylin; uroguanylin; cGMP; isolated perfused kidney.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. A guanilato ciclase e o cGMP	22
2.2. O primeiro ligante	22
2.3. Isolamento dos peptídeos endógenos	24
2.4. Precursores e estrutura da guanilina, uroguanilina e toxina termo-estável da <i>Escherichia coli</i>	26
2.5. Os receptores GC-C	29
2.6. Distribuição no organismo	33
2.7. A família das guanilinas e sua ação renal	36
2.8. A família das guanilinas e sua ação intestinal	38
2.9. Câncer de cólon	38
2.10. Fígado	39
2.11. Trato respiratório	39
2.12. Sistema imunológico	40
2.13. Hipertensão	40
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1. Perfusão de rim isolado	42
4.1.1. O sistema	42
4.1.2. Animais	46
4.1.3. Preparação do sistema	46
4.1.4. Solução perfusora	48
4.1.5. Substâncias utilizadas	49
4.1.6. Técnica cirúrgica	49
4.1.7. Protocolo experimental	51
4.1.8. Grupos experimentais	52
4.1.9. Cálculo dos parâmetros renais	52
4.2. Estatística	54

4.2. Síntese da ser-thr-lys-guanilina e da uroguanilina	54
4.3. Comitê de Ética	55
5. RESULTADOS	56
5.1. Grupos experimentais	56
5.2. Pressão de perfusão (PP)	57
5.3. Resistência vascular renal (RVR)	59
5.4. Fluxo urinário (FU)	61
5.5. Ritmo de filtração glomerular (RFG)	63
5.6. Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa ⁺)	65
5.7. Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa ⁺)	67
5.8. Percentual de transporte tubular de potássio (%TK ⁺)	69
5.9. Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK ⁺)	71
5.10. Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl ⁻)	73
5.11. Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl ⁻)	75
5.12. Clearance Osmolar (Cosm)	77
5.13. Análises histopatológicas	79
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9. ANEXOS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

- %TNa⁺** - Percentual de transporte tubular de sódio
- %pTNa⁺** - Percentual de transporte tubular proximal de sódio
- %TK⁺** - Percentual de transporte tubular de potássio
- %pTK⁺** - Percentual de transporte tubular proximal de potássio
- %TCl** - Percentual de transporte tubular de cloreto
- %pTCl** - Percentual de transporte tubular proximal de cloreto
- ANP** – Peptídeo natriurético atrial (do inglês: “Atrial natriuretic peptide”)
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- BNP** – Peptídeo natriurético cerebral (do inglês: “Brain natriuretic peptide”)
- CF** – Fibrose cística
- CFTR** – Proteína reguladora da condução transmembrana da fibrose cística
- cGMP** – Monofosfato cíclico de guanosina
- Cl⁻** – Íon cloreto
- ClC-2** – Canal de cloreto 2
- CNP** – Peptídeo natriurético tipo “C”
- Cosm** – *Clearance* osmolar
- EDRF** – Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: “Endothelium-derived relaxing factor”)
- FU** – Fluxo urinário
- GC** – Guanilato ciclase
- H⁺** – Íon hidrogênio
- HCO₃⁻** - Bicarbonato
- IC** – Insuficiência cardíaca

IRA – Insuficiência renal aguda / crônica

IRC – Insuficiência renal crônica

K⁺ - Íon potássio

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

Na⁺ – Íon sódio

NO – Óxido nítrico (do inglês: “Nitric oxide”)

OK-GC – Receptor guanilato ciclase encontrada em rim de gambá (do inglês: “opossum kidney”)

PDE – Fosfodiesterase

PKA-II – Proteína quinase II, dependente de cAMP

PKG-II – Proteína quinase II, dependente de cGMP

PP – Pressão de perfusão

RFG – Ritmo de filtração glomerular

RVR – Resistência vascular renal

STa – Toxina termo-estável da *Escherichia coli*

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura primária de peptídeos representativos da família das guanilinas e da toxina termo-estável da <i>Escherichia coli</i> (STa) .	25
Figura 02 – Polipeptídeos precursores da guanilina, toxina termo-estável da <i>Escherichia coli</i> (STa) e uroguanilina.	27
Figura 03 – Classificação dos peptídeos de acordo com as pontes de dissulfeto, que fazem ligações entre as cisteínas.	28
Figura 04 – Transdução de sinal do GC-C.	33
Figura 05-A – Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado de rato.	43
Figura 05-B – Sistema de perfusão de rim isolado utilizado em nossos experimentos	45
Figura 06 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus pressão.	47
Figura 07 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus medida do fluxômetro.	47
Figura 08 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus fluxo.	48
Figura 09 – Técnica cirúrgica para a colocação do rim no sistema de perfusão de rim isolado.	50
Figura 10 – Gráfico da pressão de perfusão (PP; mmHg) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL).	58

Figura 11 – Gráfico da pressão de perfusão (PP; mmHg) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 58

Figura 12 – Gráfico da resistência vascular renal (RVR) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 60

Figura 13 – Gráfico da resistência vascular renal (RVR) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 60

Figura 14 – Gráfico do fluxo urinário (FU; mL.g⁻¹.min⁻¹) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 62

Figura 15 – Gráfico do fluxo urinário (FU; mL.g⁻¹.min⁻¹) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 62

Figura 16 – Gráfico do ritmo de filtração glomerular (RFG; mL.g⁻¹.min⁻¹) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 64

Figura 17 – Gráfico do ritmo de filtração glomerular (RFG; mL.g⁻¹.min⁻¹) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 64

Figura 18 – Gráfico do percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 66

Figura 19 – Gráfico do percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 66

Figura 20 – Gráfico do percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 68

Figura 21 – Gráfico do percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 68

Figura 22 – Gráfico do percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 70

Figura 23 – Gráfico do percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 70

Figura 24 – Gráfico do percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 72

Figura 25 – Gráfico do percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 72

Figura 26 – Gráfico do percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 74

Figura 27 – Gráfico do percentual de transporte tubular de cloreto (%TCT) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 74

Figura 28 – Gráfico do percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCT) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 76

Figura 29 – Gráfico do percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCT) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 76

Figura 30 – Gráfico do *clearance* osmolar (Cosm) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle e as duas doses da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL). 78

Figura 31 – Gráfico do *clearance* osmolar (Cosm) versus tempo de experimento, contendo o grupo controle, a uroguanilina (0,5µg/mL) e o grupo da ser-thr-lys-guanilina (1µg/mL) + a uroguanilina (0,5 µg/mL). 78

Figura 32 – Análise histopatológica do rim esquerdo, com aumento de 20x10. Controle interno. Todos os rins esquerdos apresentaram aparência semelhante, sem alterações. 79

Figura 33 – Análise histopatológica do rim direito perfundido com ser-thr-lys-guanilina, na dose de 0,1 µg/mL, com aumento de 20x10 (A) e de 40x10 (B). Presença de material protéico no espaço urinário de um número moderado de glomérulos. Alteração presente em todos os grupos testados. 80

Figura 34 – Análise histopatológica do rim direito perfundido com ser-thr-lys-guanilina, na dose de 1 µg/mL, com aumento de 20x10. Presença de material protéico no espaço urinário de um número moderado de túbulos. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Localização dos cromossomos que codificam receptores GCs e peptídeos natriuréticos.	30
Tabela 02 – Expressão do mRNA de receptores GC-C, de PKG-II, de guanilina e de uroguanilina ao longo do néfron.	35
Tabela 03 - Pressão de perfusão (PP; mmHg): Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	57
Tabela 04 - Resistência vascular renal (RVR): Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	59
Tabela 05 - Fluxo urinário (FU; mL.g ⁻¹ .min ⁻¹): Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	61
Tabela 06 - Ritmo de filtração glomerular (RFG; mL.g ⁻¹ .min ⁻¹). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	63
Tabela 07 - Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa ⁺). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	65
Tabela 08 - Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa ⁺). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	67
Tabela 09 - Percentual de transporte tubular de potássio (%TK ⁺). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	69

Tabela 10 - Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%TK). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	71
Tabela 11 - Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	73
Tabela 12 - Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	75
Tabela 13 - <i>Clearance</i> osmolar (Cosm). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental para $n \geq 6$ em cada grupo;	77

1. INTRODUÇÃO

Os mecanismos de transporte de água e eletrólitos são fundamentais para a manutenção da vida e seu bom entendimento se faz cada vez mais necessário para a regulação do meio interno dos mamíferos. Peptídeos como o natriurético atrial (ANP), a urodilatina, a guanilina e a uroguanilina têm sido implicados na regulação da homeostase de sal e água. Essas substâncias têm afinidade por receptores de membrana, cujas mensagens são transduzidas em segundos mensageiros, alterando as concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). O esclarecimento desses mecanismos é de grande importância, ainda, sendo através deles que diversos patógenos são capazes de interferir nos transportes de membrana. Como exemplo pode ser citado a *Escherichia coli*, cuja toxina termo-estável causa forte aumento na excreção de fluidos e eletrólitos (Aimoto *et al.*, 1982; Chan & Ciannella, 1981; Greenberg & Guerrant, 1981).

Sabia-se que a toxina termo-lábil da cólera era capaz de causar grande aumento da secreção intestinal através da estimulação da adenilato ciclase. Alguns estudos, porém, demonstraram que esses efeitos eram atenuados, mas não completamente eliminados, após a fervura dos meios de cultura. Esse achado indicava a existência de uma toxina resistente ao calor (termo-estável). Desse mesmo modo, a *Escherichia coli* também possui dois tipos de toxinas, sendo a toxina termo-estável estimuladora da guanilato ciclase (Greenberg & Guerrant, 1981; Forte, 2004).

As funções do intestino e do rim estão intimamente relacionadas com o transporte de substâncias através das membranas. Os processos envolvidos são complexos e ainda não foram completamente esclarecidos. Anos atrás, quando esses mecanismos eram ainda menos compreendidos, talvez parecesse absurda uma comparação entre esses dois órgãos aparentemente tão diferentes. Atualmente, no entanto, já se sabe que suas atividades estão muito relacionadas. O intestino já foi até mesmo chamado de "grande néfron", no tocante a certos transportes essenciais para a manutenção da vida (Grimmel *et al.*, 1977; Arvanitakis *et al.*, 1988).

A guanilina, assim como os demais peptídeos da mesma família, ligam-se a receptores presentes tanto na mucosa intestinal quanto nos túbulos renais, fazendo, assim, uma ponte entre esses dois sistemas tão importantes no equilíbrio do organismo com o meio externo. Em 1978, os estudos de Carey já apontavam para a existência de um hormônio intestinal com atividade natriurética. A administração oral de sal em humanos e em animais experimentais é mais eficiente em causar natriurese, que a administração endovenosa de solução salina. Essa observação confirma a interação entre a função intestinal e a renal, na regulação do volume (Lennane *et al.*, 1975; Carey, 1978).

A história da descoberta das guanilinas é parecida com a dos opióides, considerando fato de que os receptores foram identificados bem antes dos ligantes endógenos, por se ligarem a substâncias exógenas similares, presentes na natureza. Seus antecedentes passaram a ser definidos a partir de toxinas, destacando-se a toxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa), cujo efeito natriurético foi primeiramente descrito por Lima e Fonteles, em 1983. O isolamento da guanilina ocorreu há pouco mais de uma década e muitos estudos ainda se fazem necessários para o esclarecimento de seu papel na homeostase do organismo (Currie *et al.*, 1992). No entanto, com o que se sabe já se pode apontar para grandes perspectivas na compreensão da fisiologia do transporte de fluidos e eletrólitos, como potencial terapêutico e inclusive, como agente diagnóstico.

Os peptídeos da família das guanilinas foram recentemente descobertos. No entanto, as pesquisas nesta área já apontam para grandes perspectivas na terapia do câncer de cólon, hipertensão, distúrbios do trato respiratório, na regeneração hepática, etc. O presente estudo apresenta um ligante sintético, a ser-thr-lys-guanilina e sua atividade renal, trazendo resultados surpreendentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A guanilato ciclase e o cGMP

O monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) é um segundo mensageiro importante, descoberto em 1963 e está envolvido em diversas funções fisiológicas do organismo. A guanilato ciclase representa um grupo de proteínas que possuem uma função enzimática comum, a produção de cGMP, mas diferem quanto a sua seletividade na ativação por ligantes (Ashman *et al.*, 1963; Waldman & Murad, 1987; Forte, 1999).

Existem duas formas principais de guanilato ciclase: a solúvel e a particulada. A ativação da forma solúvel ocorre em resposta ao óxido nítrico (NO). A particulada (GC) está presente na membrana e é ativada em resposta a peptídeos natriuréticos. Duas classes de peptídeos regulatórios que agem como primeiro mensageiro nesses receptores (GC) foram identificadas: a família das guanilinas e a das atriopéptinas (Ashman *et al.*, 1963; Waldman & Murad, 1987; Forte, 1999).

No entanto, o primeiro peptídeo identificado que ativa receptores GC em vertebrados foi a enterotoxina termoestável da *Escherichia coli*, ensaiada em células leucêmicas de ratos (Knoop and Thomas., 1983).

2.2. O primeiro ligante

Os primeiros esclarecimentos sobre o mecanismo pelo qual a toxina termoestável da *Escherichia coli* (STa) exerce sua ação intestinal surgiram com as publicações de Guerrant e Fields (Field *et al.*, 1978 e Hughes *et al.*, 1978). Estes estudos demonstraram que a STa induzia diarreia e perda de eletrólitos através da ativação da guanilato ciclase de membrana, e subsequente, aumento de cGMP em células do epitélio intestinal.

Inicialmente acreditava-se que esses efeitos biológicos eram localizados exclusivamente no intestino, e que a descoberta do ligante endógeno não teria importância fisiológica em outros sistemas (Guerrant *et al.*, 1980 e Rao *et al.*, 1980).

Pouco tempo depois, o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) foi descoberto por Furchgott e Zawadzki (1980); e os experimentos de De Bold e colaboradores (1981, 1982) revelaram que extratos de células atriais induziam uma profunda natriurese e diurese. Alguns anos mais tarde, foi esclarecido que o EDRF era o óxido nítrico (NO) e que as substâncias produzidas pelo átrio correspondiam à família das atriopeptinas (De Bold, 1985; Sudoh *et al.*, 1988, 1990; Furchgott, 1999).

O primeiro questionamento sobre a atividade renal da toxina termoestável da *Escherichia coli* (STa) surgiu em 1982, quando Fonteles e Lima estudaram seu efeito em sistema de perfusão de rim isolado de rato. O objetivo desses experimentos era comparar as diversas similaridades encontradas em se tratando de transporte de líquidos e eletrólitos no intestino e no rim. Usando uma toxina semipurificada, eles observaram uma diminuição no transporte tubular de eletrólitos. O ritmo de filtração glomerular e a resistência vascular renal, porém, permaneciam estáveis (Lima e Fonteles, 1983).

Em 1987, White e colaboradores verificaram a presença de receptores funcionais para STa em rim de gambá. O que foi também encontrado em diversos outros tecidos dessa espécie (Forte *et al.*, 1988, 1989; White *et al.*, 1989; Krause *et al.*, 1990), confirmando, portanto, aquelas observações iniciais.

Uma década depois dos primeiros experimentos com STa em sistema de rim isolado, quando as preparações puras já estavam disponíveis, Fonteles e colaboradores (1992) confirmaram seus resultados iniciais, que foram publicados pouco antes da descoberta das guanilinas (Lima *et al.*, 1992).

Estava definitivamente confirmado que a STa se ligava de forma específica a esses receptores de mamíferos, encontrados em diversos tecidos e que essa interação interferia de forma importante no transporte de líquidos e eletrólitos. Porém, o ligante endógeno permanecia desconhecido.

2.3. Isolamento dos peptídeos endógenos

Um jovem pesquisador, professor Mark Currie, iniciou um projeto com o objetivo de isolar peptídeos endógenos "STa-like" do intestino. Ele usou um tipo clássico de bioensaio baseado no fato de que células T84 de carcinoma de cólon humano apresentam grande produção de cGMP em resposta à STa (Guarino *et al.*, 1987). Essas células produzem pouca ou nenhuma resposta ao ANP (peptídeo natriurético atrial) e ao NO (óxido nítrico), o que sugeriria a presença de outra substância endógena para a ativação desses receptores.

Foi realizada uma triagem com extratos de diversos tecidos de rato na busca por fontes de células T84 com essa atividade de produção de cGMP. O que foi encontrado no jejuno e no rim, mas não no cérebro, fígado, baço e pulmões (Currie *et al.*, 1992).

Diversos testes foram realizados até que finalmente, em 1992, o primeiro ligante endógeno identificado foi isolado por Currie e colaboradores, em mucosa intestinal de ratos. Esse peptídeo de 15 aminoácidos foi denominado guanilina (do inglês: "guanylin") por ser ativador da guanilato ciclase e devido ao seu tecido de origem, o intestino. Sua estrutura pode ser observada na figura 01.

Estudos anteriores com gambás já haviam sugerido que outro peptídeo similar era encontrado abundantemente na urina. Esse peptídeo parecia ser o regulador endógeno para os receptores GC localizados na membrana de células de túbulos proximais renais (Forte *et al.*, 1988; Krause *et al.*, 1990 e Forte *et al.*, 1989). Após grande esforço, isolou-se um peptídeo ativo muito similar a guanilina, mas algumas diferenças em sua estrutura primária sugeriam se tratar de um novo peptídeo. Essa suspeita foi confirmada quando essa mesma substância foi subsequentemente isolada tanto na urina quanto na mucosa intestinal de gambá. Recebeu, assim, o nome de "uroguanilina", devido ao meio onde foi primeiramente encontrado (Hamra *et al.*, 1993). Posteriormente a uroguanilina foi também isolada como uma substância biologicamente ativa na urina humana e de ratos (Kita *et al.*, 1994 e Fan *et al.*, 1997a) e na mucosa intestinal de ratos e gambás (Li *et al.*, 1997 e Hamra *et al.*, 1996a). As estruturas desses peptídeos estão presentes na figura 01.

Atualmente está claro que a maioria dos vertebrados produz duas substâncias similares a STa: guanilina e uroguanilina, que são codificadas por dois genes intimamente muito próximos (Sciaky *et al.*, 1994; Whitaker *et al.*, 1997; Margert *et al.*, 1998).

GUANILINAS	
RATO / CAMUNDONGO	P N T C E I C A Y A A C T G C
HUMANO	P G T C E I C A Y A A C T G C
GAMBÁ	S H T C E I C A F A A C A G C
UROGUANILINAS	
RATO / CAMUNDONGO	T D E C E L C I N V A C T G C
HUMANO	N D D C E L C V N V A C T G C L
GAMBÁ	Q E D C E L C I N V A C T G C
LINFOGUANILINA	Q E E C E L C I N M A C T G Y
STa	N S S N Y C C E L C C N P A C T G C Y

Figura 01 – Estrutura primária de peptídeos representativos da família das guanilinas e da toxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa). As letras correspondem às abreviaturas dos aminoácidos. (Fonte: Forte, 2004)

Posteriormente, pesquisando-se a presença do mRNA da guanilina e uroguanilina, foi revelado que diversos tecidos apresentavam um ou ambos os peptídeos (Fan *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1997b). Em meio a essas pesquisas, foi detectado o mRNA de uma estrutura muito

similar à uroguanilina no baço e testículos. Codificava um polipeptídeo de 109 aminoácidos com 84% de identidade com a preprouroguanilina e apenas 40% de identidade com a preproguanilina. Estava isolado o terceiro peptídeo endógeno pertencente à família das guanilinas. Foi, então, denominado linfoguanilina, devido a sua grande expressão nos tecidos linfóides (Forte *et al.*, 1999). Sua estrutura também pode ser visualizada na figura 01.

2.4. Precursores e estrutura da guanilina, uroguanilina, linfoguanilina e STa.

Aparentemente, os genes da guanilina e uroguanilina foram formados a partir da duplicação de um precursor comum durante a evolução dos vertebrados (Janke & Amason, 1997). Estes peptídeos foram isolados na mucosa intestinal de aves, répteis e peixes. Os receptores GC-C também foram encontrados nestes vertebrados (Forte *et al.*, 1997; Krause *et al.*, 1995; Krause *et al.*, 1997).

Os peptídeos da família das guanilinas são sintetizados como pro-hormônios inativos (Hill *et al.*, 1995a; Hamra *et al.*, 1996b). Como ilustrado na figura 02, os peptídeos ativos são encontrados na porção COOH-terminal de polipeptídeos de 100-116 aminoácidos (Li *et al.*, 1997; Wiegand *et al.*, 1992a; Hill *et al.*, 1995a; Miyazato *et al.*, 1996a). Estes domínios ativos estão localizados de forma similar em seus precursores (Wiegand *et al.*, 1992b; Fan *et al.*, 1996; Dwarakanath *et al.*, 1989). Pro-guanilina, pro-uroguanilina e pro-STa possuem pequena ou nenhuma atividade biológica intrínseca até serem clivados por enzimas (ainda não identificadas), que liberam os peptídeos ativos para sua interação com receptores GC-C (DeSavauge *et al.*, 1992; Hamra *et al.*, 1996b; Kinoshita *et al.*, 1997; Nakazato *et al.*, 1998).

As estruturas da guanilina e da uroguanilina apresentam apenas 50% de identidade, que está presente nos quatro resíduos de cisteína (C) e na seqüência AC(T/A)GC, o que pode ser visualizado em azul na figura 01. Na estrutura da STa, esta seqüência também está presente, no entanto este peptídeo apresenta seis resíduos de cisteína, enquanto que a linfoguanilina, apresenta apenas três (Forte, 1999; Forte *et al.*, 1999).

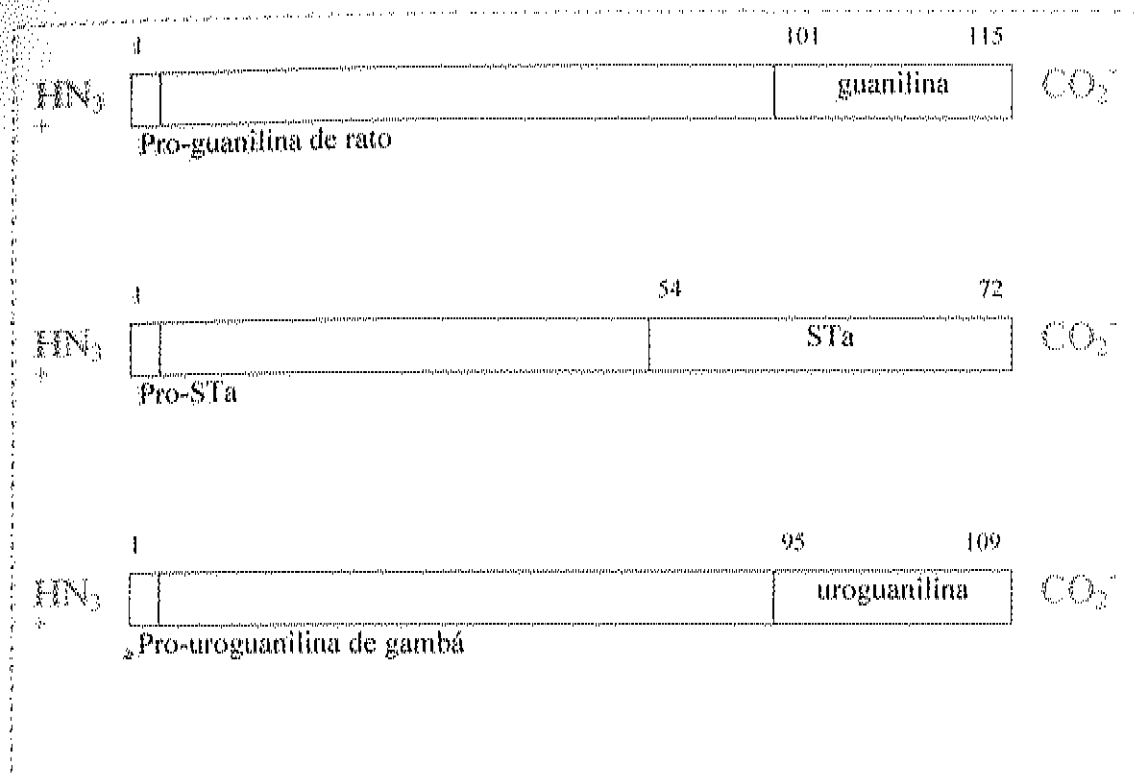


Figura 02 – Polipeptídeos precursores da guanilina, toxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa) e uroguanilina.
(Fonte: Forte, 1999)

A guanilina e a uroguanilina contêm duas pontes de dissulfeto, presentes entre a primeira e terceira, segunda e quarta cisteínas (Figura 03). Trabalhos demonstraram *in vitro* que essas pontes têm importante papel na estimulação da produção de cGMP (Currie *et al.*, 1992; Hamra *et al.*, 1993; Hidaka *et al.*, 1998). A STa possui uma ponte a mais que as anteriores. Essa diferença pode estar relacionada com a aparente diferença na potência da ação intestinal deste peptídeo em relação à guanilina e à uroguanilina (Garipey *et al.*, 1987). A linfoguanilina possui apenas uma ponte de dissulfeto (Forte *et al.*, 1999). Foi sugerida uma classificação desses peptídeos em três classes, de acordo com o número de pontes de dissulfeto, como pode ser visualizado na figura 03.

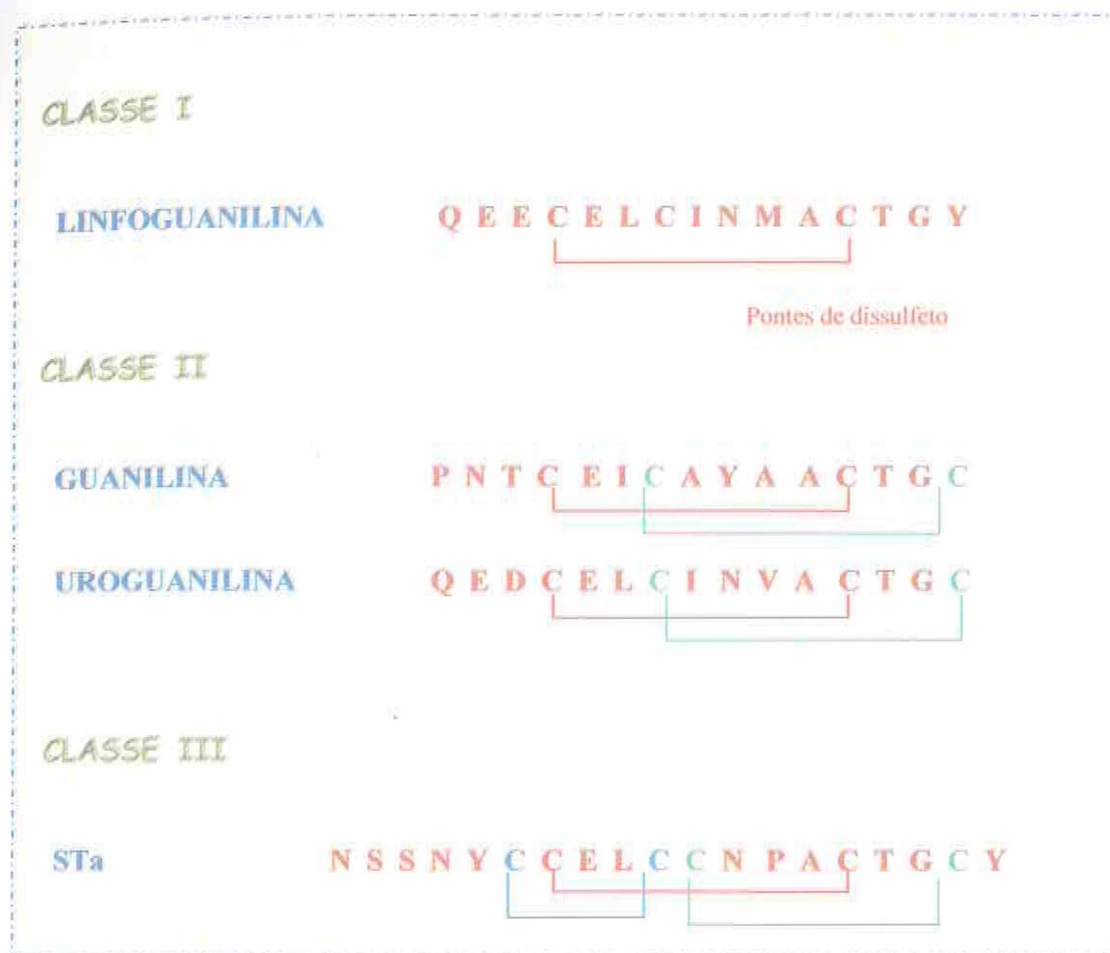


Figura 03 – Classificação dos peptídeos de acordo com as pontes de dissulfeto, que fazem ligações entre as cisteínas.

(Fonte: Forte, 1999)

A uroguanilina e a STa possuem uma asparagina interna (N), que não está presente na estrutura da guanilina (Hamra *et al.*, 1996a; Hamra *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 1998), o que pode ser a razão desses peptídeos apresentarem maior resistência ao ataque pela quimiotripsina, enquanto a guanilina é rapidamente clivada e inativada por hidrólise nos resíduos de tirosina (Y) ou fenilalanina (F) (Hamra *et al.*, 1996a, b; Carpick e Garipey, 1993). Estudos *in vitro* demonstraram que a prouroguanilina é clivada pela quimiotripsina, liberando o peptídeo biologicamente ativo, a uroguanilina (Fan *et al.*, 1996; Hamra *et al.*, 1996b). Foi sugerido, então, que endoproteases como esta poderiam ser responsáveis pela ativação *in vivo* da prouroguanilina. No entanto, a prouroguanilina e a guanilina são inativadas por essa enzima.

Outros estudos ainda se fazem necessários para que as enzimas específicas sejam identificadas (Forte, 1999).

Outra diferença entre a guanilina e a uroguanilina é a presença de aminoácidos ácidos na porção NH₂-terminal. Estes resíduos apresentam grande variabilidade na uroguanilina em diferentes espécies de mamíferos, mas não estão presentes na guanilina. Estudos com células T84 do epitélio intestinal e intestino delgado, demonstraram que esse fato ocasiona diferenças marcantes na fisiologia desses peptídeos (Hamra *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 1998). A face apical dos enterócitos apresenta microdomínios de diferentes pH, causados por diferenças localizadas nas concentrações de [H⁺] e [HCO₃⁻] (Lucas *et al.*, 1975; Rawlings *et al.*, 1987). Foi demonstrado que a uroguanilina causa grande aumento de secreção de íons quando o pH luminal é ácido (~5,5), enquanto que a guanilina não tem nenhuma ação em pH 5-6. Esta, por sua vez, é muito eficiente em pH 8, condição que reduz substancialmente a resposta secretora à uroguanilina. Uma possível explicação é que o pH modifique a afinidade desses peptídeos pelos receptores GC-C (Hamra *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 1998).

2.5. Os receptores GCs

Até o presente momento, apenas sete formas da guanilato ciclase foram clonadas em mamíferos (GC-A-G). No entanto, a identificação de aproximadamente 30 seqüências "GC-like" no genoma da *Caenorhabditis elegans* chamou a atenção para o fato de que o tamanho dessa família em mamíferos tem sido, provavelmente, subestimado (Yu *et al.*, 1997). Para apenas três (GC-A-C), os ligantes já foram identificados (Garbers, 1992).

Os receptores GCs foram divididos em três subfamílias, baseado nas seqüências primárias do seu domínio de ligação extracelular. GC-A e GC-B são receptores para os peptídeos natriuréticos atrial (ANP), do cérebro (BNP) e tipo-C (CNP) (Drewett e Garbers, 1994; Anand-Srivastava, 1997). Ainda nesse subgrupo se encontra o GC-G, receptor órfão que apresenta seqüência homóloga aos anteriores, mas não é ativado pelos seus ligantes (Schulz *et al.*, 1998). O segundo subgrupo é formado por três receptores órfãos: GC-D, GC-E e GC-F (Schulz *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1995). E o terceiro é formado pelo GC-C. A este se ligam os peptídeos da família das guanilinas e STa (Giannella, 1995; Mann *et al.*, 1997).

Os genes que codificam esses receptores e alguns de seus ligantes foram mapeados nos seus respectivos cromossomos em humanos e camundongos (Tabela 01). Um distúrbio degenerativo da retina foi relacionado com o cromossomo humano 17p31.1, o *locus* do receptor GC-E (Perrault *et al.*, 1996).

Gene	Cromossomo humano	Cromossomo de rato
GC-A	1q21-q22	3
GC-B	9p12-p21	4
GC-C	12p12	6
GC-D	11p15.4 ou 11q13.4-q14.1	7
GC-E	17p13.1	11
GC-F	Xq22	X
GC-G	10q24-q26	19
ANP	1p36.2	4
BNP	1p36.2	4
CNP	2q24-qter	1
Guanilina	1p34-p35	4
Uroguanilina	1p33-p34	4

Tabela 01 – Localização dos cromossomos que codificam receptores GCs (guanilato ciclase) e peptídeos natriuréticos (Schulz, 1999).

ANP –peptídeo natriurético atrial; BNP – peptídeo natriurético cerebral; CNP - peptídeo natriurético tipo C.

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam o surgimento de grupos de animais com ausência de certos genes (“targeted gene disruption” ou “gene knockout”) trouxe grandes avanços na pesquisa do papel biológico de receptores e na compreensão da função de cada proteína em doenças mais complexas ou hereditárias (Schulz, 1999).

Essa técnica foi utilizada para o gene que codifica receptores GC-C por dois grupos de pesquisadores distintos (Schulz *et al.*, 1997 e Mann *et al.*, 1997). Não foi encontrado nenhum efeito deletério no crescimento e sobrevivência dos camundongos "GC-C deficientes". Exames histopatológicos dos órgãos de animais adultos também se mostraram normais. Variações na dieta em relação à quantidade de sal, açúcar, proteínas e lipídeos também não revelaram nenhuma diferença entre os animais "knockout" e o grupo controle (Schulz *et al.*, 1997). No entanto, a inoculação oral de STA matou o grupo controle, mas os animais testados mostraram-se resistentes. A toxina da cólera também é uma enterotoxina termo-estável, mas age ativando a proteína G, o que leva a uma massiva produção de adenilato ciclase. Em nenhum dos dois grupos, os animais apresentaram resistência a essa toxina (Schulz *et al.*, 1997 e Mann *et al.*, 1997). Análises através de teste "Northern Blot" mostraram que os níveis de guanilina, uroguanilina e PKG-II estavam normais. Desse modo, provavelmente, a ausência de GC-C não apresenta efeito de "feedback" na transcrição de outros genes envolvidos no seu mecanismo de ação (Mann *et al.*, 1997).

Após a ativação desses receptores GC-C, mecanismo intracelular ocorre através da estimulação da atividade enzimática da proteína quinase II dependente do cGMP (PKG-II) (Joo *et al.*, 1998; Pfeifer *et al.*, 1996; Forte *et al.*, 1996) ou da proteína quinase II dependente do cAMP (PKA-II) (Forte *et al.*, 1992; Vaandrager *et al.*, 1997b; Lohmann *et al.*, 1997). Em outra pesquisa com "gene knockout", desta vez bloqueando o gene que codifica a proteína PKG-II, após a administração da STA *in vivo*, os animais não apresentaram aumento de secreção de água e ocorreu uma diminuição marcante na secreção de íons (Pfeifer *et al.*, 1996). Porém, essa pequena manutenção nesta resposta indica a existência de vias alternativas. Estes indivíduos apresentaram, ainda, um distúrbio na ossificação endocondral, o que levou ao Dwarfismo (Pfeifer *et al.*, 1996).

Estudos com culturas de células do epitélio intestinal mostraram que o cGMP, produzido através da estimulação dos receptores GC-C, é capaz de ativar PKA-II (Forte *et al.*, 1992; Chao *et al.*, 1994). Uma outra via foi sugerida para esse aumento da atividade de PKA-II através do cGMP. O cGMP se ligaria a fosfodiesterases (PDE), o que diminuiria a hidrólise de cAMP e conseqüentemente, ocorreria um aumento na ativação de PKA (Forte, 1999).

A proteína reguladora da condução transmembrana da fibrose cística (CFTR), canal de cloreto e bicarbonato, é um dos membros da família de proteínas transportadoras de pequenas moléculas através da membrana celular, em um processo que depende do ATP. A mutação do gene da CFTR tem como consequência a fibrose cística. Tanto a PKG como a PKA são capazes de fosforilar a CFTR, o que provoca grande aumento na secreção de Cl^- e HCO_3^- através da membrana (French *et al.*, 1995; Forte *et al.*, 2000a/b). Esse mecanismo pode está esquematizado na figura 04. A CFTR representa um ponto em comum nos mecanismos de ação da STa e da toxina da cólera (Forte *et al.*, 1992; Vaandrager *et al.*, 1998; Field, 2003).

Camundongos transgênicos sem expressão dessa proteína apresentam diminuição marcante na resposta intestinal à STa e à guanilina (Cuthbert *et al.*, 1994; Grubb *et al.*, 1997). Esses camundongos CFTR “knockout”, precisaram de tratamento crônico com laxantes para não morrer com obstruções de íleo e intestino grosso, devido a uma grande diminuição no fluxo de fluidos para o lúmen intestinal (Grubb *et al.*, 1997). No duodeno e jejuno destes animais, houve uma manutenção, ainda que pequena, do aumento da secreção de íons em resposta à uroguanilina (Joo *et al.*, 1998). O que também fora observado, porém ainda em menor proporção, no cólon destes camundongos em câmara de Ussing, após a administração de guanilina (Cuthbert *et al.*, 1994).

Estudos têm sido realizados, no sentido de descobrir potenciais inibidores de CFTR. Uma classe de tiazolidínicos mostrou-se eficiente *in vivo* na diminuição da secreção intestinal de fluidos e eletrólitos. Trabalhos como esse oferecer grandes perspectivas no tratamento da cólera e da “diarréia dos viajantes”, que representam graves problemas de saúde pública em países de terceiro mundo (Ma *et al.*, 2002; Thiagarajah *et al.*, 2004).

Outra possível via é através dos canais de cloreto CIC-2. Foi observado que sua expressão está aumentada no intestino delgado de camundongos CFTR “knockout” (Joo *et al.*, 1999). Isso poderia explicar a manutenção da condutância iônica em resposta à uroguanilina nestes animais (Forte, 1999).

Hidaka e colaboradores, em 2002, estudaram o micro domínio de ligação dos receptores GC-C, verificando que ele se encontra muito próximo à membrana e que sua ligação com o substrato independe de outros domínios do receptor.

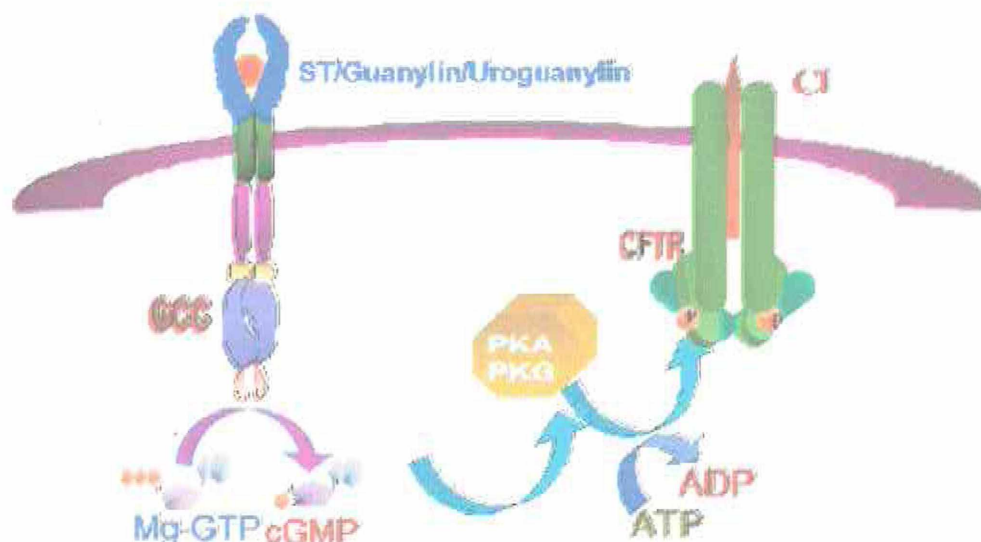


Figura 04 – Transdução de sinal do GC-C (guanilato ciclase de membrana). CFTR: proteína reguladora da transmissão transmembrana da fibrose cística; PKA: proteína quinase dependente de cAMP; PKG: proteína quinase dependente de cGMP.

(Fonte: Bhandari *et al.*, 2001).

2.6. Distribuição no organismo

Já em 1989, Forte e colaboradores identificaram a presença de receptores para STa no intestino, rins e testículos de gambás. De fato, a idéia inicial de que a ação da guanilina ocorria exclusivamente no intestino estava errada. Isolada em 1992 por Currie e colaboradores em jejuno de rato, este peptídeo foi posteriormente isolado em diversos tecidos.

Nesse mesmo ano, verificou-se a presença de seu RNA mensageiro em fígado e cólon humanos; e em cólon de rato. No estômago e esôfago, sua presença era praticamente indetectável (Wiegand, 1992a/b). Ainda em 1992, Schulz detectou a presença desse peptídeo nas suprarrenais, rins, útero e trompas de rata. Foi encontrada, também, em mucosa intestinal de gambás (Hamra *et al.*, 1993 e 1996a/b), fígado (Li & Goy, 1993) e ao longo do trato respiratório (Zhang *et al.*, 1998), no pâncreas e bexiga humanos (Kulaksiz *et al.*, 2002, 2004).

A uroguanilina foi primeiramente isolada na urina e, em seguida, na mucosa intestinal de gambá (Hamra *et al.*, 1993). Posteriormente, na urina humana e de ratos (Kita *et al.*, 1994 e Fan *et al.*, 1997a) e mucosa intestinal de ratos (Hamra *et al.*, 1996a). Além do estômago, intestino delgado e cólon, Miyazato e colaboradores verificaram, ainda, a presença da uroguanilina em pulmões, pâncreas e rins (Miyazato *et al.*, 1996a/b). Ainda em 1996, Fan e colaboradores detectaram RNA mensageiro desse peptídeo em átrio e ventrículo de gambá.

Ambos os peptídeos foram encontrados, ainda, no plasma (Kuhn *et al.*, 1993; Nakazato *et al.*, 1994 e 1996; Hess *et al.*, 1995) e ao longo de todo o trato gastrintestinal, incluindo glândulas, como as salivares, esôfago, fígado, ductos biliares e pâncreas (Forte *et al.*, 1989; Laney *et al.*, 1992 e 1994; Reinecke *et al.*, 1996; Scheving & Russell, 1996; Fan *et al.*, 1997b; Magert *et al.*, 1998 e 1999; London *et al.*, 1999; D'Este *et al.*, 2000; Jaleel *et al.*, 2002; Kulaksiz & Cetin, 2002; Vaccaro *et al.*, 2004). Na urina de rato, gambá e humanos, as concentrações de uroguanilina bioativa são maiores que as de guanilina (Kita *et al.*, 1994 e Fan *et al.*, 1995; Hamra *et al.*, 1996a). Já foram isolados em um número representativo de mamíferos, incluindo o ser humano (Hill *et al.*, 1995b; Miyazato *et al.*, 1996b; Balint *et al.*, 1997; Andreis *et al.*, 1999; Spreca *et al.*, 2000; Jaleel *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Kulaksiz *et al.*, 2001, 2002a/b, 2004; Maake *et al.*, 2003).

No intestino, embora a presença de ambas tenha sido observada ao longo de todo o trato, a maior expressão do mRNA da uroguanilina ocorre na porção proximal do intestino delgado, enquanto que o mRNA da guanilina encontra-se com maior expressão na porção distal do intestino delgado e intestino grosso (Wiegand *et al.*, 1992 a e b; London *et al.*, 1997; Whitaker *et al.*, 1997). Alguns estudos demonstraram que a uroguanilina é mais abundante em células enterocromafins do estômago e intestino (Nakazato *et al.*, 1998; Perkins *et al.*, 1997), enquanto que os níveis de guanilina são muito elevados nas células de Goblet secretoras de

mucina do intestino (Lewis *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1995). Essa heterogeneidade na distribuição sugere processos fisiológicos e de regulação específicos para cada um desses peptídeos.

O mRNA da linfoguanilina está presente abundantemente no rim e coração (Blanchard *et al.*, 1997). Foi identificado, ainda, no timo, baço, medula óssea, linfonodos e testículos (Forte *et al.*, 1999).

Em 1995, Krause e colaboradores estudaram a distribuição de receptores GC-C no intestino de aves. Relataram que, embora estivessem presentes ao longo de todo o trato, encontravam-se principalmente no intestino delgado, seguido pelo cólon. Em 2000(b), Carrithers e colaboradores estudaram a distribuição dos receptores GC-C ao longo do néfron. Seus resultados podem ser visualizados na tabela 02.

Segmento do néfron	GC-C	PKG-II	Guanilina	Uroguanilina
Glomérulo	---	58,3±10,7%	A	A
Túbulo contorcido proximal	90 ± 8,6%	75,0±8,5%	65,1±6,2%	---
Alça de Henle, segmento espesso	52,1 ± 6%	55,8±14,4%	81,3±5,9%	60±5,8%
Alça de Henle medular, segmento delgado	70,7 ± 4%	53,5±17,5%	55,4±4,9%	55,4±4,9%
Alça de Henle cortical, segmento delgado	---	---	52,6±4,3%	89,9±6%
Túbulo contorcido distal	---	---	---	---
Túbulo coletor cortical	100%	100%	36,7±4,1%	65,1±4,5%
Túbulo coletor medular	60,2±6,3%	85,9±6,2%	100%	100%

Tabela 02 - Expressão do mRNA de receptores GC-C, de PKG-II, de guanilina e de uroguanilina ao longo do néfron (Carrithers *et al.*, 2000).

GC - guanilato ciclase;

PKG-II - proteína quinase G, dependente de cGMP;

--- Baixos níveis de mRNA;

A - Ausência de mRNA

2.7. A família das guanilinas e sua ação renal

A administração de STa *in vivo* em gambás ocasiona um forte aumento da concentração de cGMP na urina (Forte *et al.*, 1988 e 1989) e, em rim isolado perfundido, causa forte aumento na excreção de água, sódio, potássio e cloreto (Lima *et al.*, 1992). O tratamento de camundongos com uroguanilina e STa por via intravenosa também apresentou este mesmo aumento de excreção. Neste estudo, porém, a guanilina não causou efeito algum (Greenberg *et al.*, 1997). Em 1998, Fonteles e colaboradores demonstraram, também em rim isolado e perfundido de rato, que a guanilina e a uroguanilina apresentam atividades natriurética, calurética e diurética, sendo a última mais potente que a primeira e a STa mais potente que ambas (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1996, 1998 e 2001; Greenberg *et al.*, 1997; Carrithers *et al.*, 1999 e 2004; Santos-Neto *et al.*, 1999 e 2003).

A administração oral de grandes quantidades de cloreto de sódio resultaram em um aumento nos níveis de mRNA da guanilina e uroguanilina nos rins e intestinos (Potthast *et al.*, 2001; Carrithers *et al.*, 2002; Fukae *et al.*, 2002). Houve aumento, ainda, da excreção de uroguanilina na urina (Fukae *et al.*, 2002). O tratamento em perfusão de intestino isolado com cloreto sódio estimulou a secreção de guanilina (Kita *et al.*, 1999). Em outros estudos, a exposição de culturas de células à elevados níveis de sal causou aumento na expressão de mRNA de guanilina e uroguanilina (Potthast *et al.*, 2001; Steinbrecher *et al.*, 2002a/b). Foi observado que a guanilina, proguanilina, uroguanilina e prouroguanilina circulam no plasma humano e de outros animais (Kuhn *et al.*, 1993, 1994b; Nakazato *et al.*, 1994, 1996; Hess *et al.*, 1995; Date *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1999; Fukae *et al.*, 2000).

Os valores plasmáticos em humanos saudáveis foram mensurados em 30-40 pM para guanilina e 5-7 pM para a uroguanilina, sugerindo que a guanilina é mais abundante na circulação. Na insuficiência renal crônica (IRC), os níveis plasmáticos de ambos encontram-se aumentados. Estudos indicaram que os níveis de guanilina aumentam em >1 nM na IRC (Kuhn *et al.*, 1994a). Outras pesquisas relataram um aumento de até 8 nM em pacientes em hemodiálise (Date *et al.*, 1996; Nakazato *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1997b). Já os níveis plasmáticos de uroguanilina aumentaram de 200-300 pM em pacientes em hemodiálise (Kinoshita *et al.*, 1999; Kinoshita *et al.*, 1997a). Portanto, a severidade do dano renal está

diretamente relacionada com a magnitude do aumento da concentração plasmática de guanilina e uroguanilina.

Estudos em humanos e em animais experimentais indicaram que a proguanilina é a forma da guanilina mais abundante no plasma (Kuhn *et al.*, 1993 e 1996; Nakazato *et al.*, 1994), enquanto que tanto a uroguanilina ativa quanto a prouroguanilina inativa estão igualmente presentes na circulação (Hess *et al.*, 1995; Nakazato *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1999). No entanto, na IRC severa, os níveis plasmáticos de prouroguanilina encontram-se enormemente aumentados em relação aos de uroguanilina, sugerindo que o rim tenha um papel importante na sua ativação (Nakazato *et al.*, 1996).

Os níveis de uroguanilina também estão aumentados na insuficiência cardíaca (Carrithers, *et al.*, 2000a), glomerulonefrite (Kinoshita *et al.*, 1997a) e na síndrome nefrótica (Kinoshita *et al.*, 1999). Um ponto em comum entre esses três distúrbios é a retenção de sal e água pelo rim, o que tem como consequência edema. Foi sugerido que essa alteração na concentração plasmática pode representar um efeito compensatório no aumento da secreção de uroguanilina por outros órgãos, como o coração e o trato gastrointestinal, para promover efeitos diuréticos e natriuréticos (Fonteles *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1997).

Confirmando esse papel da uroguanilina na regulação de sódio, Andreis e colaboradores, em 1999, demonstraram a presença de receptores GC-C nas glândulas adrenais e que a estimulação desses receptores causa inibição da secreção de aldosterona. Essas glândulas também produzem e liberam guanilina, que pode estar envolvida na regulação da síntese e secreção desse importante mineralocorticoide (Reinecke *et al.*, 1996).

Estudos com a deleção do gene que codifica a uroguanilina produziram camundongos com diminuição significativa na capacidade de aumentar a excreção de sódio na urina após a ingestão de grande quantidade de sal (Lorenz *et al.*, 2003; Forte, 2004). Esse efeito teve como consequência, um aumento da pressão arterial. Quando elevados níveis de sódio foram administrados por via endovenosa, estes animais excretaram na urina concentrações semelhantes aos camundongos normais. Nestes camundongos ocorreu, ainda, uma grande redução na expressão de guanilina no epitélio intestinal, sugerindo que a uroguanilina tem um papel importante na regulação da guanilina no trato gastrointestinal.

Essa diminuição na resposta renal à elevada ingestão de sódio não ocorreu quando animais com a deleção do gene da guanilina foram produzidos (Steinbrecher *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2003).

2.8. A família das guanilinas e sua ação intestinal

A STa, a guanilina e a uroguanilina têm ações intestinais similares. Estimulam a secreções de bicarbonato e cloreto, o que causa um aumento da secreção de sódio e água para o lúmen intestinal (Joo *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 1994b; Guba *et al.*, 1996; Volante *et al.*, 1997; Ieda *et al.*, 1999). Os três peptídeos são agonistas dos receptores GC-C e estimulam a produção intracelular de cGMP (Forte *et al.*, 1989 e 1993; Hamra *et al.*, 1993 e 1997; Kita *et al.*, 1994; Joo *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 1994b; Guba *et al.*, 1996). Estudos demonstraram que a ação intestinal é dependente dos receptores GC-C, uma vez que, em camundongos sem a expressão desse receptor ("Knockout"), os efeitos foram completamente bloqueados (Schulz *et al.*, 1997; Mann *et al.*, 1997). Contudo, há indícios da existência de outros receptores para esses peptídeos ao longo do trato entérico (Mann *et al.*, 1997).

No intestino grosso, onde a guanilina é mais abundante, sua ação secretora de íons e eletrólitos, juntamente com a mucina, provavelmente tem um efeito importante na proteção da mucosa (Forte, 1999). A secreção intestinal de HCO_3^- no intestino delgado potencializa a ação da guanilina, tendo em vista que esse peptídeo tem potência e eficácia maiores em pH alcalino (Hamra *et al.*, 1997; Guba *et al.*, 1996). A uroguanilina, por sua vez, apresenta sua maior potência em pH ácido. Desse modo, provavelmente tem importante papel na regulação da secreção de bicarbonato no estômago e intestino delgado, ajudando na neutralização e proteção do epitélio (Forte, 1999; Hamra *et al.*, 1997; Guba *et al.*, 1996).

2.9. Câncer de cólon

Foi demonstrado que a produção de guanilina é inibida no câncer de cólon, embora nos tecidos adjacentes, tenha sido encontrada a expressão normal de seu RNA mensageiro (Cohen *et al.*, 1998). As células cancerígenas continuam a expressar normalmente os receptores GC-C (Carrithers *et al.*, 1996). A inibição da guanilina nessas

possivelmente representa importantes conseqüências fisiopatológicas no desenvolvimento dos adenocarcinomas de cólon a partir de pólipos benignos. Futuros esclarecimentos a esse respeito se fazem necessários, mas pode-se especular a possibilidade do uso dessa família de peptídeos na prevenção e/ou tratamento do câncer de cólon (Cohen *et al.*, 1998; Forte, 1999).

2.10. Fígado

Foi observado que, em processos regenerativos em conseqüência de hepatectomia parcial ou injúria ocasionada por agentes hepatotóxicos, ocorre um forte aumento na expressão de GC-C no fígado. Foi demonstrado que, 24 horas após a ressecção de 2/3 do fígado, há um aumento significativo na atividade desses receptores (Laney *et al.*, 1994; Scheving & Russel, 1996).

Além disso, os níveis de GC-C no fígado de fetos e neonatos de ratos são similares aos encontrados no tecido hepático adulto em fase de regeneração (Laney *et al.*, 1992). Esses achados sugerem um importante papel dos peptídeos da família das guanilinas na regeneração hepática. Se essa hipótese é realmente verdadeira, um grande avanço inclusive na qualidade dos transplantes hepáticos pode ser esperado (Forte, 2004).

2.11. Trato respiratório

Receptores para peptídeos da família das guanilinas foram encontrados no epitélio do trato respiratório (Krause *et al.*, 1990). Também foi demonstrado que a guanilina é produzida pelas células Clara nos pulmões (Cetin *et al.*, 1995). Verificou-se, ainda, que esse peptídeo é capaz de ativar um novo mecanismo de condutância de cloreto no epitélio respiratório, através da ação do cGMP intracelular (Zhang *et al.*, 1998). Em um outro estudo a administração sistêmica da uroguanilina, mas não da guanilina, foi eficaz na melhora dos sintomas de asma em porquinhos da Índia (Ohbayashi *et al.*, 1998). Este trabalho trouxe indícios para a possibilidade do seu uso no tratamento da asma humana (Forte, 1999). A possibilidade de que a uroguanilina seja capaz de aumentar a secreção de cloreto e bicarbonato, através de canais CIC-2 ou outros canais de Cl⁻, trouxe grandes perspectivas para

o tratamento dos distúrbios respiratórios presentes em pacientes com fibrose cística (Joo *et al.*, 1999; Riordan *et al.*, 1989; Forte, 1999).

2.12. Sistema Imunológico

A regulação da atividade dos receptores GC-C pela STA foi primeiramente observada em ratos com leucemia (Knoop *et al.*, 1983). Este peptídeo estimulou o aumento de cGMP e da liberação de histamine nesses linfócitos. A alta expressão da linfoguanilina e dos receptores GC-C em tecidos linfóides sugere a importância dessa família de peptídeos nos mecanismos imunológicos (Fan *et al.*, 1997b; Forte *et al.*, 1999).

2.13. Hipertensão

Uma das grandes perspectivas a cerca do potencial terapêutico dos peptídeos da família das guanilinas, em especial a uroguanilina é que eles possam ser usados no tratamento de pacientes que apresentam um aumento na pressão arterial dependente da ingestão de sal (Forte, 2004).

Foi sugerido por Lorenz e colaboradores, em 2003, que os camundongos knockout para o gene da uroguanilina representam um ótimo modelo para se pesquisar a potência e eficácia desses peptídeos em animais que apresentem hipertensão dependente do sal, secundária a uma deficiência de uroguanilina.

3. OBJETIVOS

- ✓ Estudar os efeitos renais da Ser-Thr-Lys-guanilina em sistema de perfusão de rim isolado, avaliando os parâmetros de pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, transporte tubular total e proximal de sódio, potássio, cloreto e *clearance* osmolar.
- ✓ Comparar os resultados encontrados com os dados presentes na literatura em relação aos efeitos renais dos peptídeos que compõem a família das guanilinas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Perfusão de rim isolado

4.1.1. O SISTEMA

O método de perfusão de rim isolado consiste em acoplar um rim a um sistema que foi desenvolvido para simular as condições encontradas por esse órgão no organismo vivo. Dessa forma pode-se observar a atividade renal de substâncias sem que haja qualquer interferência endógena. As primeiras perfusões foram realizadas por Lobell, em 1849. De lá para cá, várias alterações foram feitas e o sistema foi sendo modificado (Bowman, 1970; Ross *et al.*, 1973; Cohen *et al.*, 1977; Fonteles, 1980; Fonteles *et al.*, 1983; Araújo Filho, 1995). Essas mudanças vieram com os avanços no conhecimento da fisiologia renal e com a descoberta de novas substâncias, permitindo uma melhoria nas perfusões que vêm acontecendo até os dias de hoje. Em 1970, Bowman adicionou a fração V de albumina bovina pura à solução perfusora. Schurek, em 1980, iniciou a utilização da solução de Krebs-Henseleit. Outras alterações ocorreram ainda, como o uso de um filtro miliporo (Pegg, 1971; Ross *et al.*, 1973; Cohen *et al.*, 1977; Fonteles, 1980) e de substâncias como glicose, aminoácidos, lactato, oxalacetato e piruvato (Bahlman *et al.*, 1967; Trimble e Bowman, 1973; De Melo e Maack, 1976). Em 1974, Hamilton e colaboradores adicionaram um pulmão artificial do tipo silástico. Baseado nesse modelo, foi sugerida a adição desse pulmão ao sistema fechado nos trabalhos de Fonteles (1980) e Moreira Lima (1983). Existem dois tipos de sistema de perfusão renal. O aberto, no qual o perfusato não recircula pelo rim e o fechado, onde ocorre a recirculação.

Nos experimentos do presente trabalho, foi utilizado o sistema fechado inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman e Maack (1974) e Ross (1978), modificado em nosso laboratório pela adição de um pulmão artificial para melhorar a oxigenação (Hamilton *et al.*, 1974) e pela utilização de um filtro miliporo 1,2 μm (Pegg, 1971). Foi definido o acréscimo de albumina bovina, fração V, 6g% à solução de Krebs-Henseleit (Monteiro, 1990, Lima *et al.*, 1992). Esse sistema é mais econômico, já que o perfusato liberado pela veia renal é reutilizado. Gasta-se, portanto, menos albumina, diminuindo o orçamento do projeto.

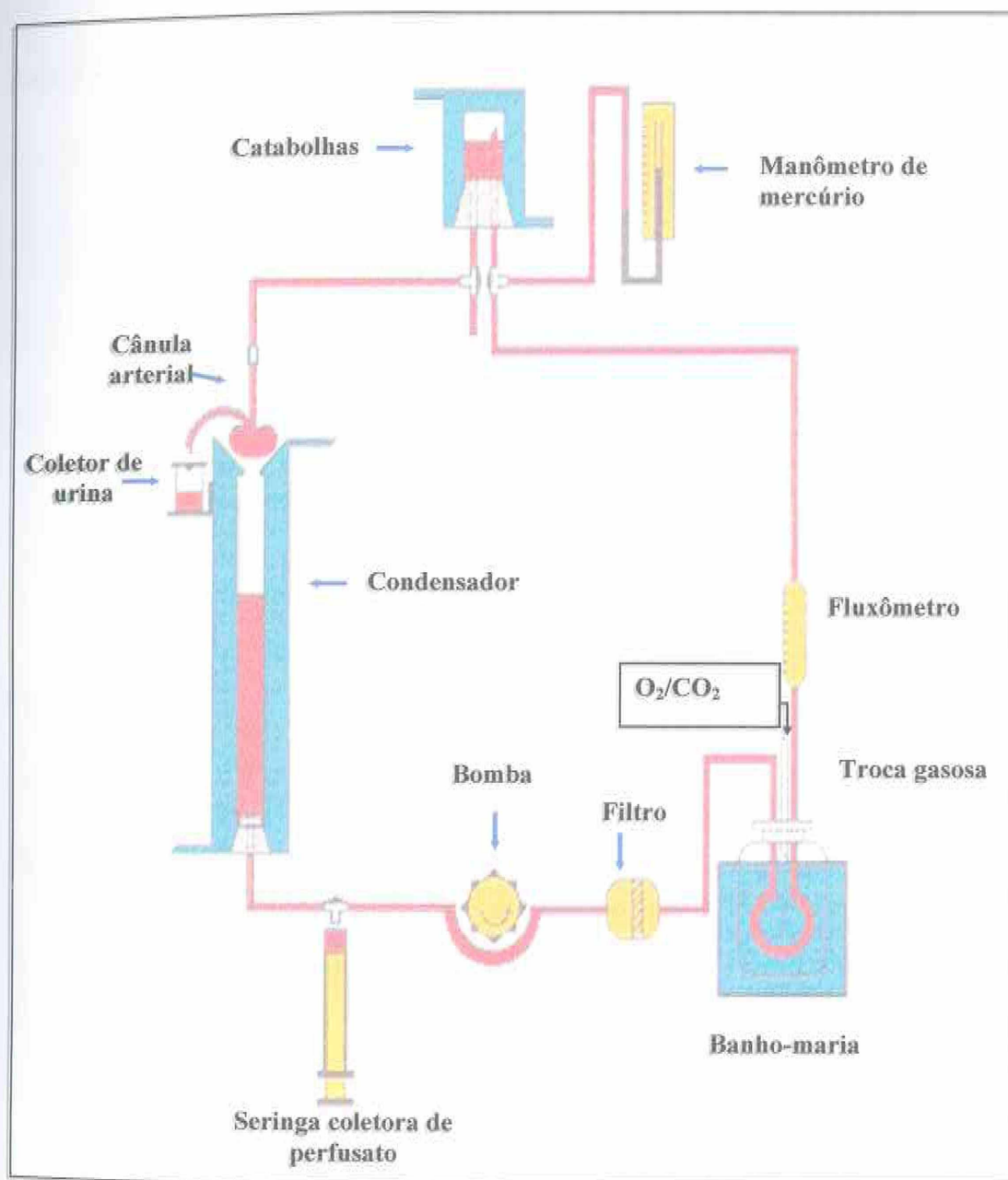


Figura 05 - A – Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado de rato.

O sistema utilizado em nossos experimentos, como pode ser observado na figura 05-A, é composto pelas seguintes partes:

⇒ Condensador – mantém aquecido o cilindro reto que comporta a solução perfusora;

⇒ Coletor de urina;

⇒ Seringa coletora de perfusato;

⇒ Bomba de perfusão (Watson) – é o “coração” do sistema. Bombeia a solução perfusora em cinco velocidades diferentes;

⇒ Filtro de milipore ($8\mu\text{m}$) – filtra a solução perfusora, dificultando a passagem de células ou *debris* que casualmente permaneçam no rim após sua colocação no sistema;

⇒ Banho-maria – aquece o oxigenador ou pulmão artificial, mantendo a temperatura constante em 37°C ;

⇒ Oxigenador ou pulmão artificial – promove as trocas gasosas (95% de O_2 e 5% de CO_2);

⇒ Fluxômetro – mede o fluxo de perfusão;

⇒ Catabolhas – retira as bolhas do sistema, evitando que entrem no rim e causem embolia;

⇒ Manômetro de mercúrio – mede a pressão de perfusão;

⇒ Bomba aquecedora com termostato – mantém o sistema à temperatura de 37°C ;

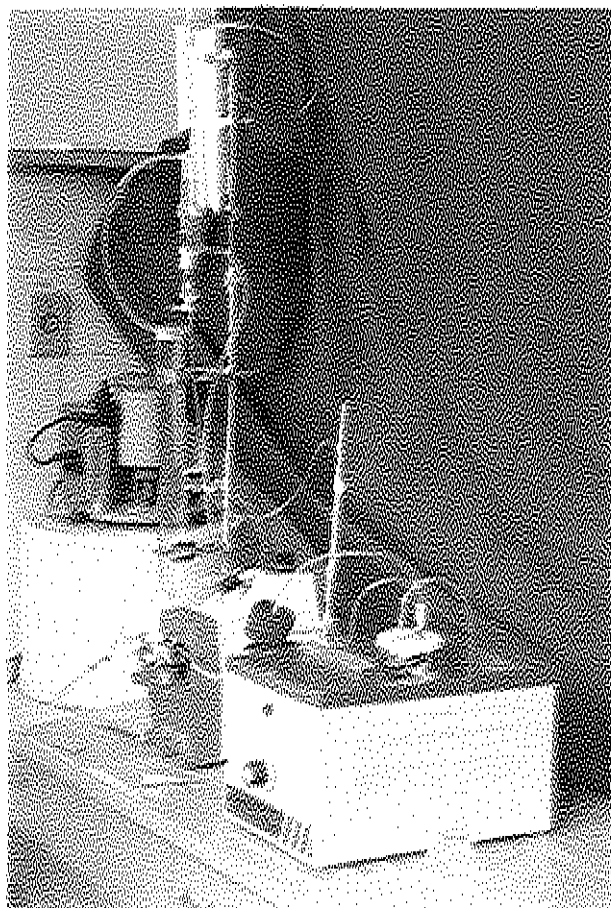


Figura 05 - B ~ Sistema de perfusão de rim isolado de rato utilizado em nossos experimentos.

4.1.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar-Kyoto adultos, de ambos os sexos, pesando entre 250 e 280 g, oriundos do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Para a realização dos experimentos, os animais eram submetidos a um jejum de 24 horas, com água *ad libitum*.

4.1.3. Preparação do sistema

Antes de cada experimento, o sistema era cuidadosamente montado e calibrado. Após a colocação de solução salina no sistema, era sempre verificada a presença de qualquer vazamento, que quando encontrado, era rapidamente solucionado. Para a calibração, a solução salina aquecida a uma temperatura de 37° C, era coletada por um minuto em proveta milimetrada a cada velocidade da bomba – de 1 a 5. Ao mesmo tempo, eram também verificadas as medidas do fluxômetro e do manômetro de mercúrio. Entre cada mudança de velocidade da bomba esperava-se aproximadamente cinco minutos, para a adaptação do sistema.

O objetivo da calibração era verificar o fluxo de perfusão frente à resistência do próprio sistema. Para tanto, os resultados dessas calibrações foram compilados em curvas, onde plotamos a velocidade da bomba no eixo das abscissas contra a pressão de perfusão, volume de salina coletada (fluxo) e o valor obtido no fluxômetro, no eixo das ordenadas.

As Figuras 06, 07 e 08 mostram que o sistema se manteve constante em todos os grupos experimentais.

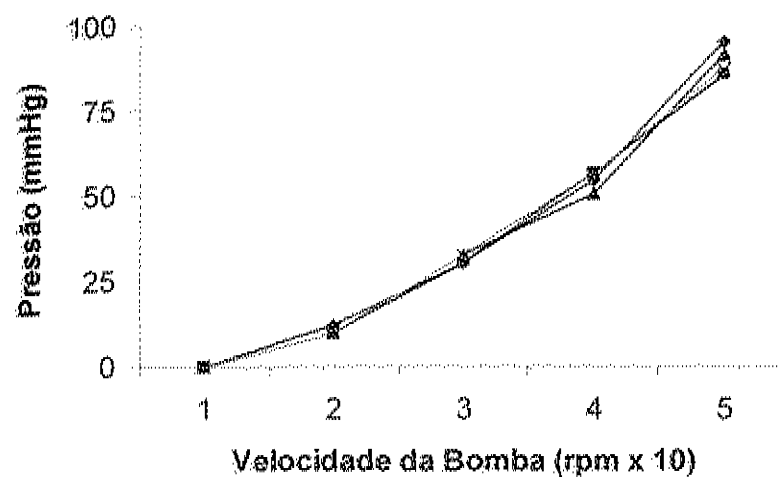


Figura 06 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus pressão.

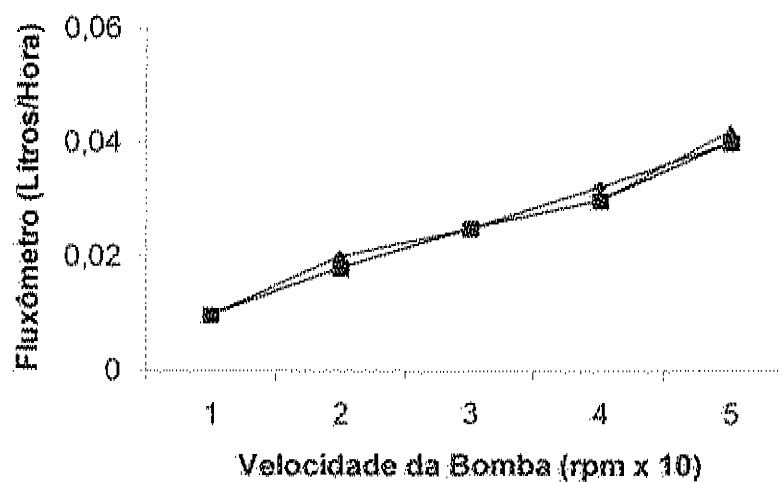


Figura 07 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus medida do fluxômetro.

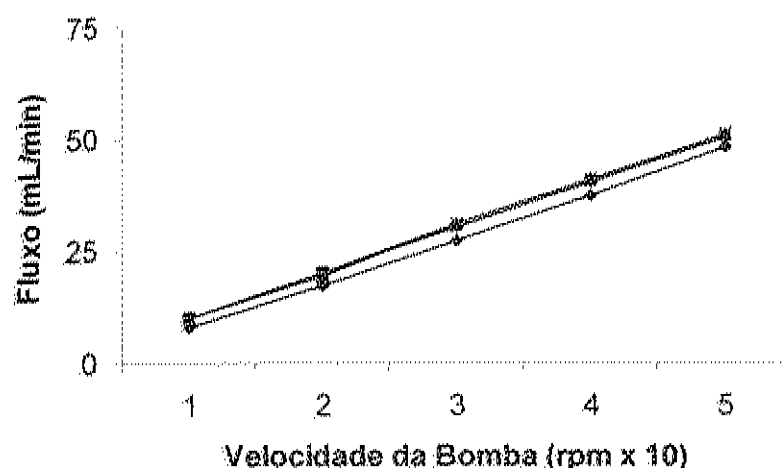


Figura 08 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus fluxo.

4.1.4. Solução perfusora

A solução escolhida foi a de Krebs-Henseleit (1932) modificada, associada à albumina bovina fração V, 6 g % (Monteiro, 1990; Lima *et al.*, 1992). A solução tem grande importância na manutenção das funções renais no decorrer dos experimentos.

Inicialmente era preparada uma solução de Krebs-Henseleit, concentrada a 20%, composta de 138g de NaCl, 7g de KCl, 3,2g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5,8g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10g de Uréia.

No tempo de 48 horas antes do experimento, separava-se 100ml desta solução e acrescentava-se 4,2g de NaHCO_3 , 0,74g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2g de glicose e 0,05g de penicilina G cristalina potássica. Em seguida, completava-se o volume para 2L com água bidestilada. Retirava-se, então, 300ml desta última solução, na qual adicionava-se albumina bovina (6%). Em seguida, era realizada a diálise, auxiliada por um homogeneizador, que tinha por objetivo retirar substâncias contaminantes, como piruvato, citrato e lactato (Cohen *et al.*, 1977, Schurek *et al.*, 1970; Ross, 1978). Os 1700ml restantes eram usados como solução para a diálise, a qual era trocada com 24 horas. Após 48 horas de diálise, acrescentava-se 0,15g de inulina. O pH da solução era ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

4.1.5 Substâncias utilizadas

NaHCO₃ (Synth)
NaH₂PO₄.H₂O (Synth)
NaCl (Synth)
MgSO₄.7H₂O (Reagen)
Manitol (Reagen)
Uréia (Reagen)
KCl (Merck)
Glicose (Squibb)
Heparina (Roche)
Fração V de albumina bovina (SIGMA)
Penicilina G potássica cristalina (Squibb)
Inulina (SIGMA)
Pentobarbital sódico (SIGMA)

4.1.6. Técnica cirúrgica

Para a retirada do rim, os animais eram anestesiados com pentobarbital sódico, na dose de 50mg/kg de peso vivo, por via intraperitoneal. Após a indução, eram administrados 3ml de manitol a 20% por via intravenosa, através da veia femoral, para facilitar a diurese (Figura 09 – A). Fazia-se, então, a anti-sepsia de todo o abdome. A técnica cirúrgica utilizada constava de uma incisão ao longo da linha Alba de aproximadamente 5cm. Seguida de outra perpendicular à primeira, de aproximadamente 3cm. Rebatia-se as vísceras para a esquerda, permitindo a visualização do rim direito. Amarrava-se e retirava-se a glândula adrenal a fim de que nenhum de seus hormônios viesse a influenciar os resultados do experimento. Isolava-se cuidadosamente o ureter, amarrando-o, para facilitar sua posterior canulação com tubo de polietileno (PE50). Retirava-se, então, a cápsula renal. Limpava-se a artéria mesentérica e renal. Canulava-se o ureter e a artéria renal, a partir da mesentérica superior, sem que houvesse interrupção do fluxo sanguíneo para o rim (Bahlmann *et al.*, 1967; Nishitsutsuji-Uwo *et al.*, 1967), como pode ser visto na figura 09. Retirava-se cuidadosamente este órgão,

limpava-se e colocava-se no sistema. Esperava-se um período de 20 a 30 minutos para a adaptação renal às novas condições.

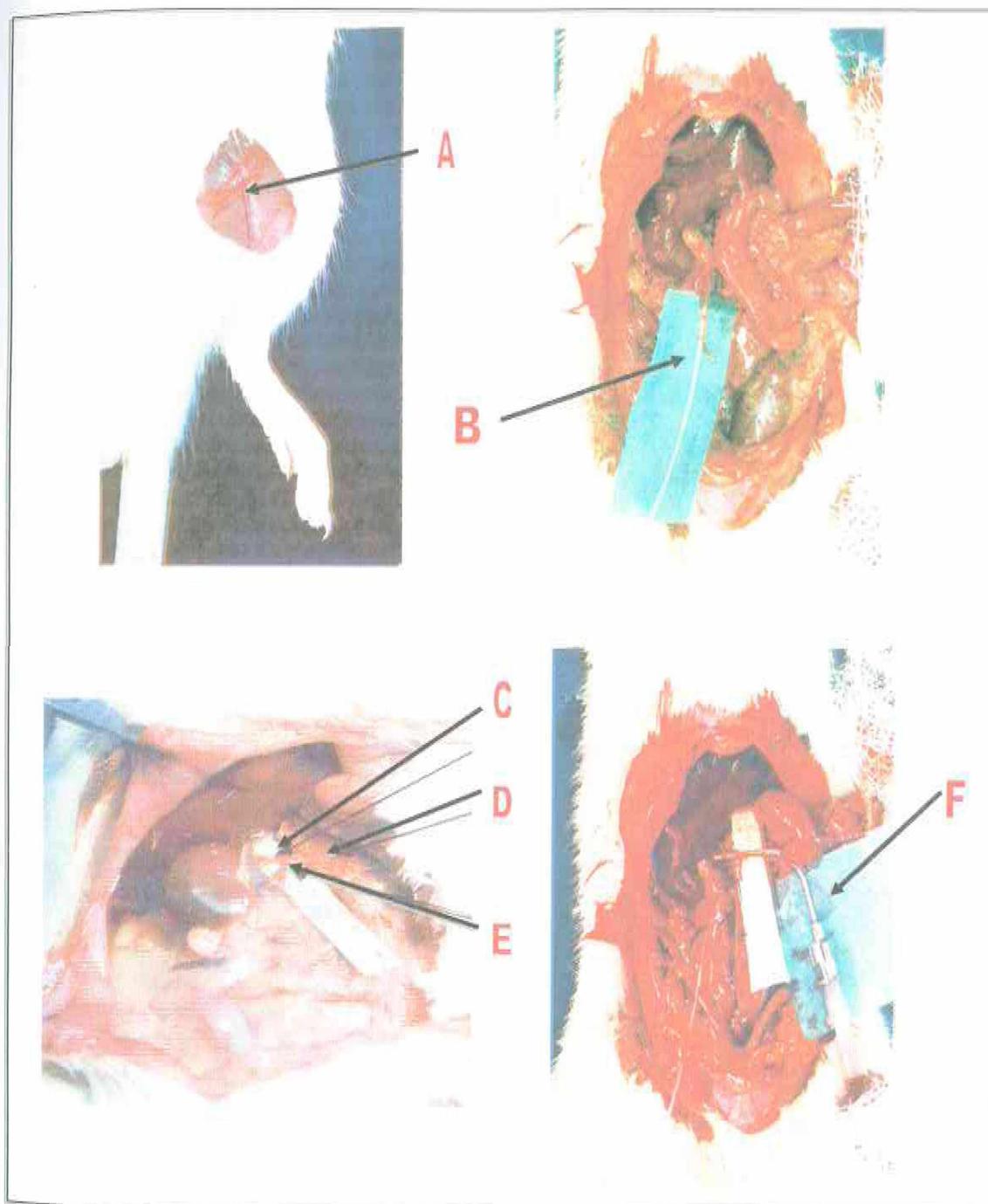


Figura 09 - Técnica cirúrgica. A - veia femural; B - ureter direito canulado; C - artéria renal; D - artéria mesentérica; E - aorta; F - cânula arterial.

4.1.7. Protocolo experimental

Iniciava-se o protocolo experimental zerando o cronômetro. A partir desse momento eram coletados urina e perfusato a cada 10 minutos, alternadamente de forma que a cada 5 minutos se fazia uma coleta. Por ocasião de cada coleta, anotava-se a medida do manômetro de mercúrio e do fluxômetro. Os frascos de urina eram pesados e, juntamente com os de perfusato, acondicionados a uma temperatura de -20°C , para permitir posteriores dosagens de potássio, sódio, cloro, inulina e osmolaridade. Passados os 30 minutos iniciais, que funcionavam como controle interno, aplicava-se a substância a ser testada. O experimento tinha duração total de 120 minutos.

Após a colocação do rim direito no sistema, retirava-se o rim esquerdo para o controle. Ele era pesado e devidamente acondicionado para posterior exame histopatológico. O mesmo era feito com o rim direito após o término do experimento.

Os percentuais de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto, e o ritmo de filtração glomerular foram determinados através das fórmulas de *clearance*, de acordo com as descrições de Pitts, em 1975 e Martínez-Maldonado & Opava-Stitzer, em 1978. Também foram determinados o fluxo urinário e o *clearance* osmolar. O sódio e potássio foram determinados em fotômetro de chama (instrumento laboratorial modelo 445). A inulina foi determinada de acordo com Walsor e colaboradores, em 1955, e modificado por Fonteles e colaboradores, em 1983. A osmolaridade foi mensurada em osmômetro (Needham Heights, MA, USA). A função distal foi avaliada através do *clearance* de água livre (Pitts, 1975 e Martínez-Maldonado & Opava-Stitzer, em 1978).

4.1.8. Grupos experimentais

Cada grupo experimental era composto por seis experimentos, realizados um por dia. Os cinco grupos analisados foram os seguintes:

- ❖ Grupo controle (C): onde os rins foram perfundidos somente com a solução perfusora;
- ❖ Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de 0,1µg/mL (Ser-guan 0,1µg/mL);
- ❖ Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de 1µg/mL (Ser-guan 1µg/mL);
- ❖ Grupo UROGUANILINA, na dose de 0,5µg/mL (Uro 0,5µg/mL);
- ❖ Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de 1µg/mL + UROGUANILINA, na dose de 0,5µg/mL (Ser-guan + Uro): a primeira foi adicionada no início do experimento e a segunda, após 30 minutos.

4.1.9. Cálculo dos parâmetros renais

Para a determinação dos parâmetros renais foram utilizadas as seguintes fórmulas:

PP - pressão de perfusão (mmHg) - dado obtido do manômetro de mercúrio

FU - fluxo urinário (mL.g⁻¹.min⁻¹)

$$FU = \text{peso do volume urinário} / \text{peso do rim esquerdo} \times 10$$

FPR - fluxo plasmático renal (mL.g⁻¹.min⁻¹)

$$FPR = \text{fluxo registrado a cada 10min} / \text{intervalo de tempo} \times \text{peso do rim}$$

RVR = resistência vascular renal (mmHg.mL.g⁻¹.min⁻¹)

$$RVR = PP/FPR$$

RFG - ritmo de filtração glomerular (mL.g⁻¹.min⁻¹)

$$RFG = \text{DOU}_{ur} / \text{DOP}_m \times FU, \text{ onde}$$

DOU_m = densidade ótica da inulina na urina

DOP_m = densidade ótica da inulina no perfusato

FNa^+ - sódio filtrado ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$)

$$FNa^+ = RFG \times PNa^+, \text{onde}$$

PNa^+ = concentração de sódio no perfusato

ENa^+ - sódio excretado ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$)

$$ENa^+ = FU \times UNa^+, \text{onde}$$

UNa^+ = concentração de sódio na urina

TNa^+ - sódio transportado ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$)

$$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$$

$\%TNa^+$ - percentual de sódio transportado

$$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$$

$Cosm$ - clearance osmótico ($mL.g^{-1}.min^{-1}$)

$$Cosm = (U_{osm} / P_{osm}) \times FU, \text{onde}$$

U_{osm} = osmolidade Urinária

P_{osm} = osmolidade de perfusato

CH_2O - clearance de água livre ($mL.g^{-1}.min^{-1}$)

$$CH_2O = FU - C_{osm}$$

$dTNa^+$ - transporte distal de sódio ($mL.g^{-1}.min^{-1}$)

$$dTNa^+ = CH_2O \times PNa^+$$

$Ad Na^+$ - aporte distal de sódio ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$)

$$Ad Na^+ = dTNa^+ + ENa^+$$

$pTNa^+$ = transporte proximal de sódio ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$)

$$pTNa^+ = FNa^+ \times AdNa^+$$

$\%pTNa^+$ = percentual de transporte proximal de sódio

$$\%pTNa^+ = pTNa^+ \times 100/FNa^+$$

Todos os cálculos realizados para a determinação dos parâmetros do sódio foram repetidos para o potássio e o cloreto.

4.2. Estatística

Os dados foram analisados através do programa de estatística GraphPrism para análise de dados, expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os valores dos parâmetros renais foram comparados entre os grupos por ANOVA e teste comparativo entre os grupos com o grupo controle e controle interno, feito por teste *t* de Student, com significância de * $p < 0.05$. Todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo, e os dados compilados em intervalos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120).

4.3. Síntese da ser-thr-lys-guanilina e da uroguanilina

Os peptídeos (ser-thr-lys-guanilina e uroguanilina de rato) foram sintetizados e enviados pelos pesquisadores Richard Greenberg e Stephen Carrithers, através de uma colaboração internacional entre a Universidade de Kentucky e a Universidade Federal do Ceará, pela "American Peptide Company", Califórnia, EUA.

Para a síntese inicial da lys-guanilina, um oligonucleotídeo, contendo a seqüência previamente conhecida, foi sintetizado e purificado. Um plasmídeo foi isolado usando-se um procedimento de lise alcalina seguida de centrifugação em gradientes de CsCl, contendo brometo de etídio. Fragmentos de DNA foram isolados em gel de agarose, utilizando-se Gene Clean II (Bio 101, La Jolla, CA). O plasmídeo codificando a guanilina de rato foi produzido usando o vetor de secreção pJAL 36, de acordo com a descrição de Fonteles e colaboradores, em 1996.

A *Escherichia coli* K-12 DPB 372 foi usada para as transformações e produção da ser-thr-lys-guanilina. As células cresceram em meio rico em Lurrie-Broth (LB), suplementado com ampicilina (50 mg/mL). Através desta técnica de bioengenharia, construiu-se o primeiro derivado artificial das guanilinas.

Com a proposta inicial da síntese de um peptídeo correspondente à Lys-guanilina, previamente sintetizado em um processo biológico extremamente trabalhoso, foi produzida a ser-thr-lys-guanilina, que é objeto desta pesquisa.

Ser-Thr-Lys-Pro-Asn-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

A síntese uroguanilina de rato foi realizada pelo método de fase sólida e purificada de acordo com Currie (Currie *et al.*, 1992) e Hamra (Hamra *et al.*, 1993). Foi utilizado um sintetizador de peptídeos fabricado pela Applied Biosystems 431A.

Thr-Asp-Glu-Cys-Glu-Leu-Cys-Ile-Asn-Val-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys

A purificação dos peptídeos foi realizada por HPLC em colunas de fase reversa e as estruturas confirmadas por espectrofotometria e análise de seqüências.

4.4. Comitê de Ética

A metodologia desenvolvida no presente trabalho foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará.

5. RESULTADOS

5.1. Grupos experimentais:

- I. Grupo controle (C): onde os rins foram perfundidos somente com a solução perfusora;
- II. Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de $0,1\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Ser-guan $0,1\mu\text{g}/\text{mL}$**);
- III. Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Ser-guan $1\mu\text{g}/\text{mL}$**);
- IV. Grupo UROGUANILINA, na dose de $0,5\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Uro $0,5\mu\text{g}/\text{mL}$**);
- V. Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ + UROGUANILINA, na dose de $0,5\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Ser-guan + Uro**): a primeira foi adicionada no início do experimento e a segunda, após 30 minutos.

Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e estão compilados em quatro períodos de trinta minutos (30, 60, 90 e 120 min.). A análise estatística foi feita por ANOVA e teste *t* de Student com $p < 0,05$. Os trinta minutos iniciais foram utilizados como controle interno. Os grupos tratados foram comparados entre si e a um grupo controle, onde os rins foram perfundidos apenas com a solução de Krebs-Henseleit.

5.2. Pressão de perfusão (PP)

Como pode ser observado na tabela 03 e nas figuras 10 e 11, tanto a ser-thr-lys-guanilina, na dose menor de 0,1µg/mL, como a uroguanilina, na dose de 0,5µg/mL, causaram um aumento pequeno mas significativo (*p < 0,05) na pressão de perfusão em relação ao grupo controle aos 120 minutos do experimento, a última também em relação ao controle interno. Já na dose maior de 1µg/mL, a ser-thr-lys-guanilina apresentou efeito inverso, tendo a PP significativamente diminuída aos 90 minutos de experimento. A ser-thr-lys-guanilina nesta dose foi capaz de bloquear o efeito causado pela uroguanilina, de modo que no grupo **Ser-guan + Uro** não houve efeito significativo na PP.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	104,9 ± 0,9	103,4 ± 1,0	103,2 ± 0,9	104,1 ± 0,8
Ser-guan 0,1µg/mL	101,5 ± 3,7	103,3 ± 3,5	104,9 ± 2,7	111,0 ± 2,9**
Ser-guan 1µg/mL	105,7 ± 1,2	99,1 ± 2,5*	95,9 ± 2,6***	99,9 ± 3,5
Uro 0,5µg/mL	101,2 ± 2,6	103,9 ± 3,6	106,7 ± 2,7	113,4 ± 2,5***
Ser-guan + Uro	105,2 ± 0,7	104,4 ± 0,5	102,9 ± 0,9	103,3 ± 1,9

Tabela 03 - Pressão de perfusão (PP; mmHg): Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo experimental.

* p < 0,05 para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo.

** p < 0,05 para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

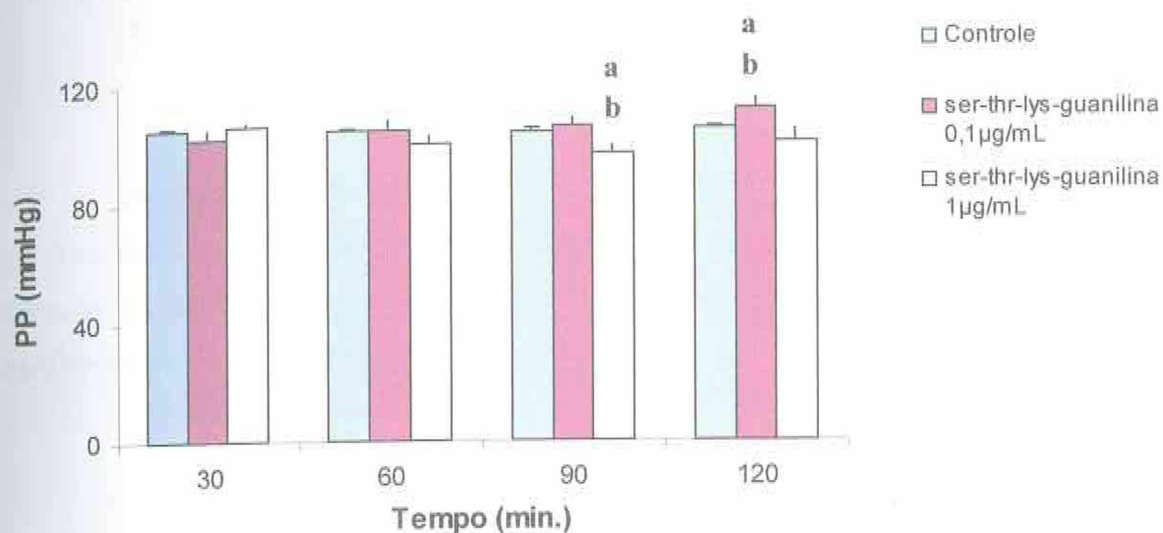


Figura 10 - **Pressão de perfusão (PP; mmHg)**. Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

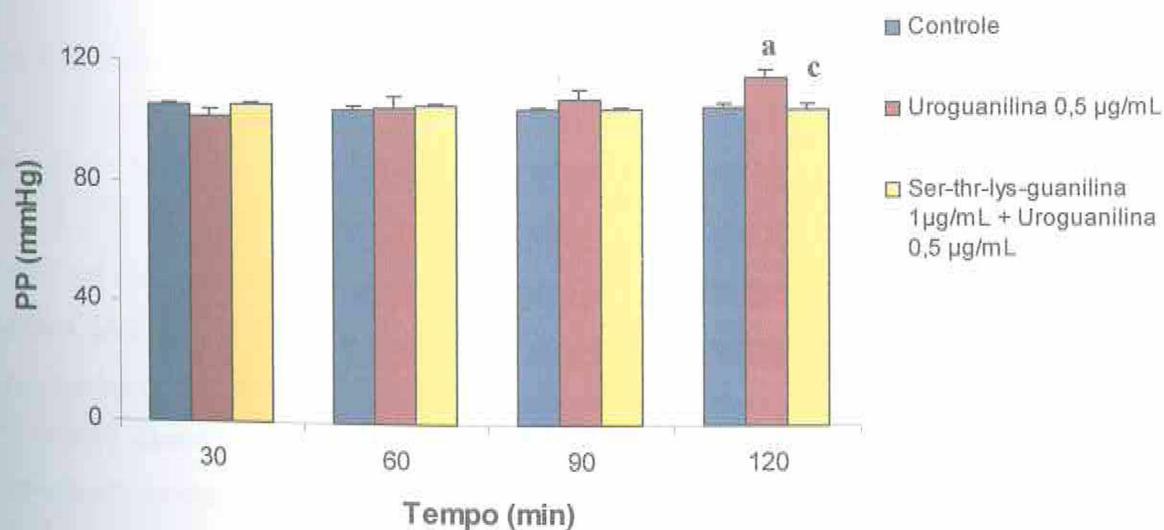


Figura 11 - **Pressão de perfusão (PP; mmHg)**. Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.3. Resistência vascular renal (RVR)

Somente a ser-thr-lys-guanilina, na dose maior de 1µg/mL, foi capaz de causar uma diminuição significativa (*p < 0,05) na resistência vascular renal em relação ao controle interno e ao grupo controle, aos 90 minutos do experimento. Esses dados podem ser visualizados na tabela 04 e nas figuras 12 e 13.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	4,6 ± 0,04	4,53 ± 0,03	4,52 ± 0,03	4,56 ± 0,03
Ser-guan 0,1µg/mL	4,36 ± 0,38	4,43 ± 0,37	4,47 ± 0,35	4,7 ± 0,35
Ser-guan 1µg/mL	4,64 ± 0,04	4,36 ± 0,12	4,22 ± 0,13***	4,39 ± 0,16
Uro 0,5µg/mL	4,39 ± 0,34	4,53 ± 0,38	4,61 ± 0,35	4,87 ± 0,35
Ser-guan + Uro	4,66 ± 0,06	4,62 ± 0,09	4,56 ± 0,1	4,58 ± 0,13

Tabela 04 - **Resistência vascular renal** (RVR; mmHg.mL/g/min.): Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo experimental.

* p < 0,05 para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** p < 0,05 para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

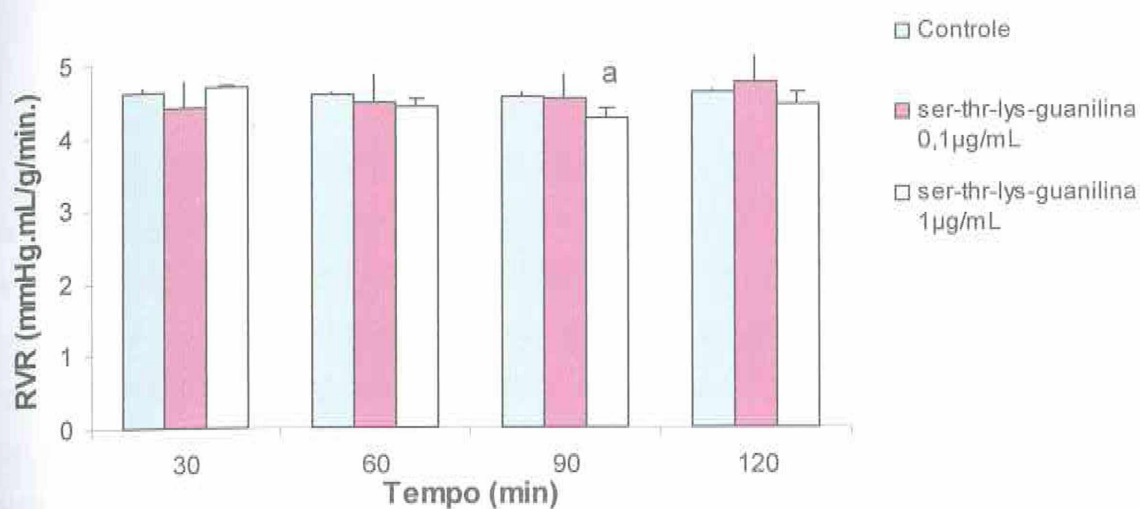


Figura 12 – Resistência vascular renal (RVR; mmHg.mL/g/min.). Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

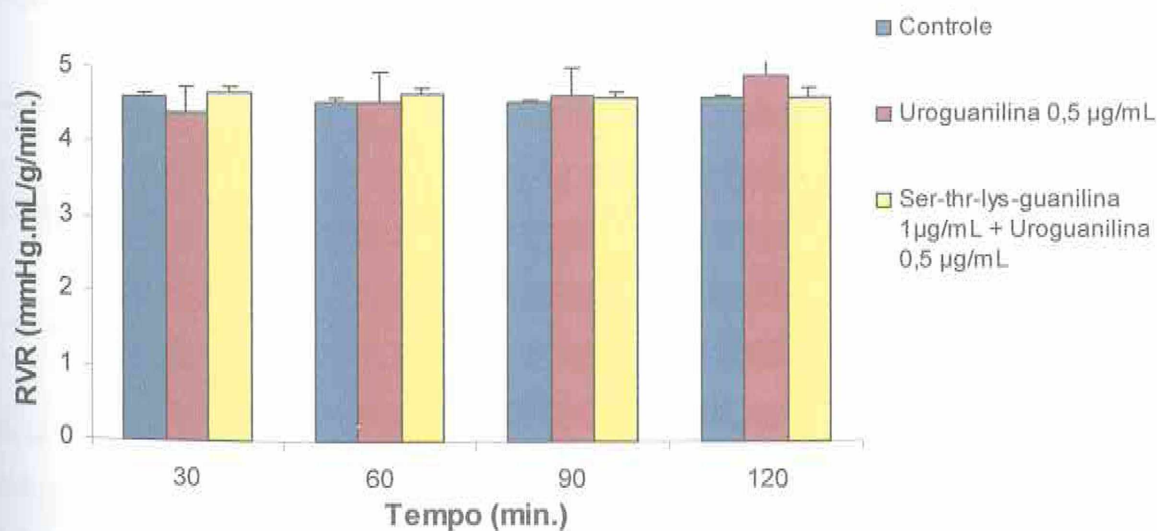


Figura 13 – Resistência vascular renal (RVR; mmHg.mL/g/min.). Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.4. Fluxo urinário (FU)

Observando a tabela 05 e as figuras 14 e 15, percebe-se que tanto a ser-thr-lys-guanilina, na dose menor de 0,1µg/mL, como a uroguanilina, na dose de 0,5µg/mL, causaram um aumento significativo (*p < 0,05) no fluxo urinário (FU), à partir dos 90 e 60 minutos, respectivamente. A ser-thr-lys-guanilina, na dose de 1µg/mL, apresentou efeito contrário, diminuindo o FU significativamente aos 90 e 120 minutos. Como mostra a figura 15, essa dose, nesse mesmo período de experimento, foi capaz de bloquear o efeito da uroguanilina, causando uma diminuição significativa no grupo Ser-guan + Uro.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	0,165±0,002	0,167±0,003	0,169±0,003	0,166±0,003
Ser-guan 0,1µg/mL	0,158±0,016	0,204±0,021	0,213±0,019**	0,223±0,019***
Ser-guan 1µg/mL	0,165±0,004	0,158±0,008	0,133±0,01***	0,111±0,009***
Uro 0,5µg/mL	0,16±0,016	0,206±0,021**	0,231±0,016***	0,226±0,2***
Ser-guan + Uro	0,168±0,004	0,172±0,004	0,152±0,005***	0,116±0,006***

Tabela 05 - Fluxo urinário (FU; mL.g⁻¹.min⁻¹): Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo.

* p < 0,05 para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo.

** p < 0,05 para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

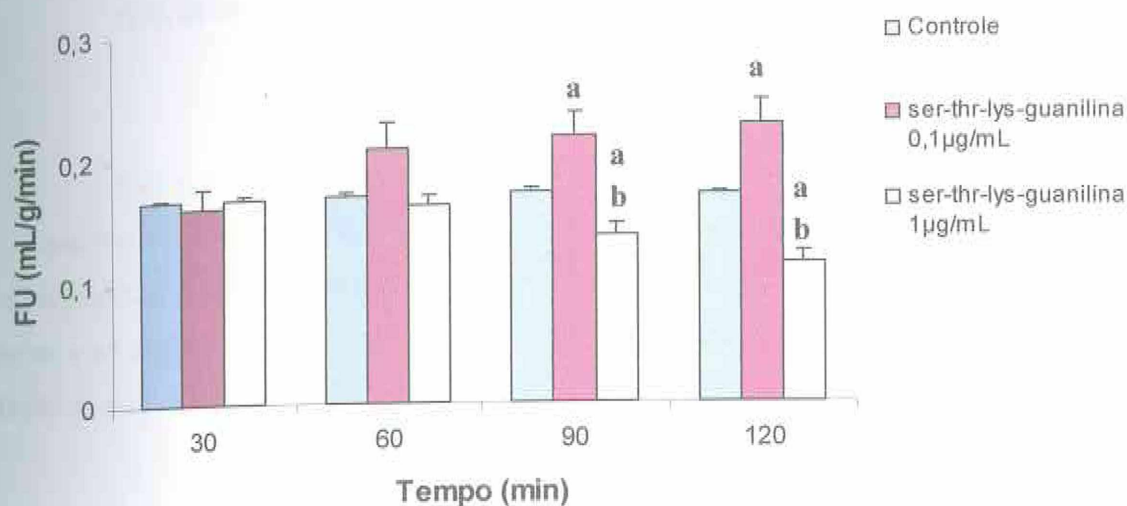


Figura 14 – **Fluxo urinário** (FU; mL.g⁻¹.min⁻¹). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

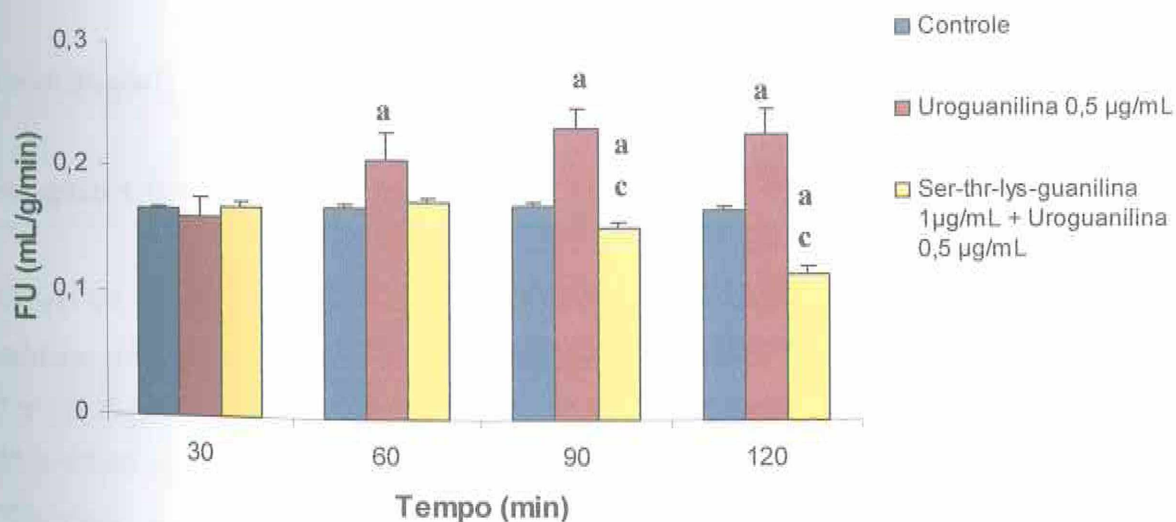


Figura 15 – **Fluxo urinário** (FU; mL.g⁻¹.min⁻¹). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.5. Ritmo de filtração glomerular (RFG)

Como pode ser observado na tabela 06 e nas figuras 16 e 17, somente a ser-thr-lys-guanilina, na dose maior de 1µg/mL e no grupo **Ser-guan + Uro** foi capaz de causar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no ritmo de filtração glomerular em relação ao controle interno e ao grupo controle, aos 90; e 90, 120 minutos do experimento, respectivamente. Em relação ao controle interno e ao grupo controle.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	0,821±0,047	0,841±0,059	0,882±0,075	0,855±0,050
Ser-guan 0,1µg/mL	0,774±0,060	0,956±0,141	0,769±0,074	0,724±0,035
Ser-guan 1µg/mL	0,878±0,061	0,813±0,095	0,637±0,082***	0,622±0,123
Uro 0,5µg/mL	0,735±0,065	0,875±0,129	0,755±0,085	0,773±0,084
Ser-guan + Uro	0,769±0,061	0,700±0,086	0,552±0,068***	0,379±0,030***

Tabela 06 - Ritmo de filtração glomerular (RFG; mL.g⁻¹.min⁻¹). Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

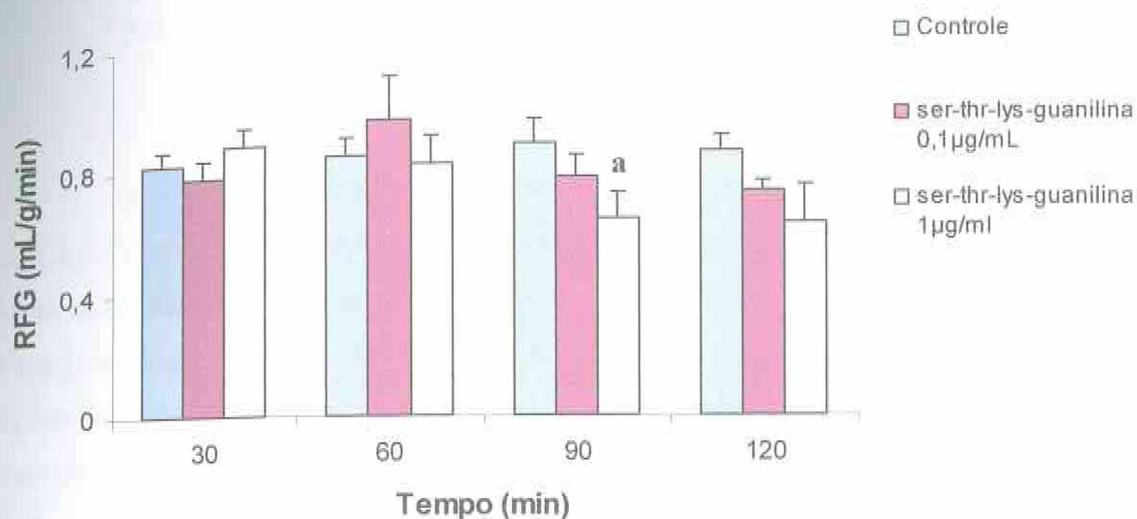


Figura 16 – Ritmo de filtração glomerular (RFG; mL.g⁻¹.min⁻¹). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

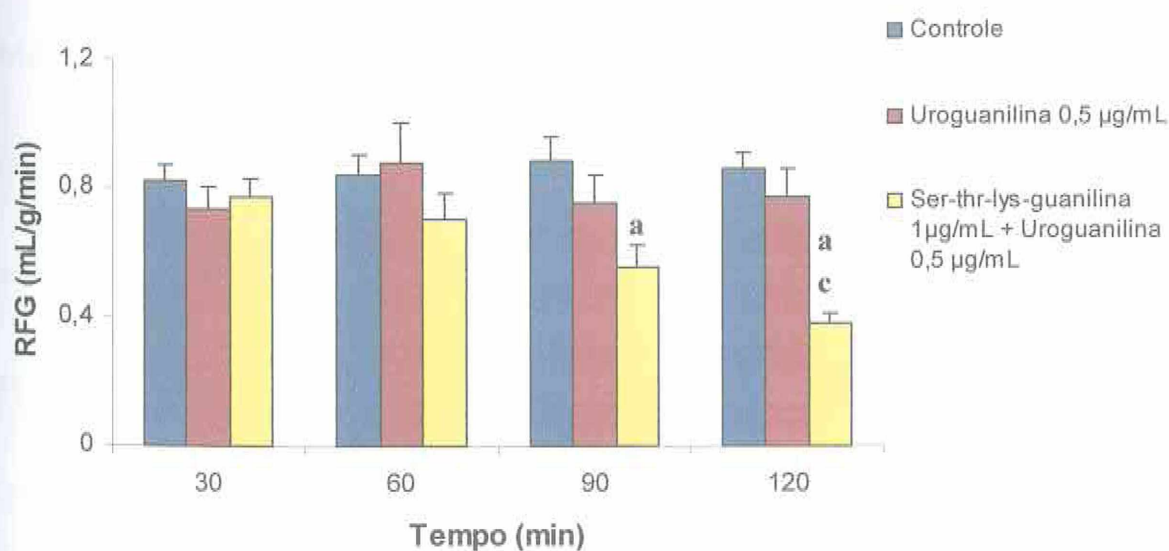


Figura 17 – Ritmo de filtração glomerular (RFG; mL.g⁻¹.min⁻¹). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.6. Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺)

A ser-thr-lys-guanilina, na dose 0,1µg/mL e a uroguanilina causaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺), em relação ao controle interno e ao grupo controle, aos 90 e 120 minutos do experimento. A ser-thr-lys-guanilina, no grupo **Ser-guan + Uro** não foi capaz de reverter esse efeito da uroguanilina, de modo que neste grupo continuou havendo diminuição significativa do transporte aos 60, 90 e 120 minutos em relação ao grupo controle e aos 120 minutos, em relação ao controle interno. Esses dados podem ser visualizados na tabela 07 e nas figuras 18 e 19.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	88,09 ± 0,74	87,88 ± 0,81	88,28 ± 0,77	88,14 ± 1,08
Ser-guan 0,1µg/mL	89,01 ± 1,3	87,02 ± 1,73	81,62 ± 2,62***	79,03 ± 2,59***
Ser-guan 1µg/mL	88,74 ± 0,93	87,5 ± 0,78	86,31 ± 1,04	86,97 ± 1,18
Uro 0,5µg/mL	88,4 ± 1,21	85,71 ± 1,49	79,99 ± 2,22***	80,27 ± 1,53***
Ser-guan + Uro	85,35 ± 2,55	79,91 ± 4,13**	76,49 ± 5,29**	79,92 ± 1,05***

Tabela 07 - Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺). Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina,

“uro”: uroguanilina.

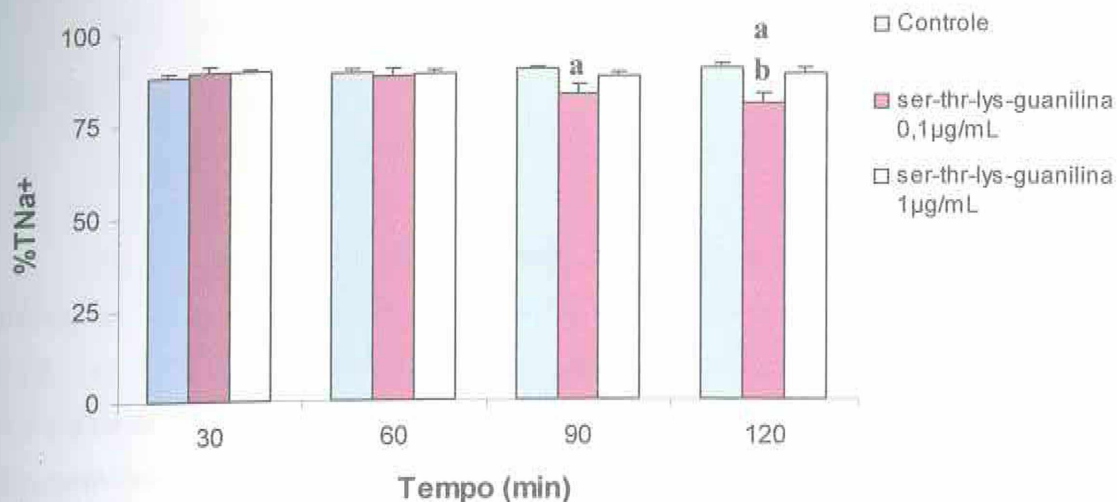


Figura 18 – **Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺)**. Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

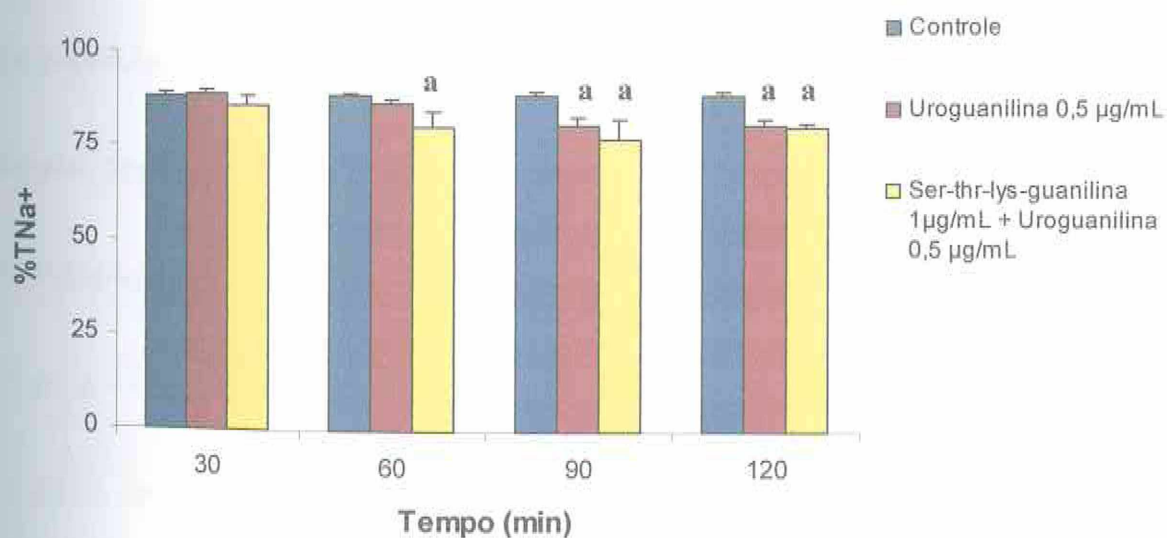


Figura 19 – **Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺)**. Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

5.7. Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺)

Observando a tabela 08 e as figuras 20 e 21, pode-se perceber que a ser-thr-lys-guanilina, na dose 0,1µg/mL e a uroguanilina causaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺), em relação ao controle interno e ao grupo controle, aos 90 e 120 minutos do experimento. Todavia, a ser-thr-lys-guanilina, no grupo Ser-guan + Uro não foi capaz de reverter esse efeito da uroguanilina.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	83,14 ± 0,89	83,32 ± 0,92	83,88 ± 0,98	83,76 ± 1,35
Ser-guan 0,1µg/mL	83,83 ± 1,05	81,51 ± 1,52	75,94 ± 2,38***	74,27 ± 2,03***
Ser-guan 1µg/mL	84,53 ± 1,04	83,26 ± 1,06	81,57 ± 1,44	82,51 ± 1,65
Uro 0,5µg/mL	84,32 ± 1,24	81,16 ± 1,56	73,87 ± 2,25***	75,17 ± 1,35***
Ser-guan + Uro	80,96 ± 2,11	75,33 ± 5,4	70,75 ± 6,69**	74,6 ± 1,41***

Tabela 08 - Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺). Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

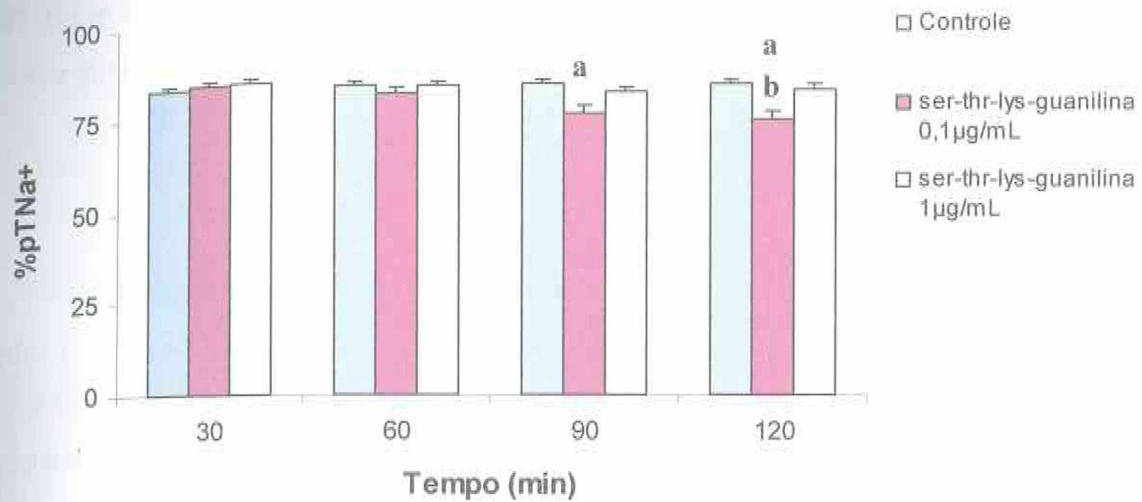


Figura 20 – Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

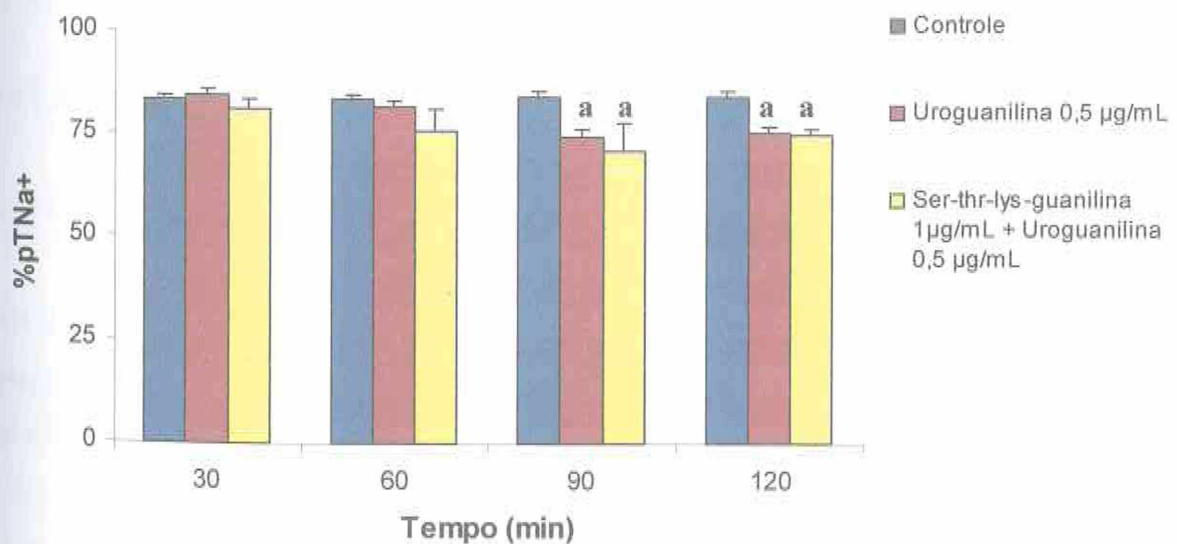


Figura 21 – Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

a: comparação em relação ao grupo controle e *c*: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.8. Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺)

Verificando os dados contidos na tabela 09 e nas figuras 22 e 23, percebe-se que todos os grupos, com exceção do grupo controle, apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do percentual de transporte tubular de potássio, principalmente aos 90 e 120 minutos de experimento.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	69,81 ± 1,22	66,89 ± 2,34	67,48 ± 2,06	66,94 ± 1,47
Ser-guan 0,1µg/mL	66,89 ± 2,77	52,88 ± 3,96***	42,59 ± 2,59***	47,29 ± 3,34***
Ser-guan 1µg/mL	72,29 ± 1,2	58,49 ± 5,74*	49,73 ± 6,75***	51,73 ± 6,59***
Uro 0,5µg/mL	63,54 ± 3,82	46,18 ± 6,55***	31,18 ± 7,65***	42,54 ± 8,14***
Ser-guan + Uro	69,08 ± 3,17	56,46 ± 4,46***	41,84 ± 4,84***	42,28 ± 5,06***

Tabela 09 - Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺). Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

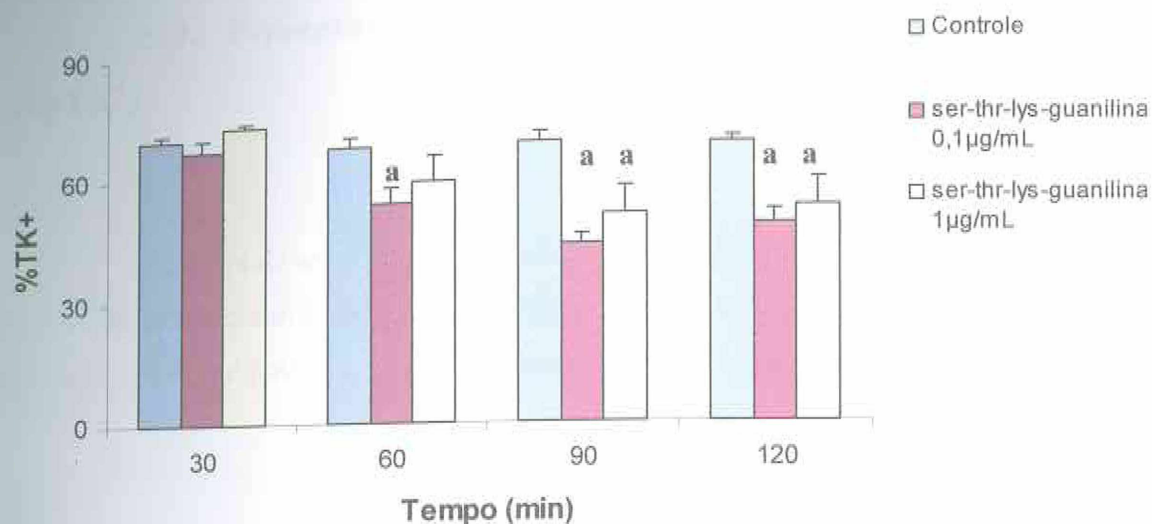


Figura 22 – Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

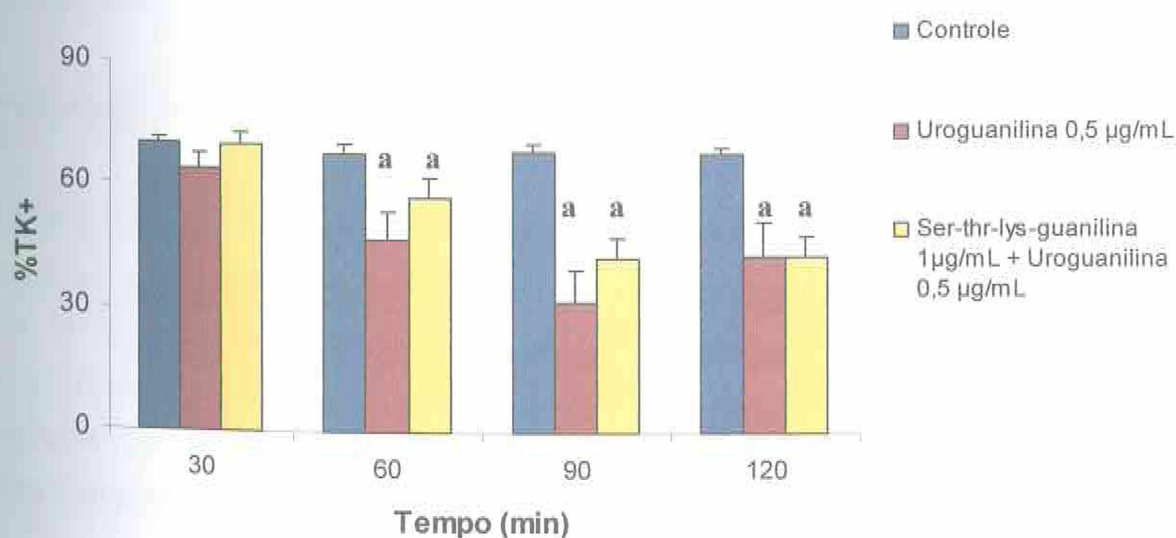


Figura 23 – Percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.9. Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺)

Como pode ser observado na tabela 10 e nas figuras 24 e 25, todos os grupos, com exceção do grupo controle, apresentaram diminuição significativa do percentual de transporte tubular proximal de potássio, principalmente aos 90 e 120 minutos.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	64,86 ± 1,42	62,34 ± 2,48	63,07 ± 2,25	62,56 ± 1,72
Ser-guan 0,1µg/mL	61,71 ± 3,15	47,37±4,52***	36,91± 3,06***	42,53 ±3,68***
Ser-guan 1µg/mL	68,09 ± 1,37	54,25 ± 6,02*	44,99± 7,22***	47,28±7,13***
Uro 0,5µg/mL	59,46 ± 3,87	41,63±6,82***	25,06±7,94***	37,44±8,5***
Ser-guan + Uro	65,68 ± 3,65	51,88±4,69***	36,1±4,97***	36,94±5,10***

Tabela 10 - Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺). Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* p < 0,05 para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** p < 0,05 para comparação em relação ao grupo controle,

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

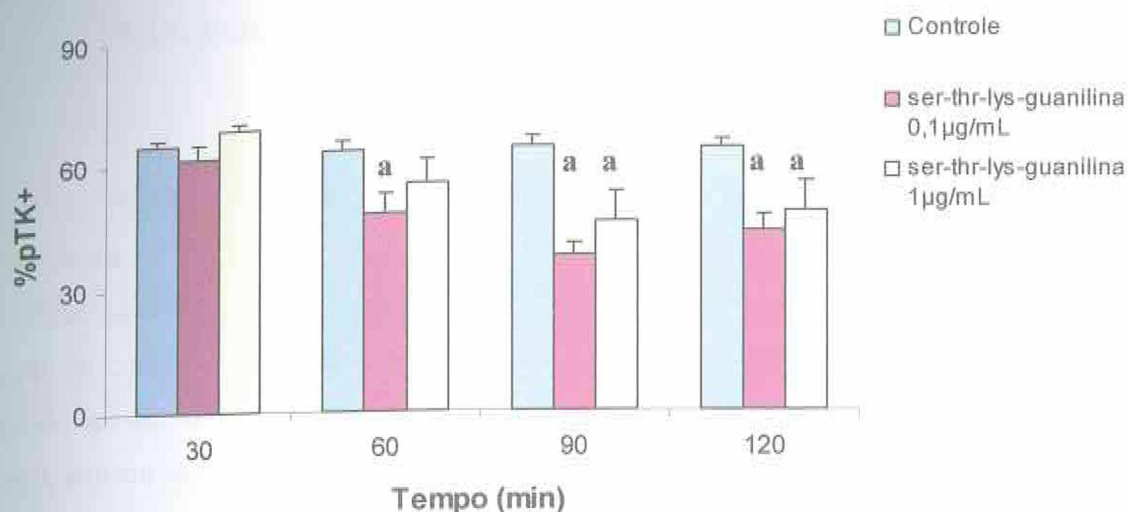


Figura 24 – Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

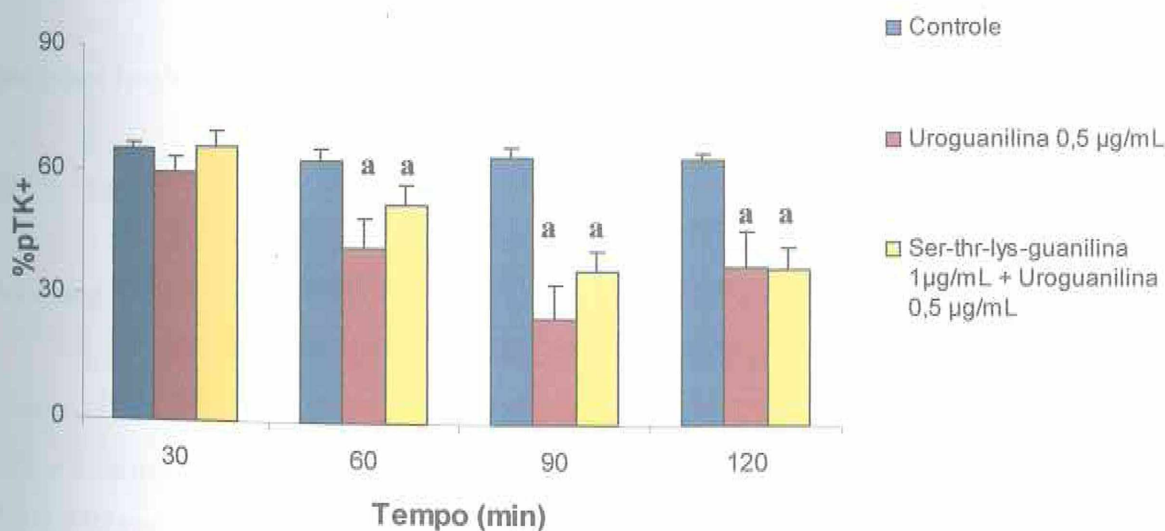


Figura 25 – Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.10. Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl)

Todos os grupos, com exceção do grupo controle, apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) do percentual de transporte tubular de cloreto. Tanto a ser-thr-lys-guanilina, na dose 0,1 μ g/mL como a uroguanilina causaram diminuição neste percentual em relação ao controle interno e ao grupo controle, o primeiro grupo aos 90 e 120 minutos; e o segundo aos 60, 90 e 120 minutos de experimento. A ser-thr-lys-guanilina, na dose maior, de 1 μ g/mL, causou esse efeito aos 60 e 90 minutos. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 11 e nas figuras 26 e 27.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	84,99 \pm 0,047	85,94 \pm 0,059	85,33 \pm 0,075	84,94 \pm 0,05
Ser-guan 0,1μg/mL	85,69 \pm 1,19	82,25 \pm 2,22	75,82 \pm 2,99***	73,59 \pm 2,63***
Ser-guan 1μg/mL	85,96 \pm 0,79	83,84 \pm 0,99**	81,9 \pm 1,37***	82,82 \pm 1,47
Uro 0,5μg/mL	84,32 \pm 1,05	80,17 \pm 1,12***	78,26 \pm 1,24***	72,11 \pm 1,1***
Ser-guan + Uro	80,97 \pm 2,93	74,44 \pm 5,44**	69,65 \pm 6,79**	73,61 \pm 1,38***

Tabela 11 - Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

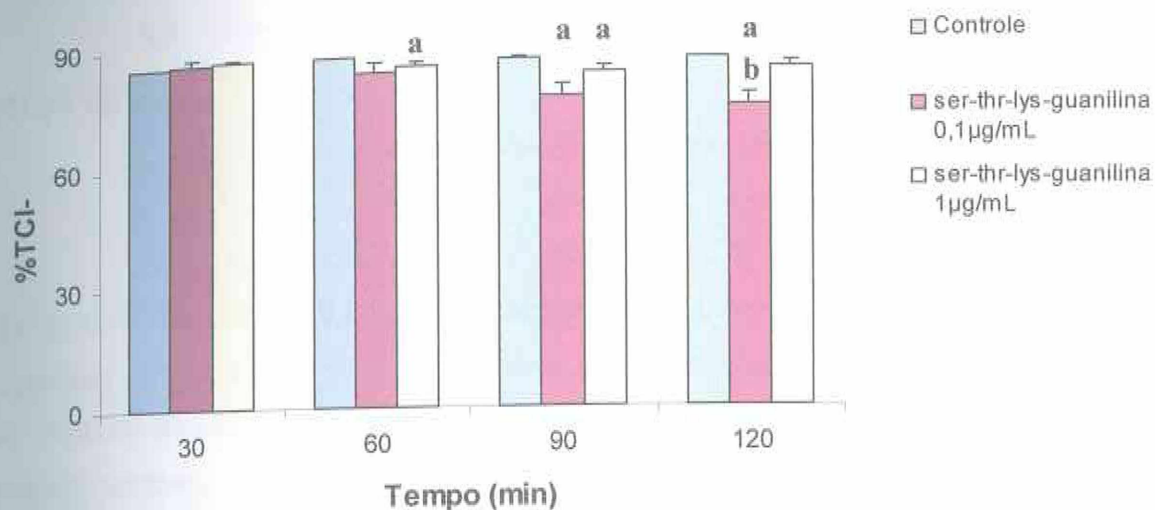


Figura 26 – **Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl)**. Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

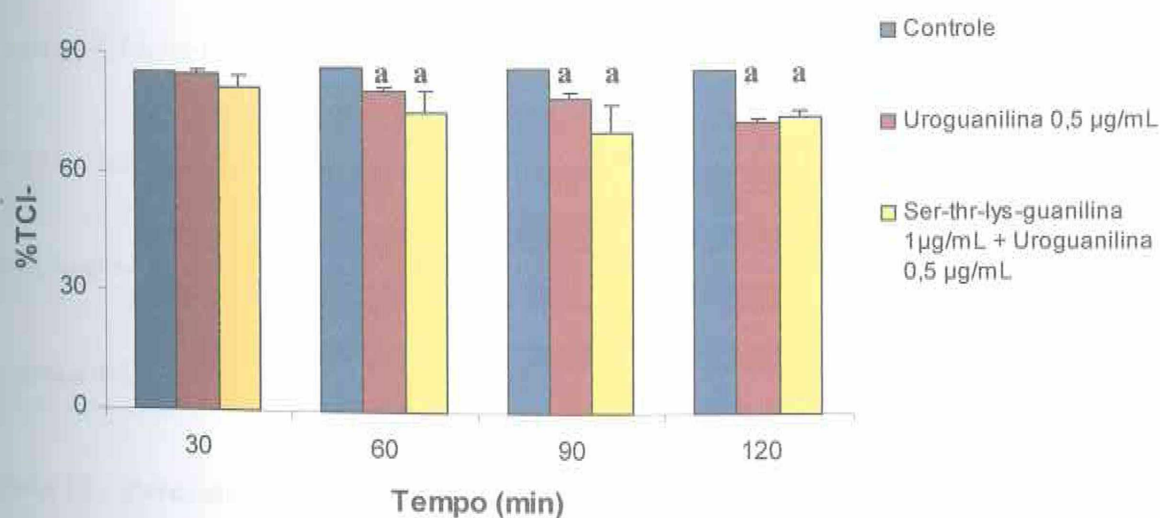


Figura 26 – **Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl)**. Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$. “a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.1. Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl)

Observando a tabela 12 e as figuras 28 e 29, percebemos que tanto a dose menor da ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL) quanto a uroguanilina apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do percentual de transporte tubular proximal de cloreto em relação ao controle interno e ao grupo controle, aos 90 e 120, e aos 60,90 e 120 minutos, respectivamente.

A ser-thr-lys-guanilina não foi capaz de bloquear o efeito da uroguanilina, de forma que no grupo Ser-guan + Uro também houve diminuição significativa ($p < 0,05$) aos 120 minutos em relação ao controle interno, e aos 90 e 120 minutos em relação ao grupo controle.

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	80,04 ± 1,08	81,38 ± 1,19	80,93 ± 1,17	80,56 ± 1,54
Ser-guan 0,1µg/mL	80,51 ± 0,95	76,74 ± 2,12	70,17 ± 2,86***	68,84 ± 2,12***
Ser-guan 1µg/mL	81,75 ± 1,19	79,6 ± 1,3	77,15 ± 1,77	78,37 ± 1,96
Uro 0,5µg/mL	79,11 ± 1,02	76,82 ± 0,97***	72,06 ± 1,11***	67,98 ± 1,06***
Ser-guan + Uro	77,57 ± 2,48	69,86 ± 6,72	63,91 ± 8,2**	68,30 ± 1,74***

Tabela 12 - Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl). Os resultados apresentam média ± erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo,

** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

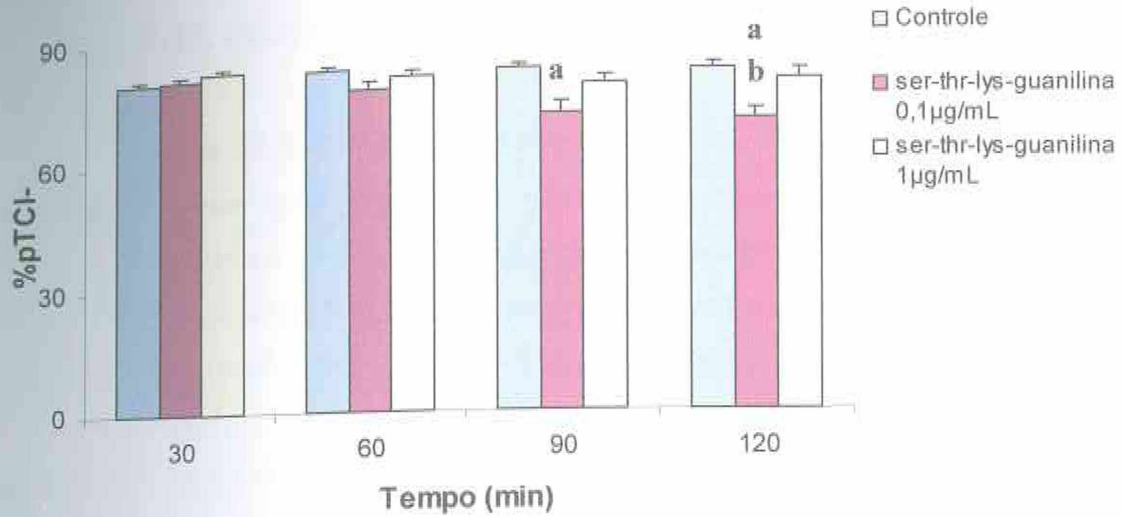


Figura 28 – Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

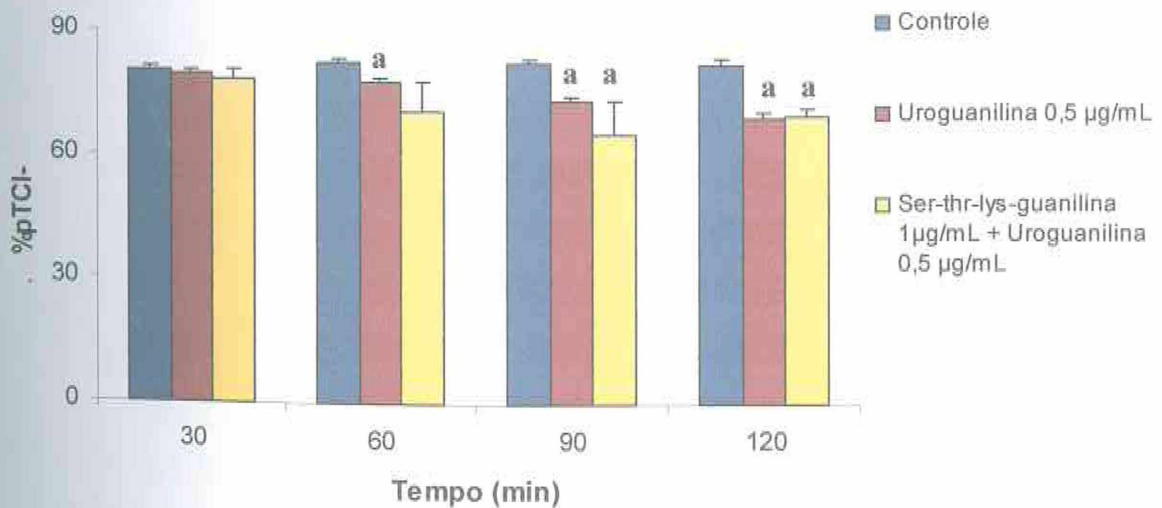


Figura 29 – Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻). Os dados são expressos por média ± erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.12. Clearance osmolar (Cosm)

Ao se analisar a tabela 13 e as figuras 30 e 31, pode-se verificar que a ser-thr-lys-guanilina, na dose maior de $1\mu\text{g/mL}$, foi capaz de causar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no clearance osmolar em relação ao controle interno e ao grupo controle, aos 120 minutos do experimento. Nesse mesmo período, o grupo **Ser-guan + Uro** também apresentou diminuição significativa, mas somente em relação ao controle interno.

Tanto a dose menor da ser-thr-lys-guanilina ($0,1\mu\text{g/mL}$) como a uroguanilina apresentaram uma tendência ao aumento do Cosm com o decorrer do tempo de experimento, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo (figuras 30 e 31).

Grupo	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle C	$0,13 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
Ser-guan $0,1\mu\text{g/mL}$	$0,12 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,03$
Ser-guan $1\mu\text{g/mL}$	$0,13 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01^{***}$
Uro $0,5\mu\text{g/mL}$	$0,13 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,06$
Ser-guan + Uro	$0,14 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01^*$

Tabela 13 – Clearance osmolar (Cosm; $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Os resultados apresentam média \pm erro padrão da média (EPM) em cada grupo;

* $p < 0,05$ para comparação em relação aos 30 min (controle interno) de seu próprio grupo.

** $p < 0,05$ para comparação em relação ao grupo controle.

“Ser-guan”: ser-thr-lys-guanilina.

“uro”: uroguanilina.

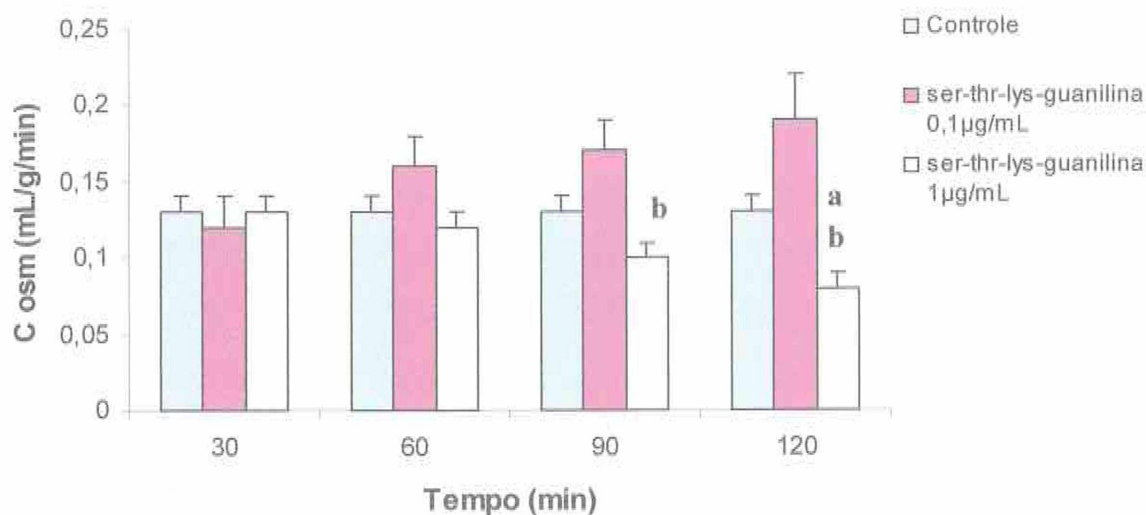


Figura 30 – *Clearance osmolar* (C_{osm} ; $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “b”: comparação entre as duas doses da ser-thr-lys-guanilina.

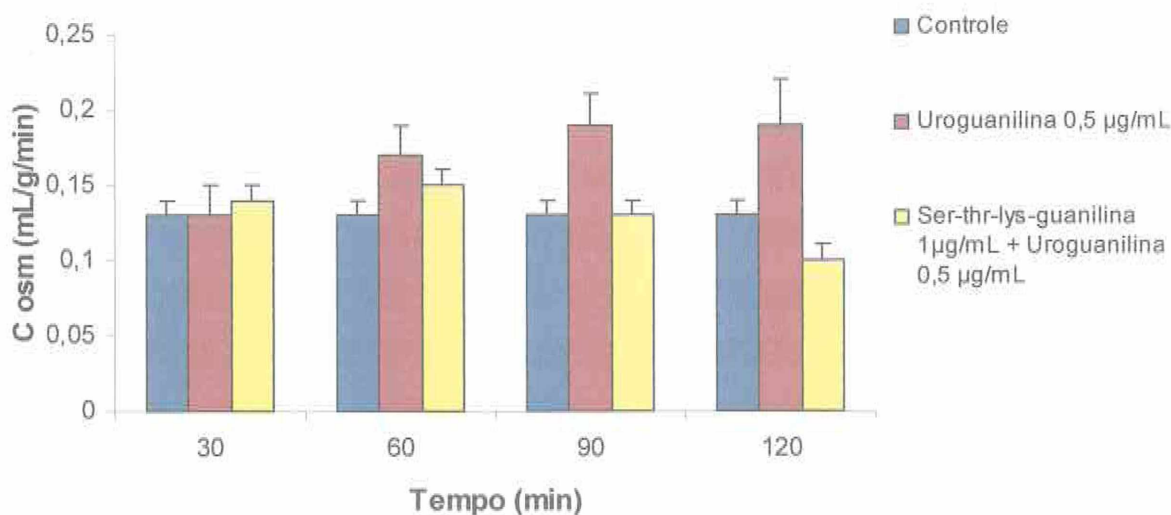


Figura 31 – *Clearance osmolar* (C_{osm} ; $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Os dados são expressos por média \pm erro padrão da média (EPM) e a estatística foi feita por ANOVA com $p < 0,05$.

“a”: comparação em relação ao grupo controle e “c”: comparação entre a uroguanilina e a ser-thr-lys-guanilina + uroguanilina.

5.13. Análise histopatológica

Em todos os grupos, os rins analisados apresentaram aspecto similar. Foi observado a presença de substância proteinácea no espaço urinário em um número pequeno a moderado de glomérulos e túbulos. A intensidade variou muito pouco entre os grupos. Interstício e vasos tinham aparência normais.

Os rins do grupo controle e os rins esquerdos (controle interno) foram analisados e não apresentaram alterações.

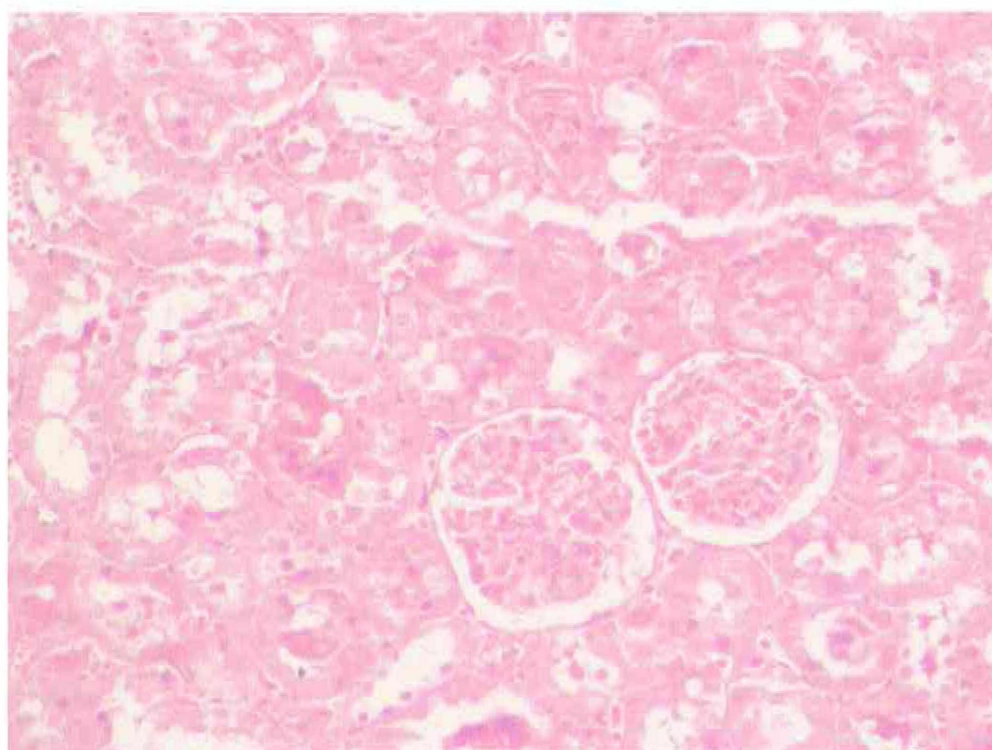


Figura 32 – Análise histopatológica do rim esquerdo, com aumento de 20x10. Controle interno. Todos os rins esquerdos apresentaram aparência semelhante, sem alterações.

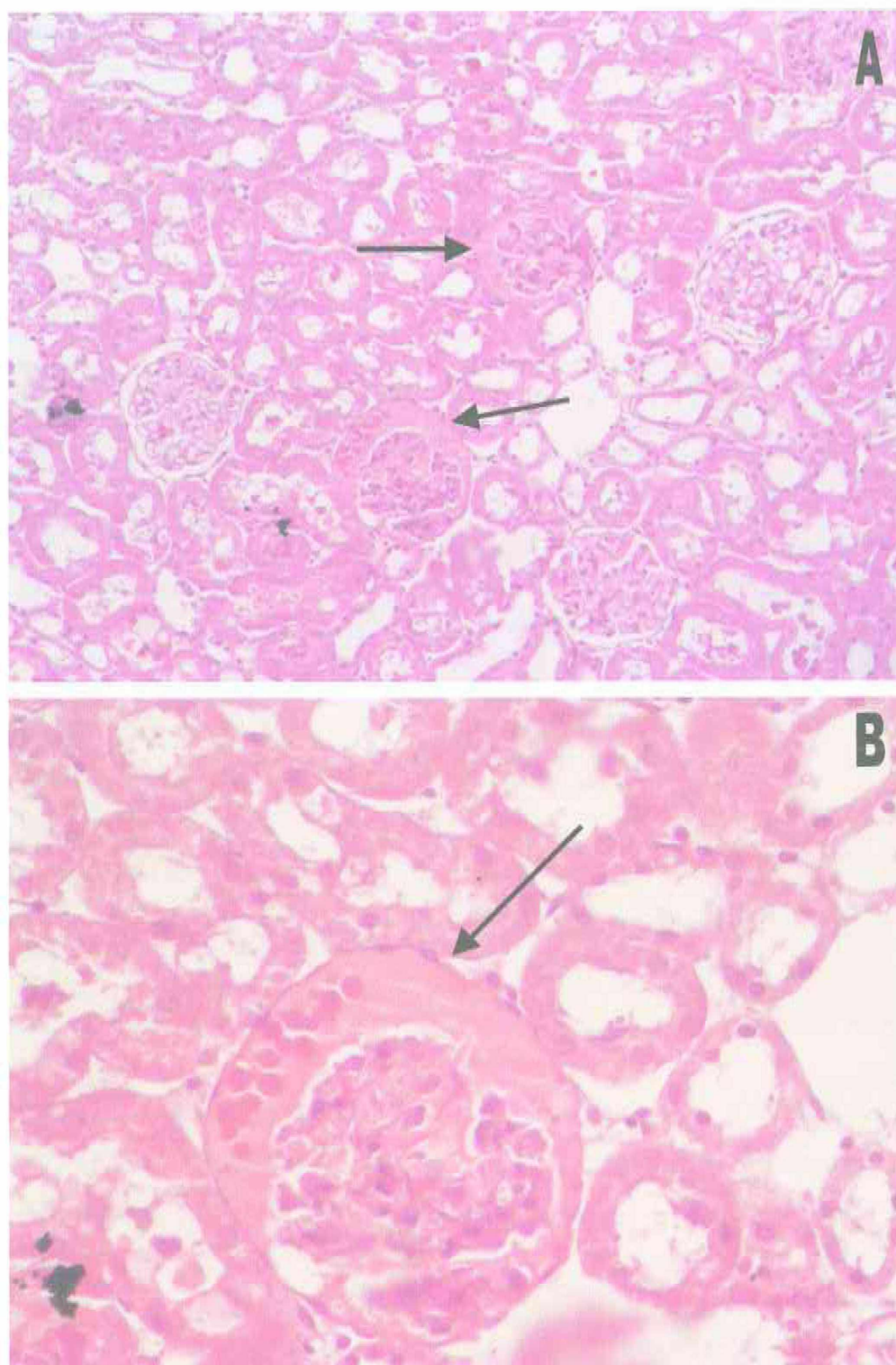


Figura 33 – Análise histopatológica do rim direito perfundido com ser-thr-lys-guanilina, na dose de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com aumento de 20x10 (A) e de 40x10 (B). Presença de material protéico

no espaço urinário de um número moderado de glomérulos. Alteração presente em todos os grupos testados.

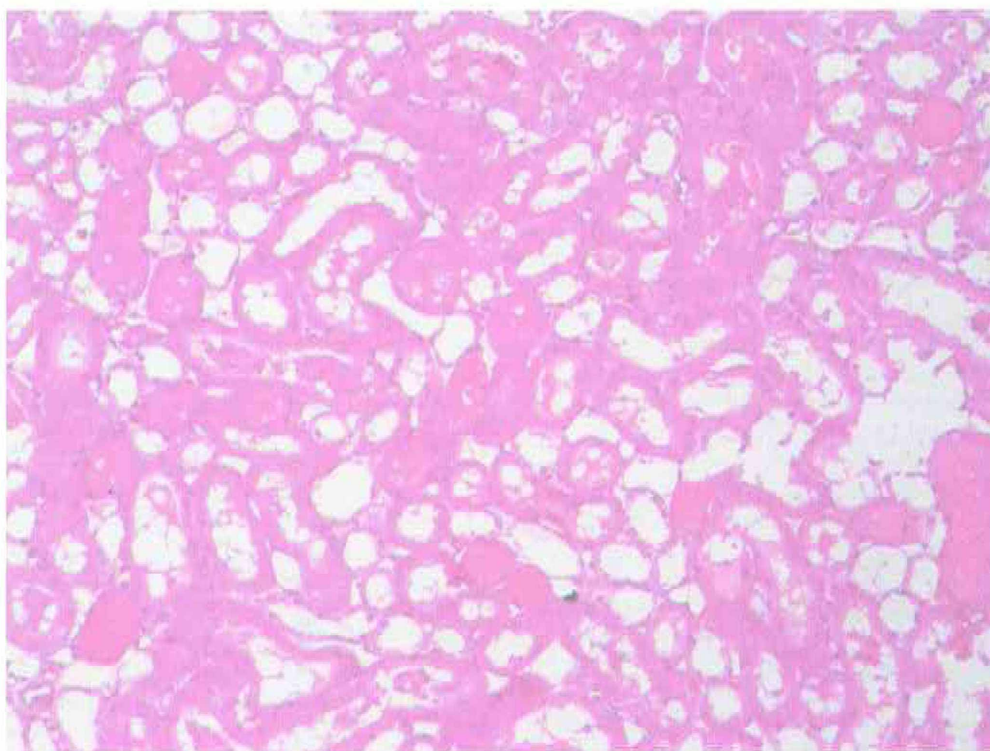


Figura 34 - Análise histopatológica do rim direito perfundido com ser-thr-lys-guanilina, na dose de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com aumento de 20x10. Presença de material protéico no espaço urinário de um número moderado de túbulos. Alteração presente em todos os grupos testados.

Quadro 01 – Síntese dos resultados dos parâmetros renais obtidos nos grupos: 01. Grupo controle (C); 02. Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de 0,1µg/mL (Ser-guan 0,1µg/mL); 03. Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de 1µg/mL (Ser-guan 1µg/mL); 04. Grupo UROGUANILINA, na dose de 0,5µg/mL (Uro 0,5µg/mL); 05. Grupo SER-THR-LYS-GUANILINA, na dose de 1µg/mL + UROGUANILINA, na dose de 0,5µg/mL (Ser-guan + Uro): a primeira foi adicionada no início do experimento e a segunda, após 30 minutos.

Grupo:	01	02	03	04	05
PP	---	↑	↓	↑	---
RVR	---	---	↓	---	---
FU	---	↑	↓	↑	↓
RFG	---	---	↓	---	↓
%TNa ⁺	---	↓	---	↓	↓
%pTNa ⁺	---	↓	---	↓	↓
%TK ⁺	---	↓	↓	↓	↓
%pTK ⁺	---	↓	↓	↓	↓
%TCl ⁻	---	↓	↓	↓	↓
%pTCl ⁻	---	↓	---	↓	↓
Cosm	---	---	↓	---	---

PP – pressão de perfusão; RVR – resistência vascular renal; FU – fluxo urinário; RFG – ritmo de filtração glomerular; %TNa⁺ – percentual de transporte tubular de sódio; %pTNa⁺ – percentual de transporte tubular proximal de sódio; %TK⁺ – percentual de transporte tubular de potássio; %pTK⁺ – percentual de transporte tubular proximal de potássio; %TCl⁻ – percentual de transporte tubular de cloreto; %pTCl⁻ – percentual de transporte tubular proximal de cloreto; Cosm – clearance osmolar.

6. DISCUSSÃO

A ser-thr-lys-guanilina, obtida por síntese encomendada à "American Peptide Company", foi fruto de um desejo de sintetizar a lysil-guanilina. Esse peptídeo, na dose menor, de 0,1 µg/mL e a uroguanilina, na dose de 0,5 µg/mL, apresentaram curvas muito similares em todos os parâmetros testados. Nesta dose, este novo peptídeo mostrou ações diurética, natriurética e caliurética semelhantes às ações causadas pela toxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa), guanilina, uroguanilina e lys-guanilina em sistema de rim isolado de rato (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1996 e 1998). De certo modo, ele se revelou nesta dose mais potente que a uroguanilina. Foi capaz, ainda, de causar diminuição no transporte tubular de cloreto, o que também já havia sido observado em rim isolado após a administração de guanilina, uroguanilina e lys-guanilina (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1996 e 1998; Santos-Neto, 1999); e em outros locais, como em células T84 do intestino humano (Schulz *et al.*, 1990; Forte *et al.*, 1993).

A idéia da existência de um agente químico de origem intestinal com atividade natriurética é muito antiga (Lennane *et al.*, 1975; Carey, 1978). Carey e colaboradores, em 1978, já haviam sugerido a existência de um hormônio intestinal com atividade natriurética para explicar a natriurese que ocorre em resposta a uma grande ingestão de sal. A administração de sal oral é mais eficiente nesse aumento da diurese que a administração intravenosa de solução salina. Enquanto o sistema renina-angiotensina-aldosterona age na regulação de sódio quando suas concentrações no organismo estão baixas, os mecanismos que regulam o aumento pós-prandial da natriurese em consequência à ingestão elevada de sódio permanece sem explicação. Um hormônio natriurético poderia, então, ser liberado pelo intestino ou outro órgão para estimular a excreção de NaCl pela urina. Com o que se sabe até o presente momento, os peptídeos da família das guanilinas poderiam perfeitamente ser responsáveis por fazer esse elo entre os dois sistemas, servindo como um novo mecanismo de controle de pressão. Essa ligação foi primeiramente evidenciada quando os efeitos natriuréticos da STa foram descritos por Lima e colaboradores em 1983. Quase uma década antes da descoberta das guanilinas. Vários estudos sugerem que, dentre esses peptídeos, a uroguanilina apresenta atividade renal mais expressiva (Lima *et al.*, 1992; Hamra *et al.*, 1993; Kita *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1997a; Greenberg *et al.*, 1997; Fonteles *et al.*, 1998).

Em 1993, Hamra e colaboradores demonstraram que a uroguanilina apresenta maior afinidade pelos receptores GC-C (guanilato ciclase de membrana – C) presentes nos túbulos renais. Um aumento na excreção de uroguanilina foi relacionado com altas concentrações urinárias de sódio e cGMP. Em experimentos com animais submetidos a uma dieta rica em sal, foi observado um aumento nas concentrações plasmáticas de uroguanilina e prouroguanilina (Forte e Hamra, 1996; Kinoshita *et al.*, 1997a; Whitaker *et al.*, 1997; Perkins *et al.*, 1997). Em humanos que consomem quantidades elevadas de sódio foi verificada uma maior concentração urinária de uroguanilina, cGMP e sódio (Kinoshita *et al.*, 1997a). Como o RNA mensageiro desse peptídeo está presente no átrio e ventrículo (Fan *et al.*, 1996), ele poderia servir como uma ponte entre o intestino, coração e o rim, em um mecanismo de controle de pressão ainda pouco esclarecido. Além disso, em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, foi observada grande concentração de uroguanilina na urina (Fan *et al.*, 1996; Andreis *et al.*, 1999; Carriters *et al.*, 2000a).

A localização da uroguanilina no estômago e intestino delgado proximal é compatível com essa idéia. Sua presença em células enterocromafins duodenais possibilitaria sua secreção na circulação após a detecção de altos níveis de sódio na dieta (Kinoshita *et al.*, 1997a; Nakazato *et al.*, 1998; Whitaker *et al.*, 1997; Perkins *et al.*, 1997). Embora tanto a guanilina quanto a uroguanilina sejam encontradas no plasma e apresentem dimensões passíveis de filtração, apenas a última é encontrada na urina de rato, gambá e humana (Fan *et al.*, 1995; Miyazato *et al.*, 1996a e b), o que pode estar relacionado com a diferença desses peptídeos quanto ao metabolismo renal.

Santos-Neto e colaboradores, em 1999, verificaram que existe uma interação entre a atividade dos peptídeos da família das guanilinas com outros peptídeos natriuréticos. Em seus experimentos o pré-tratamento dos rins perfundidos com atriopeptina-A é capaz de aumentar a resposta renal à guanilina e à uroguanilina.

Forte, em 1999, baseado na capacidade deste peptídeo de induzir a produção de cGMP em células T84 e em rim de gambá, sugeriu uma ordem segundo à potência da ação para agonistas dos receptores GC-C. A STa seria mais potente que a uroguanilina e esta, por sua vez, que a guanilina. A mesma ordem de potência foi confirmada em sistema de perfusão de rim isolado de rato (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1998). Foi sugerido que essa menor

potência da guanilina em relação a uroguanilina se devia ao fato de que a primeira é rapidamente clivada e inativada pela quimi tripsina, o que não ocorre com a segunda (Carpick e Garipey, 1993; Hamra *et al.*, 1996 a/b; Greenberg *et al.*, 1997). Quando administrada por via oral, a guanilina, mesmo em altas doses, é bem tolerada e não é capaz de causar efeitos, como os causados, por exemplo, pela STa (Forte & Hamra, 1996).

Incorporando-se uma lisina na porção N-terminal à estrutura da guanilina de rato, obteve-se a lys-guanilina, o que foi desenvolvido inicialmente por biotecnologia (Fonteles *et al.*, 1996). Este peptídeo mostrou-se mais potente e resistente à hidrólise que sua estrutura de origem (Fonteles *et al.*, 1996 e 1998). Em 1999, Santos-Neto realizou um estudo comparativo entre a lys-guanilina e seu peptídeos de origem, observando que a guanilina apresentava relação tempo-efeito diferente do análogo lisil. Percebeu que os efeitos natriuréticos da lys-guanilina se mantinham até o final do experimento, enquanto que a guanilina produzia esse efeito somente durante 60 minutos. Seu estudo sugere que a lys-guanilina é mais potente que a guanilina na capacidade de provocar resposta natriurética e diurética (Santos-Neto *et al.*, 2003). Em nossos experimentos, foram incorporados uma serina, treonina e lisina na porção N-terminal à estrutura da guanilina de rato, formando a ser-thr-lys-guanilina. Na dose de 0,1 µg/mL, esse peptídeo mostrou-se estável e os efeitos natriurético, caliurético e diurético não só se mantiveram, como aumentaram até o final dos experimentos.

A guanilina, na dose de 0,3 µg/mL, não induziu diurese ou natriurese (Santos-Neto, 1999; Fonteles *et al.*, 1998). A dose de 0,66 µg/mL causou alterações significativas apenas nos transportes tubulares. No presente estudo, uma dose ainda menor de ser-thr-lys-guanilina (0,1 µg/mL) foi capaz de alterar significativamente a pressão de perfusão (PP), o fluxo urinário (FU) e o percentual de transporte tubular total e proximal de sódio, potássio e cloreto, sugerindo uma potência maior que a da guanilina. Nos estudos de Santos-Neto, em 1999, a guanilina na dose de 0,3 µg/mL causou alterações na função renais quando os rins foram pré-tratados com quimostatina. Essa substância prolongou o aumento da diurese até o final dos experimentos.

A uroguanilina, na dose de 0,5 µg/mL, também foi testada em sistema de perfusão de rim isolado por Santos-Neto, em 1999. Como em nossos experimentos, foi observado um aumento na PP no intervalo de 120min. Nos estudos de Santos-Neto, houve aumento no FU nos intervalos de 90 e 120 min. Em nossos experimentos, esse aumento teve início já aos 60 min. Quanto ao percentual de reabsorção tubular de sódio, potássio e cloreto, em seus trabalhos, houve redução desde o intervalo de 60 min., o que também foi observado no presente estudo. No entanto, em relação ao percentual de transporte total e proximal de sódio, em nossos experimentos, esta diminuição ocorreu somente nos intervalos de 90 e 120min.

No presente trabalho tanto a dose de 0,1 µg/mL de ser-thr-lys-guanilina como a uroguanilina na dose de 0,5 µg/mL apresentaram aumento na pressão de perfusão significativo nos intervalos de 90 e 120 minutos. Em 1998, Fonteles e colaboradores já haviam descrito esse efeito da uroguanilina, nas doses de 0,62 µg/mL e 1,9 µg/mL, relatando um aumento significativo desde o intervalo de 60 minutos e confirmado por Santos-Neto e colaboradores, em 1999 e 2003. Esse efeito foi também verificado após a administração da lys-guanilina (Fonteles *et al.*, 1996). A guanilina não foi capaz de causar essa alteração significativa na pressão de perfusão (Fonteles *et al.*, 1998).

Os resultados da dose menor de ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL) foram surpreendentes ao passo que, mesmo numa concentração tão pequena, foi capaz de causar alterações tão expressivas. Foi administrada, então, uma dose maior (1µg/mL) desse peptídeo. Esperava-se que este novo grupo apresentasse uma potência diurética e natriurética ainda maior, mas surpreendentemente foram observadas uma ação antidiurética estatisticamente significativa e nenhuma ação no transporte tubular de sódio, embora os efeitos na diminuição do transporte tubular total e proximal de potássio e cloreto continuassem presentes.

Pesquisamos, então, se a ser-thr-lys-guanilina, na dose de 1µg/mL, era capaz de bloquear os efeitos causados pela uroguanilina. Nesse grupo, ela não apenas bloqueou o efeito diurético da uroguanilina, como continuou causando um efeito antidiurético significativo. No entanto, não foi capaz de bloquear os efeitos natriuréticos da uroguanilina. Como explicar resultados tão intrigantes?

A interação entre a STa e peptídeos da família das guanilinas com os receptores GC-C, bem como os eventos que ocorrem em consequência dessa interação, explica o mecanismo de ação intestinal desses peptídeos. Porém, até o presente momento, o mecanismo de ação renal preciso ainda não foi completamente esclarecido. Sabe-se que esses peptídeos se ligam aos receptores GC-C (Schulz *et al.*, 1990), porém há indícios de que existam outras vias de ação renal, independentes desse receptor. Em experimentos com a deleção dos genes que codificam esses receptores, os animais não apresentaram qualquer resposta no aumento da secreção intestinal após a administração da STa (Schulz *et al.*, 1997 e Mann *et al.*, 1997), o que confirma o mecanismo de ação intestinal desses peptídeos. No entanto, nesses camundongos, o aumento das concentrações urinárias de sódio, potássio, cloreto e água se mantiveram presentes, após a administração de STa e de uroguanilina (Carrithers *et al.*, 1999 e 2004). Esses resultados sugerem a existência de outro receptor renal, cuja mediação é, entretanto, dependente de cGMP.

Em 1999, London e colaboradores identificaram um novo receptor em rim de gambá, que foi chamado OK-GC (do inglês: "opossum kidney"), uma proteína de 1049 aminoácidos pertencente à crescente família dos receptores GCs. O receptor OK-GC é ativado pela guanilina, uroguanilina e STa. Seu mRNA foi abundantemente encontrado no córtex renal e na mucosa intestinal, além da bexiga urinária e coração. Esse receptor exibe somente 50% de identidade no domínio de ligação com a forma intestinal do GC-C de rato, humano e suíno (Schulz *et al.*, 1990; DeSauvage *et al.*, 1991; Wada *et al.*, 1994). O receptor OK-GC pode ser o responsável pela manutenção do efeito natriurético nos camundongos GC-C "knockout" (Schulz *et al.*, 1997; Mann *et al.*, 1997 e Carrithers *et al.*, 1999).

Nas duas doses testadas, a ser-thr-lys-guanilina diminuiu o transporte tubular total e proximal de potássio, resultando em um aumento em sua concentração na urina. Esse efeito foi descrito também como consequência da administração de STa, guanilina, uroguanilina e lys-guanilina em sistema de perfusão de rim isolado de rato (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1996 e 1998; Santos-Neto, 1999). Essa ação renal não foi encontrada em experimentos com esses peptídeos em intestino, fato que contribui para a hipótese de que os mecanismos de ação renal e intestinal são distintos. Uma dose pequena de guanilina de 0,33 µg/mL, causou diminuição significativa no transporte de potássio, sem qualquer alteração na excreção de sódio (Fonteles *et al.*, 1998). Esse efeito também foi observado com a administração de ser-

thr-lys-guanilina, na dose maior, de 1 µg/mL, em nossos experimentos. A descoberta dos canais de potássio *Ken1* e sua regulação talvez possa ser uma explicação para essa ação. Foi sugerido também por Fonteles e colaboradores, em 1998, que a natriurese provocada em túbulos proximais ocasionaria grande concentração de sódio nos túbulos distais, o que conseqüentemente poderia estimular a secreção de potássio por esses segmentos do néfron. Essa estimulação pode ocorrer mesmo quando o aumento na concentração de sódio na urina não é perceptível.

Existem vários estudos sobre o local de ação renal dos peptídeos da família das guanilinas. Há indícios de que os principais locais são o túbulo contorcido proximal, a porção medular final da alça de Henle ascendente e o túbulo coletor. Esses segmentos do néfron expressam níveis elevados de mRNA para receptores GC-C e proteína quinase II dependente de cGMP. Vários estudos demonstram que os efeitos intestinais desses peptídeos são mediados especificamente por essa proteína, em resposta a elevada concentração intracelular de cGMP (Guba *et al.*, 1996; Hoenderop *et al.*, 1999; French *et al.*, 1995; Vaandrager *et al.*, 1997a). Além disso, há várias pesquisas sugerindo que um aumento no cGMP intracelular realmente é capaz de causar uma diminuição no transporte tubular nesses segmentos do néfron (Jackson *et al.*, 1999; Baily *et al.*, 1998; Eitle *et al.*, 1998).

Em 1998, Baily relatou que um aumento no cGMP inibiu a reabsorção de NaCl na porção final do ramo ascendente da alça de Henle. Esse efeito foi observado após a ativação dos receptores GC de membrana pelo peptídeo natriurético atrial (ANP), fator de ativação de plaquetas e urodilatina, bem como após a ativação da guanilato ciclase solúvel pelo óxido nítrico. No mesmo ano, Eitle e colaboradores demonstraram que tanto o ANP como o nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) inibiam a reabsorção tubular proximal. Em estudos com microperfusão em túbulos coletores corticais, foi observado que doadores de óxido nítrico atenuavam o aumento na permeabilidade à água causado pela vasopressina (Garcia *et al.*, 1996). Em contraste, Schlatter e colaboradores, em 1996, demonstraram que os peptídeos ativadores de cGMP não modificam a reabsorção nos túbulos coletores corticais.

No presente estudo, os efeitos de ambas as doses de ser-thr-lys-guanilina (0,1µg/mL e 1µg/mL) no fluxo urinário, embora contrários (diurético e antidiurético, respectivamente) foram tempo-depentes, crescentes até o intervalo de 120 minutos de experimento, confirmando a resistência desse peptídeo ao metabolismo renal. Ambas causaram diminuição no percentual de transporte tubular total e proximal de potássio e cloreto, mas aparentemente esse efeito não foi dose-dependente. Na dose de 0,1µg/mL, diminuiu também a reabsorção tubular total e proximal de sódio, o que não foi observado com a dose maior.

Contudo, o efeito antidiurético da ser-thr-lys-guanilina, na dose maior (1µg/mL), permanece sem explicação. Existe a possibilidade de que esse peptídeo tenha a capacidade de se ligar a outro receptor ainda não identificado, provavelmente localizado nas porções mais distais do néfron, que provoque uma ação sobre a reabsorção de água, mas tenha pouca ou nenhuma ação sobre a reabsorção de eletrólitos.

Há ainda a possibilidade de que um componente menor e contaminante possa apresentar efeitos antagônicos ou até mesmo bloqueador das guanilinas.

7. CONCLUSÕES

- ❖ O presente estudo mostrou que a *ser-thr-lys-guanilina* apresenta alterações significativas na função renal. No entanto, seu mecanismo de ação renal ainda não foi completamente esclarecido.
- ❖ Esse peptídeo causou efeitos antagônicos aos previamente descritos na literatura após a administração dos peptídeos da família das guanilinas.
- ❖ No entanto, em doses pequenas, apresentou-se como agonista. É possível que haja a presença de uma substância contaminante, de modo que duas entidades estejam agindo de forma antagônica. Talvez haja a necessidade de isolá-las.
- ❖ Contudo, a possibilidade da descoberta de um antagonista desses peptídeos é concreta e representa grande importância no meio científico.
- ❖ A descoberta dos peptídeos da família das guanilinas promoveu avanços significativos na compreensão da regulação endógena dos transportes de água e eletrólitos. Contudo, seu mecanismo de ação renal ainda não foi completamente elucidado.
- ❖ A *ser-thr-lys-guanilina* representa, ainda, uma ferramenta farmacológica importante na busca pela total compreensão do mecanismo de ação renal desses peptídeos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMOTO S., TAKAO T., SHIMONISHI Y., HARA S., TAKEDA T., TAKEDA Y., MIWATANI T. Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*. 15;129(2):257-63, 1982.

ANAND-SRIVASTAVA M.B. Atrial natriuretic peptide-C receptor and membrane signalling in hypertension. *J. Hypertens*. 15(8), 815-26, 1997.

ANDREIS P.G., TORTORELLA C., MALENDOWICZ L.K., REBUFFAT P., MAZZOCCHI G., NERI G., NUSSDORFER G.G. Guanylin: a novel regulatory peptide possibly involved in the control of Ca²⁺-dependent agonist-stimulated aldosterone secretion in rats. *Int J Mol Med* 3:59-62, 1999.

ARAÚJO FILHO R.M. Efeitos comparativos do Glutation (GSH) em dois modelos de solução preservadora no rím perfundido do coelho. 1995. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 1995.

ARVANITAKIS C., NAKOS V., KALEKOU-GREKA H., TOURKANTONIS A. Small intestinal function and structure in patients with chronic renal failure. *Clin. Nephrol*. 29(5):235-43, 1988.

ASHMAN,D.F.; LIPTON,R.; MELICOW,M.M.; PRICE,T.D. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun*. 11:330-4, 1963.

BAHLMAN J.,GIEBISCH G.,OCHWADT,B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am. J.Physiol.*, v.212,p.77-82,1967.

BAILY C. Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int* 65:S29-35, 1998.

BALINTJ.P., KOSIBA J.L., COHEN M.B. The heat-stable enterotoxin-guanylin receptor is expressed in rat hepatocytes and in a rat hepatoma (H-35) cell line. *J Recept Signal Transduction Res* 17:609-6030, 1997.

BANCHARD R.K., COUSINS R.J. Upregulation of rat intestinal uroguanylin mRNA by dietary zinc restriction. *Am J Physiol* 272:G972-8, 1997.

BHANDARI R., SRINIVASAN N., MARABOABI M., GHANEKAR Y., SUGUNA K., VISWESWARIAH S.S. Functional inactivation of the human guanylyl cyclase

C receptor: modeling and mutation of the protein kinase-like domain. *Biochem.* 40(31):9196-206, 2001.

BOWMAN R.H. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J. Biol. Chem.* v.245, n.7, p.1604-1612, 1970.

BOWMAN R.H., MAACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and electrolyte in perfused rat kidney. *AM. J. Physiol.*, v.226, n.2, p.426-430, 1974.

CAREY R.M. Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man: lack of dependence upon aldosterone. *Circ. Res.* 43:19-23, 1978.

CARPICK B.W., GARIEPY J. The *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is a long-lived superagonist of guanylin. *Infect Immun* 61:4710-5, 1993

CARRITHERS S.L., BARBER M.T., BISWAS S., PARKINSON S.J., PARK P.K., GOLDSTEIN S.D., WALDMAN S.A. Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:1427-32, 1996.

CARRITHERS S.L., HILL M.J., JOHNSON B.R., O'HARA S.M., JACKSON B.A., OTT C.E., LORENZ J., MANN E.A., GIANNELLA R.A., FORTE L.R., GREENBERG R.N. Renal effects of uroguanylin and guanylin *in vivo*. *Braz J Med Biol Res* 32:1-8, 1999.

CARRITHERS S.L., EBER S.L., FORTE L.R., GREENBERG R.N. Increased urinary excretion of uroguanylin in patients with congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(2): H538-47, 2000a.

CARRITHERS S.L., TAYLOR B., CAI W.Y., JOHNSON B.R., OTT C.E., GREENBERG R.N., JACKSON B.A. Guanylyl cyclase-C receptor mRNA distributions along the rat nephron. *Regulatory peptides* 95:65-74, 2000b.

CARRITHERS S.L., JACKSON B.A., CAI W.Y., GREENBERG R.N., OTT C.E. Site-specific effects of dietary intake on guanylin and uroguanylin mRNA expression in rat intestine. *Regul Pept* 107:87-95, 2002.

CARRITHERS S.L., OTT C.E., HILL M.J., JOHNSON B.R., CAI W., CHANG J.J. Guanylin and uroguanylin induce natriuretics in mice lacking guanylyl cyclase-C. *Kidney Int* 65:40-53, 2004.

CETIN Y., KULAKSIZ H., REDECKER P., BARGSTEN G., ADERMANN K., GRUBE D., FORSSMANN W.G. Bronchiolar nonciliated secretory (Clara) cells: source of guanylin in the mammalian lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:5925-9, 1995.

CHAO A.C., DESAUVAGE F.-J., DONG Y.J., WAGNER J.A., GOEDEL D.V., GARDNER P. Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channels by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. **EMBO J** 13:1065-72, 1994.

CHAN S.K., GIANNELLA R.A. Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for man. **J Biol Chem.** 10;256(15):7744-6, 1981.

COHEN J.J., KOOK Y.J., LITTLE J.R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J.Physiol** v.226,p.103-121,1977.

COHEN M.B., WITTE D.P., HAWKINS J.A., CURRIE M.G. Immunohistochemical localization of guanylin in the rat small intestine and colon. **Biochem Biophys Res Commun** 209:803-8, 1995.

COHEN M.B., HAWKINS J.A., WITTE D.P. Guanylin mRNA expression in human intestine and colorectal adenocarcinoma. **Lab. Invest.**78(1):101-8, 1998.

CURRIE M.G., FOK K.F., KATO J., MOORE R.J., DUFFIN K.L., SMITH C.E. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci.** v.89,p. 947-51, USA, 1992.

CUTHBERT A.W., HICKMANN M.E., MACVINISH L.J., EVANS M.J., COLLEDGE W.H., RATCLIFF R., SEALE P.W., HUMPHREY P.A. Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelia from normal and transgenic cystic fibrosis mice. **Br. J. Pharmacol.** 112:31-6, 1994.

DATE Y., NAKAZATO M., YAMAGUSHI H., MIYAZATO M., MATSUKURA S. Tissue distribution and plasma concentration of human guanylin. **Inter Med** 35:171-5, 1996.

DE BOLD A.J. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. **Can.J.Physiol.Pharmacol.**60(3):324-30,1982.

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

DE BOLD A.J., BORENSTEIN H.B., VERESS A.T., SONNENBERG H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci** 28,89-94, 1981.

DE MELLO G., MAACK T. Nephron function of isolated perfused rat kidney. **Am.J.Physiol.**, v.231,n.6,p.699-707,1976.

DESAUVAGE F.J., CAMERATO T.R., GOEDDEL D.V. Primary structure and functional expression of the human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J Biol Chem* 266:17912-8, 1991.

DESAUVAGE F.J., KESHAV S., KUANG W.J., GILLET N., HENZEL W., GOEDDEL D.V. Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9089-93, 1992.

D'ESTE L., KULAKSIZ H., RAUSCH U., VACCA COPYRIGHT 'C[ABAHOME INC. DENIS WU S121809027RO R., WENGER T., TOKUNAGA Y. Expression of guanylin in "pars tuberalis-specific cells" and gonadotrophs of rat adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1131-1136, 2000.

DREWETT J.G. GARBERS D.L. The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocrine Rev.* 15(2): 135-62, 1994.

DWARAKANATH P., VISWESWARIAH S.S., SUBRAHMANYAM Y.V.B.K., SHANTHI G., JAGANNATHA H.M., BALGANESH T.S. Cloning and hyperexpression of a gene encoding the heat-stable toxin of *Escherichia coli*. *Gene* 81:219-26, 1989.

EITLE E., HIRANYACHATTADA S., WANG H., HARRIS P.J. Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 274(43):C1075-80, 1998.

FAN X., HAMRA FK, LONDON RM, EBER SL, SMITH C.E., CURRIE M.G., FREEMAN R.H., FORTE L.R. Purification and properties of uroguanylin from rat urine (Abstract). *FASEB J.* 9:A6, 1995.

FAN X., HAMRA F.K., FREEMAN R.H., EBER S.L., KRAUSE W.J., LIM R.W. PACE V.M., CURRIE M.G., FORTE L.R. Uroguanylin: cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and prouroguanylin from plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 219:457-62, 1996.

FAN X, HAMRA FK, LONDON RM, EBER SL, KRAUSE WJ, FREEMAN RH, SMITH CE, CURRIE MG, FORTE LR. Structure and activity of uroguanylin isolated from urine and intestine of rats. *Am J Physiol* 273:E957-64, 1997a.

FAN X., WANG Y., LONDON R.M., EBER S.L., KRAUSE W.J., FREEMAN R.H., FORTE L.R. Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive renal, central nervous, reproductive and lymphoid systems. *Endocrinology* 138:4636-48, 1997b.

FAVA T.A., DESNOYERS R., SHULZ S., PARK J., WEINBERG D., MITCHELL E. Ectopic expression of guanylyl cyclase C in CD34+ progenitor cells in peripheral blood. **J Clin Oncol** 19:3951-3959, 2001.

FIELD M., GRAF Jr. LH, LAIRD W.J., SMITH P.L. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: *in vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 75, 2800-2804, 1978.

FIELD M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **J Clin Invest** 111:931-43, 2003.

FLYNN TG, DE BOLD ML, DE BOLD AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent and natriuretic properties. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 28:117(3):859-65, 1983.

FONTELES M.C. Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. Fortaleza, 1980. Tese (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, 1980.

FONTELES M.C., COHEN J.J., BLACK A.J., WERTHEIM S.J. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** 244:F235-F246, 1983.

FONTELES M.C., MONTEIRO H.S.A., SOARES A.M., SANTOS-NETO M.S., GREENBERG R.N., LIMA A.M. The lysine-1 analog of guanylin induces intestinal secretion and natriuresis in the isolated perfused kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29:267-271, 1996.

FONTELES M.C., GREENBERG R.N., MONTEIRO H.S.A., CURRIE M.G., FORTE L.R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Am J Physiol** 275:F191-7, 1998.

FONTELES M.C., CARRITHERS S.L., MONTEIRO H.S.A., CARVALHO A.F., COELHO G.R., GREENBERG R.N. Renal effects of serine-7 analog of lymphoguanylin in ex vivo rat kidney. **Am J Physiol** 280:F207-213, 2001.

FORTE LR, KRAUSE WJ, FREEMAN RH. Receptors and cGMP signaling mechanism for *E. Coli* enterotoxin in opossum kidney. **Am J Physiol**, 255:F1040-6, 1988.

FORTE LR, KRAUSE WJ, FREEMAN RH. *Escherichia coli* enterotoxin receptors: localization in opossum kidney, intestine and testis. **Am J Physiol** 257:F874-81, 1989.

FORTE L.R., THORNE P.K., EBER S.L., KRAUSE W.J., FREEMANN R.H., FRANCIS S.H., CORBIN J.D. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable

enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* 263:C607-15, 1992.

FORTE L.R., EBER S.L., TURNER J.T., FREEMAN R.H., FOK K.F., CURRIE M.G. Guanylin stimulation of Cl⁻ secretion in human intestinal T84 cells via cyclic guanosine monophosphate. *J Clin Invest* 91:2423-2428, 1993.

FORTE L.R., CURRIE M.G. Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. *The FASEB J.* 9:643,650,1995.

FORTE L.R., FAN X., HAMRA F.K. Salt and water homeostasis: uroguanylin is a circulating peptide hormone with natriuretic activity. *Am J Kidney Dis* 28:296-304, 1996.

FORTE L.R., HAMRA R.H. Guanylin and uroguanylin: intestinal peptides hormones that regulate epithelial transport. *News Physiol. Sci.* 11:17-24, 1996.

FORTE L.R., LONDON R.M., EBER S.L., FREEMAN R.H., KRAUSE W.J. Guanylin-like peptides and receptors in fish intestine. *FASEB J* 11:A297, 1997.

FORTE L.R. Guanylin regulatory peptides: structures, biological activities mediated by cyclic GMP and pathobiology. *Regulatory Peptides*, 81:25-39, 1999.

FORTE L.R., EBER S.L., FAN X., LONDON R.M., EANG Y., ROWLAND L.M., CHIN D.T., FREEMAN R.H., KRAUSE W.J. Lymphoguanylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family. *Endocrinology* 140:1800-06, 1999.

FORTE L.R. Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacol Ther* 104:137-62, 2004.

FRENCH P.J., BIJMAN J., EDIXHOVEN M., VAANDRAGER A.B., SCHILTE B.J., LOHMANN S.M., NAIM A.C., DE JONGE H.R. Isotype-specific activation of cystic by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 270(44):26626-31, 1995.

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

FUKAE H., KINOSHITA H., FUJIMOTO S., KITA T., NAKAZATO M., ETO T. Changes in urinary levels and renal expression of uroguanylin on low or high salt diets in rats. *Nephron* 92:373-378, 2002.

FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980.

FURCHGOTT R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Biosci Rep** 19:235-251, 1999.

GARBERS,D.L. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. **Cell**. 2;71(1):1-4, 1992.

GARIEPY J., JUDD A.K., SCHOOLNIK G.K. Importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST1b. **Proc Natl Acad Sci USA** 84:8907-11, 1987.

GIANNELLA R.A. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins, guanylins, and their receptors: what are they and what do they do? **J Lab Clin Med** 125(2): 173-81, 1995.

GREENBERG R.N. & GUERRANT R.L. *E. coli* heat-stable enterotoxin. **Pharmacol Ther.** 13(3):507-31, 1981.

GREENBERG R.N., HILL M., CRYTZER J., KRAUSE W.J., EBER S.L., HAMRA F.K., FORTE L.R. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin Sta in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. **J Invest Med** 45:276-82, 1997.

GREGG C.M., COHEN J.J., BLACK A.J., ESPELAND M.A. & FELDSTEIN M.L. Effects of glucose and inulin on metabolism and function of perfused rat kidney. **Amer J Physiol** 235:52—61, 1978.

GRIMMEL K., BONGARTZ S., KASPER H. Activities of intestinal enzymes in experimental chronic renal insufficiency. **Nephron**. 19(2):81-7, 1977.

GRUBB B.R., GABRIEL S.E. Intestinal physiology and pathology in gene targeted mouse models of cystic fibroses. **Am J Physiol** 273:G258-66, 1997.

GUARINO A., COHEN M.B., THOMPSON M.R. DHARMSATHAPHORN K., GIANNELLA R.A. T84 cell receptor binding and guanyl cyclase activation by *Escherichia coli* heat-stable toxin. **Am J Physiol** 253, G775-G780, 1987.

GUBA M., KUHN M., FORSSMANN W.G., CLASSEN M., GREGOR M., SEIDLER U. Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃⁻ secretion: proposed mechanism and comparison with other secretagogues. **Gastroenterology** 111:1558-68, 1996.

GUERRANT R.L.;HUGHES J.M.;CHANG B.;ROBERTSON D.C.;MURAD F. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity potential receptors and intermediates. **J.Infect.Dis.** 142:220-228, 1980.

HAMILTON R.L., BENNY N.M., WILLIAMS M.C., SEVERINGHAUS E.M.A. Simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. **J.Lipid.Res.**,v.9,p.667-668,1974.

HAMRA FK, FORTE LR, EBER SL, PIDHORODECKYJ NV, KRAUSE WJ, FREEMAN RH, CHIN DT, TOMPKINS JÁ, FOK KF, SMITH CE, DUFFIN KL, SIEGEL NR, CURRIE MG. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:10464-8, 1993.

HAMRA FK, KRAUSE WJ, SMITH CE, FREEMAN RH, CURRIE MG, FORTE LR. Opossum colonic mucosa contains uroguanylin and guanylin peptides. **Am J Physiol** 270:G708-16, 1996a.

HAMRA F.K., FAN X., KRAUSE W.J., FREEMAN R.H., CHIN D.T., SMITH C.E., CURRIE M.G., FORTE L.R. Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure and modulation of bioactivity by proteases. **Endocrinology** 137:257-65, 1996b.

HAMRA F.K., EBER S.L., CHIN D.T., CURRIE M.G., FORTE L.R. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:2705-10, 1997.

HESS R., KUHN M., SCHUZ-KNAPPE P., RAIDA M., FUCHS M., KLODT J., ADERMANN K., KAEVER V., CETIN Y., FORSSMANN W.G. GCAP-II: Isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. **FEBS Lett** 374:34-8, 1995.

HIDAKA Y., OHNO M., HEMMASI B., HILL O., FORSSMANN W.G., SHIMONISHI Y. In vitro disulfide-coupled folding of guanylyl cyclase-activating peptide (uroguanylin) and its precursor protein. **Biochemistry** 37:8498-507, 1998.

HIDAKA Y., MATSUMOTO Y., SHIMONISHI Y. The micro domain responsible for ligand-binding of guanylyl cyclase C. **FEBS Letters** 526:58-62, 2002.

HILL O., CETIN Y., CIESLAK A., MAGERT H.J., FORSSMANN W.G. A new human guanylate cyclase-activating peptide (uroguanylin): precursor cDNA and colonic expression. **Biochem Biophys Acta** 1253:146-9, 1995a.

HILL O., KUHN M., ZUCHT H., CETIN Y., KULAKSIZ H., ADERMANN K. Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. **Proc Natl Acad Sci USA** 92:2046-50, 1995b.

HIRAYAMA T, WADA A, HIDAKA Y, FUJISAWA J, TAKEDA Y, SHIMONISHI Y. Expression of a truncated guanylate cyclase (GC-C), a receptor for heat-stable enterotoxin and its dimer formation in CHO-7 cells. **Microb.Phatog.**15:283-291,1993.

HOENDEROP S.M., DE JONGE H.M., WILLEMS P.H., BINDELS R.J. Atrial natriuretic peptide-stimulated Ca^{2+} reabsorption in rabbit kidney requires membrane-targeted, cGMP-dependent protein kinase type II. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6084-9, 1999.

HUGHES J.M., MURAD F., CHANG B., GUERRANT R.L. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature (Lond)* 271:755-756, 1978.

IEDA H., NARUSE S., KITAGAWA M., ISHIGURO H., HAYAKAWA T. Effects of guanylin and uroguanylin on rat jejunal fluid and electrolyte transport: comparison with heat-stable enterotoxin. *Regulatory Peptides* 79: 165-171, 1999.

JACKSON B.A., OTT C.E. Renal system, Madson C.T. Fence Creek Publishing LLC, 1999.

JALEEL M., LONDON R.M., EBER S.L., FORTE L.R., VISWESWARIAH S.S. Expression of the receptor guanylyl cyclase C and its ligands in reproductive tissues of the rat: a potential role for a novel signaling pathway in the epididymis. *Biol Reprod* 67:1975-80, 2002.

JANKE A., XU X., AMASON U. The complete mitochondrial genome of the walaroo and the phylogenetic relationship among Monotremata, Marsupialia and Eutheria. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1276-81, 1997.

JOO N.S., LONDON R.M., FORTE L.R., CLARKE L.L. Regulation of intestinal Cl^- and HCO_3^- secretion by uroguanylin. *Am J Physiol* 274(37): G633-44, 1998.

JOO N.S., CLARKE L.L., HEE H.D. Cloning of $\text{ClC}-2$ chloride channel from murine duodenum and its presence in CFTR knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1446:431-37, 1999.

KINOSHITA H., FUJIMOTO S., NAKAZATO M., YOKOTA N., DATE Y., YAMAGUSHI H., HISANAGA S., ETO T. Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal disease. *Kidney Inter* 52:1028-34, 1997a

KINOSHITA H., NAKAZATO M., YAMAGUSHI H., MATSUKURA S., FUJIMOTO S., ETO T. Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal function. *Clin Nephrol* 47:28-32, 1997b.

KINOSHITA H., FUJIMOTO S., FUKAE H., YOKOTA N., HISANAGA S., NAKAZATO M., ETO T. Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron* 81:160-4, 1999.

KITA T, SMITH CE, FOK KF, DUFFIN KL, MOORE WM, KARABATSOS PJ, KACHUR JF, HAMRA FK, PIDHORODECKYJ NV, FORTE LR, CURRIE MG. Characterization of human uroguanylin: member of the guanylin peptide family. *Am J Physiol* 266:F342-8, 1994.

KNOOP F.C., THOMAS D.D. Stimulation of calcium uptake and cyclic GMP synthesis in rat basophilic leukemia cells by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* 41:971-7, 1983.

KRAUSE WJ, FREEMAN RH, FORTE LR. Autoradiographic demonstration of specific binding sites for *E. Coli* enterotoxin in various epithelia of the North American opossum. *Cell Tissue Res* 260:387-94, 1990.

KRAUSE WJ, FREEMAN RH, EBER S.L., HAMRA F.K., FOK K.F., CURRIE M.G., FORTE LR. Distribution of *escherichia coli* heat-stable enterotoxin/ guanylin/ uroguanylin receptors in the avian intestinal tract. *Acta. Anat.(Basel)*, 153(3):210-219, 1995.

KRAUSE W.J., FREEMAN R.H., EBER S.L., HAMRA F.K., CURRIE M.G., FORTE L.R. Guanylyl cyclase receptors and guanylin-like peptides in reptilian intestine. *Gen Comp Endocrin* 107:229-39, 1997.

KUHN M., RAIDA M., ADERMMANN K., SCHULZ-KNAPPE P., GERZER R., HEIM J.M., FORSSMANN W.G. The circulating bioactive form of human guanylin is high molecular weight peptide(10.3 kDa). *FEBS Lett* 318:205-9, 1993.

KUHN M., KULAKSIZ H., ADERMANN K., RECHKEMMER G., FORSSMANN W.G. Radioimmunoassay for circulating human guanylin. *FEBS Lett* 341:218-22, 1994a.

KUHN M., ADERMANN K., JAHNE J., FORSMANN W-G, RECHKEMMER G. Segmental differences in the effects of guanylin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on Cl⁻ secretion in human gut. *J Physiol* 479:433-40, 1994b

KUHN M., KULAKSIZ H., CETIN Y., FRANK M., NOLD R., ARNOLD R., BOKER K., BISCHOFF S.C., MANNS M.P., FORSSMANN W.G. Circulating and tissue guanylin immunoreactivity in intestinal secretory diarrhoea. *Eur J Clin Invest* 25:899-905, 1995.

KULAKSIZ H. & CETIN Y. The eletrolyte fluid secretion stimulatory peptides guanylin and uroguanylin and their common functional coupling proteins in the rat pancreas: a correlative study o

KULAKSIZ H. & CETIN Y. The electrolyte fluid secretion stimulatory peptides guanylin and uroguanylin and their common functional coupling proteins in the rat pancreas: a correlative study of expression and cell-specific localization. **Pancreas** 25:170-5, 2002.

KULAKSIZ H., SCHMID A., HONSCHEID M., EISSELE R., KLEMPNAUER J., CETIN Y. Guanylin in the human pancreas: a novel luminoocrine regulatory pathway of electrolyte secretion via cGMP and CFTR in the ductal system. **Histochem Cell Biol** 115:131-45, 2001.

KULAKSIZ H., REHBERG E., STREMMEL W., CETIN Y. Guanylin and functional coupling proteins in the human salivary glands and gland tumors. **Am J Pathol** 161:655-664, 2002a.

KULAKSIZ H., SCHMID A., HONSCHEID M., RAMASWAMY A., CETIN Y. Clara cell impact in air-side activation of CFTR in small pulmonary airways. **Proc Natl Acad Sci USA** 99:6796-6801, 2002b.

KULAKSIZ H., SCHLENKER T., ROST D., STIEHL A., VOLKMANN M., LEHNERT T. Guanylin regulates chloride secretion in the human gallbladder via the bile fluid. **Gastroenterology** 126:732-40, 2004.

LANEYJR D.W., MANN E.A., DELLEN S.C., PERKINS D.R., GIANNELLA R.A., COHEN M.B. Novel sites for expression of an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. **Am J Physiol** 263:G816-21, 1992.

LANEYJR D.W., BEZERRA J.A., KOSIBA J.L., DEGEN S.J.F., COHEN M.P.B. Upregulation of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. **Am J Physiol** 266:G899-906, 1994.

LENNANE R.J., PEARS W.S., CAREY R.M., SHAW J. Comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. **Clin Sci Mol Med** 49:433-6, 1975.

LEWIS L.G., WITTE D.P., LANEY D.W., CURRIE M.G., COHEN M.B. Guanylin mRNA is expressed in villous enterocytes of the rat colon. **Biochem Biophys Res Commun** 196:553-60, 1993.

LI Z. & GOY M.F. Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 265(2):394-G402, 1993.

LI Z., TAYLOR-BLAKE B., LICHT A.R., GOY M.F. Guanylin, an endogenous ligand for C-type guanylate cyclase, is produced by goblet cells in the rat intestine. **Gastroenterology** 109:1863-75, 1995.

LI Z., PERKINS AG, PETERS MF, CAMPA MJ, GOY MF. Purification, cDNA sequence, and tissue distribution of rat uroguanylin. **Reg Pept** 68:45-56, 1997.

LIMA AAM, FONTELES MC. Efeitos das toxinas do *V. Cholerae* e da *E. coli* no rim perfundido. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fisiologia. Abril-1983, São Lourenço-MG. **Anais...** S-31,p.46.

LIMA AAM, MONTEIRO HSA, FONTELES MC. The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. **Pharmacol. Toxicol.**70:163-167,1992.

LOHMANN S.M., VAANDRAGER A.B., SMOLENSKI A., WALTER U., DEJONGE H.R. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends Biochem Sci** 22:307-12, 1997.

LONDON R.M., KRAUSE W.J., FAN X., EBER S.L., FORTE L.R. Signal transduction pathways via guanylin and uroguanylin in the stomach and intestine. **Am J Physiol** 273:G93-105, 1997.

LONDON R.M., EBER S.L., VISWESWARIAH S.S., KRAUSE W.J., FORTE L.R. Structure and activity of OK-GC: a kidney receptor-guanylate cyclase activated by guanylin peptides. **Am J Physiol** 276:F882-891, 1999.

LORENZ J.N., NIEMAN M., SABO L.P., HAWKINS A., ELITSUR N. Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. **J Clin Invest** 112:1244-1254, 2003.

LUCAS M.L., SCHNEIDER W., HABERICH F.J., BLAIR J.A. Direct measurement by microelectrode of the pH-microclimate in rat proximal jejunum. **Proc Royal Soc Lond** 23:439-48, 1975.

MA T., THIAGARAJAH J.R., YANG H., SONAWANE N.D., FOLLI C., GALIETTA L.J.V. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced fluid secretion. **J Clin Invest** 110:1651-58, 2002.

MAAK C., MAUR F., JOVANOVIĆ K., REINECKE M., HAURI D., JOHN H. Occurrence and localization of uroguanylin in the aging human prostate. **Histochem Cell Biol** 119:69-76, 2003.

MANN E.A., JUMP M.L., WU J., YEE E., GIANNELLA R.A. Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to 5TA-induced intestinal secretion. **Biochem - Biophys Res Commun** 239:463-6, 1997.

MAGERT H-J., REINECKE M., DAVID I., RAAB H-R., ADERMANN K., ZUCHT H-D. Uroguanylin : gene structure, expression, processing as a peptide hormone, and co-storage in gastrointestinal D-cells. **Regul Pept** 73:165-176, 1998.

MAGERT H-J., HILL O., ZUCHT H-D., MARTIN S., MEYER M., FORSSMANN W-G. Porcine guanylin and uroguanylin: cDNA sequences, deduced amino acid sequences, and biological activity of the chemically synthesized peptides. **Biochem Biophys Res Commun** 259:141-148, 1999.

MARTINEZ-MALDONADO M., OPAVA-STITZER S. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea. **J Physiol** 280:487-497, 1978.

MIYAZATO M., NAKAZATO M., YAMAGUSHI H., DATE Y., KOJIMA M., KANGAWA K., MATSUO H., MATSUKURA S. Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. **Biochem Biophys Res Commun** 219:644-8, 1996a.

MIYAZATO M., NAKAZATO M., MATSUKURA S., KANGAWA K., MATSUO H. Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra-gastrointestinal tissues. **FEBS Lett.** 398:170-174, 1996b.

MONTEIRO H.S.A. Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* e estudo da ação de antagonistas do PAF e da ciclooxigenase no rim perfundido de rato. Tese de Doutorado. 105pags. Campinas – SP, 1990.

MOREIRA LIMA A.A. Estudos dos efeitos das toxinas do *V. cholerae* e *E. coli* no rim isolado se rato. Fortaleza, 1983. Tese (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 1983.

NAKAZATO M., YAMAGUSHI H., SHIOMI K., DATE Y., FUJIMOTO S., KANGAWA K., MATSUO H., MATSUKURA S. Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency. **Biochem Biophys Res Commun** 205:1966-75, 1994.

NAKAZATO M., YAMAGUSHI H., KINOSHITA H., KANGAWA K., MATSUO H., CHINO M., MATSUKURA S. Identification of biologically active and inactive human uroguanylins in plasma and urine and their increases in renal insufficiency. **Biochem Biophys Res Commun** 220:586-93, 1996.

NAKAZATO M., YAMAGUSHI H., DATE Y., MIYAZATO M., KANGAWA K., GOY M.F., CHINO M., MATSUKURA S. Tissue distribution, cellular source and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin. *Endocrinology* 139:5247-54, 1998.

NISHITSUTSUJI-UWO J.M., ROSS B.D., KREBS H.A. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J* 103:852-862, 1967.

OHBAYASHI H., YAMAKI K., SUZUKI R., TAKAGI K. Effects of uroguanylin and guanylin against antigen-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in sensitized guinea-pigs. *Life Sci.* 62:11833-44, 1998.

PARK J., SCHULZ S., HAAF J., KAIRYS J.C., WALDMAN S.A. Ectopic expression of guanylyl cyclase C in adenocarcinomas of the esophagus and stomach. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 11:739-44, 2002.

PARKINSON S.J., CARRITHER S.L., WALDMAN S.A. Opposing adenine nucleotide-dependent pathways regulate guanylyl cyclase C in the rat intestine. *J.Biol.Chem.*269:22683-22690, 1994.

PEGG E.D. Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. *Cryobiology* 8:431-440, 1971.

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

PERRAULT I., ROZET J.M., CALVAS P., GERBER S., CAMUZAT A., DOLLFUS H., CHÂTELIN S., SOUÏED E., GHAZI I., LEOWSKI C., BONNEMAISON M., LE PASLIER D., FRÉZAL J., DUFIER J-L., PITTLER S., MINNICH A., KAPLAN J. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nature Genet* 14:461-64, 1996.

PFEIFER A., ASZODI A., SEIDLER U., RUTH P., HOFMANN F., FASSLER R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274:2082-6, 1996.

POTTHAST R., EHLER E., SCHEVING L.A., SINDIC A., SCHLATTER E., KUHN M. High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology* 142:3087-3097, 2001.

RAO M.C., GUADALINI S., SMITH P.L., FIELD M. Tissue and subcellular specificities and role of cyclic GMP. *Biochem Biophys Acta* 632, 35-46, 1980.

RAWLINGS J.M., LUCAS M.L., RUSSEL R.I. Measurement of jejunal surface pH in situ by plastic pH electrodes in patients with coeliac disease. *Scan J Gastroenterol* 22:377-84, 1987.

REINECKE M., DAVID I., LOFFING-CUENI D., ABLINGER P., CETIN Y., KUHN M., FORSSMANN W.G. Localization, expression, and characterization of guanylin in the rat adrenal medulla. *Histochem Cell Biol* 106:367-74, 1996.

RIORDAN J.R., ROMMENS J.M., KEREM B-S., ALON N., ROZMAHEL R., GRZELCZAK Z., ZIELENSKI J., LOK S., PLAUSIC N., CHOU J-L., DRUMM M.L., IANUZZI M.C., COLLINS F.S., TSUI L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-73, 1989.

ROSS B.D., EPSTEIN F.H., LEAF A. Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. *Am.J.Physiol.* v.225,n.5,p.1165-1171, 1973.

ROSS B.D. The isolated perfused rat kidney. *Clin.Sci.Mol.Med.*v55,p.13-21, 1978.

SANTOS-NETO M.S. Estudo do metabolismo renal da guanilina e das interações entre guanilina e uroguanilina com os peptídeos natriuréticos ANP e urodilatina. 157 páginas. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Fortaleza-Ce. 1999.

SANTOS-NETO M.S., CARVALHO A.F., FORTE L.R., FONTELES M.C. Relationship between the action of atrial natriuretic peptide (ANP), guanylin and uroguanylin on the isolated kidney. *Braz J Biol Res* 32:1015-9, 1999.

SANTOS-NETO M.S., CARRITHERS S.L., CARVALHO A.F., MONTEIRO H.S.A., GREENBERG R.N., FORTE L.R., FONTELES M.C. Guanylin and its Lysine-containing analogue in the isolated perfused rat kidney: interaction with chymotrypsin inhibitor. *Pharmacol. & Toxicol.* 92:114-120, 2003.

SCHEVING L.A., RUSSELL W.E. Guanylyl cyclase C is up-regulated by nonparenchymal cells and hepatocytes in regenerating rat liver. *Cancer Res* 56:5186-91, 1996.

SCHULZ S., GREEN C.K., YUEN P.S. & GARBERS D.L. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63, 941-948, 1990.

SCHULZ S., CHRISMAN T.D., GARBERS D.L. Cloning and expression of guanylin. Its existence in various mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 267:16019-16021, 1992.

SCHULZ S., LOPEZ M.J., KUHN M., GARBERS D.L. Disruption of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J Clin Invest* 100(6): 1590-5, 1997.

SCHULZ S., WEDEL B.J., MATTHEWS A.M., GARBERS D.L. The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J Biol Chem*. 273(2):1032-7, 1998.

SCHULZ S. Targeted gene disruption in the development of mouse models to elucidate the role of receptor guanylyl cyclase signaling pathways in the physiological function. *Methods* 19, 551-8, 1999.

SCHUREK H.J. Application of the isolated perfused rat kidney. *Contr.Nephrol.*,v.19,p.176-190,1980.

SCIACKY D., KOSIBA J.L., COHEN M.B. Genomic sequences of the murine guanylin gene. *Genomics* 24:583-7, 1994.

SPRECA A., SIMONETTI S., RAMBOTTI M.G. Atrial natriuretic peptide and guanylin-activated guanylate cyclase isoforms in human sweat glands. *Histochem J* 32:725-31, 2000.

STEINBRECHER K.A., RUDOLPH J.A., LUO G., COHEN M.B. Coordinate upregulations of guanylin and uroguanylin expression by hypertonicity in HT29-18-N2 cells. *Am J Physiol* 283:C1729-37, 2002a.

STEINBRECHER K.A., WOWK S.A., RUDOLPH J.A., WITTE D.P., COHEN M.B. Targeted inactivation of the mouse guanylin gene results in altered dynamics of colonic epithelial proliferation. *Am J Pathol* 161:2169-78, 2002b.

SUDOH T., KANGAWA K., MINAMINO N., MATSUO H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332, 78-81, 1988.

SUDOH T., MINAMINO N., KANGAWA K., MATSUO H. C-type natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 863-870, 1990.

THIAGARAJAH J.R., BROADBENT T., HSIEH E., VERKMAN A.S. Prevention of toxin-induced intestinal ion and fluid secretion by a small-molecule CFTR inhibitor. *Gastroenterology* 126:511-19, 2004.

TRIMBLE M.E., BOWMAN R.H. Renal Na⁺ and K⁺ transport: effects of glucose, pelmitate and alfa-bromopalmitate. *Am.J.Physiol.*,v.225,n.5,p.771-784,1973.

VAANDRAGER A.B., BOT A.G., DE JONGE H.R. Guanosine 3'5'-cyclic-monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. **Gastroenterology** 112(2):437-43, 1997a.

VAANDRAGER A.B., TILLY B.C., SMOLENSKI A., SCHNEIDER-RASP S., BOT A.G.M., EDIXHOVEN M., SCHOLTE B.J., JARCHAU T., WALTER U., LOHMANN S.M., POLLER W.C., DEJONGE H.R. cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Iβ. **J Biol Chem** 272:4195-200, 1997b.

VACCARO R., CETIN Y., RENDA T.G. Ontogeny of guanylin immunoreactive cells in rat salivary glands. **Anat Embryol** 208:65-73, 2004.

VOLANT K., GRISHINA O., DESCROIX-VAGNE M., PANSU D. Guanylin-, heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*- and vasoactive intestinal peptide-induced water and ion secretion in the rat intestine in vivo. **Euro J Pharm** 328:217-227, 1997.

WADA A., HIRAYAMA T., KITAO S., FUJISAWA J., HIDAKA Y., SHIMONISHI Y. Pig intestinal membrane-bound receptor (guanylyl cyclase) for heat-stable enterotoxin: cDNA cloning functional expression and characterization. **Microbial Immunol** 38:535-41, 1994.

WALDMAN, S.A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev.** 39(3):163-96, 1987.

WALSER M., DAVIDSON D.G., ORLOFF J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J Clin Invest** 34:1520-1523, 1955.

WHITAKER T.L., WITTE D.P., SCOTT M.C., COHEN M.B. Uroguanylin and guanylin: distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine. **Gastroenterology** 113:1000-6, 1997.

WHITE AA, KRAUSE WJ, TURNER JT, FORTE LR. Opossum kidney contains a functional receptor for the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Biochem, Biophys. Res. Commun.** 159:363-367, 1989.

WIEGAND R.C., KATO J., CURRIE M.G. Rat guanylin cDNA: characterization of the precursor of the endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Biochem Biophys Res Commun** 185:812-7, 1992a.

WIEGAND R.C., KATO J., HUANG M.D., FOK K.F., KACHUR J.F., CURRIE M.G. Human guanylin: cDNA isolation, structure and activity. **FEBS Lett** 311:150-4, 1992b.

YU S., AVERY L., BAUDE E., GARBERS D.L. Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(7): 3384-7, 1997.

YANG R.B., FOSTER D.C., GARBERS D.L., FÜLLE H.J. Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(2):602-6, 1995.

ZHANG Z.H., JOW F., NUMANN R., HINSON J. The airway-epithelium: a novel site of action by guanylin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:50-6, 1998.

9. ANEXOS

ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Símbolo	Abreviatura
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Iso	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptofano	Trp	W
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H

American Peptide Company, Inc.
 777 E. Evelyn Avenue
 Sunnyvale, CA 94086
 USA

RECEIVED
 JAN 16 2002
 BY:

SALES ORDER

	997954-A
	1386

Telephone: 408-733-7604

Univ of Kentucky-VA Medical Ctr
 Dept. Of Medicine/Div Infectious Disease
 Markey Cancer Ctr RCC-334, 800 Rose St.
 Lexington, Kentucky 40536
 USA
 Telephone: 859-233-4511X4599
 Contact: Accounts Payable/PO#D839043

VA Medical Ctr-Univ of Kentucky
 Dept. Of Medicine/Div Infectious Disease
 1101 VA Drive, Bldg Code: VAMC-D309
 Lexington, Kentucky 40506
 PO#D839043
 Telephone: 859-233-4511X4599
 Contact: S. Carrichers/Rosch 151-CDD

Federal Express Standard	Knight Prepaid and Added	Net 30	Arma Pandya
01/16/02	Stephen Curran	606-257-2596	D839043

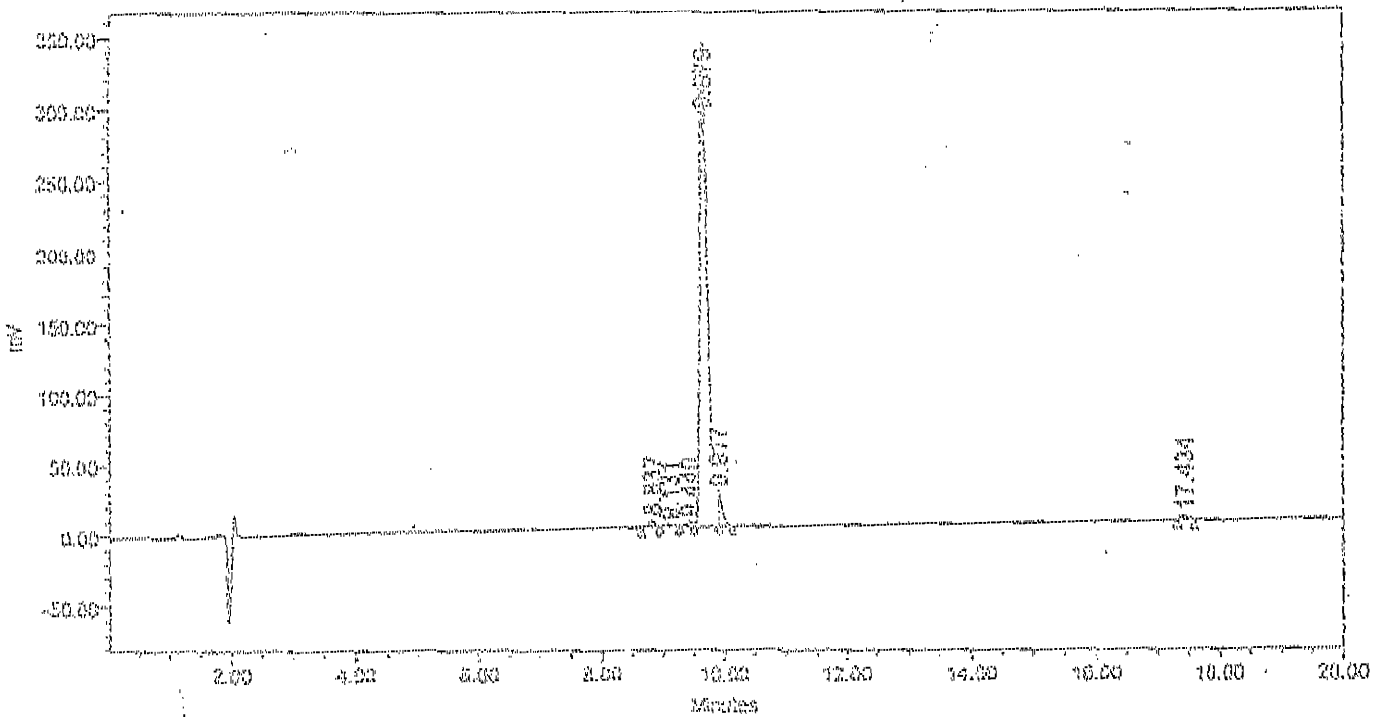
1 x 20 mg	1 x 20 mg	Y	315536	1,950.00	1,950.00
			Custom Peptide Ser - Thr - Lys - Pro - Asn - Thr - Cys - Glu - Ile - Cys - Ala - Tyr - Ala - Ala - Cys - Thr - Gly - Cys MS, HPLC, Purity 80% Two Nonpeptide Disulfide Bridges 25 mg of major product + other possible isomers. SPECIAL INSTRUCTIONS FOR SYNTHESIS/PURIFICATION BY SHAWN. BAO SHENG. PLEASE SPEAK TO SHAWN. Delivery 4 weeks.		
Please deliver on or before February 13, 2002.					
Thank you.					

AP

01/16/02		0.00	1,950.00
12:29:11 PM			20.00
1		1,950.00	
			1,970.00

AMERICAN PEPTIDE COMPANY
Sunnyvale, California 94088

Sample ID: 42-0-14 Lot #: P0912571
 Sample Conc.: 1.0 mg/mL Sample Diluent: see C of A
 Column Type: Vydac C₁₈, 300 Å, 5 µm, 4.6 mm x 250 mm
 Mobile Phase A: 0.1% TFA in Water
 Mobile Phase B: 0.1% TFA in Acetonitrile
 Gradient (Linear): 20 % to 40 % in 20 minutes
 Flow Rate: 1.5 mL/min. Wavelength: 215 nm Injection Vol.: 20 µL



	RT	Area	% Area
1	9.537	34838	1.08
2	9.131	14450	0.45
3	9.440	26377	0.82
4	9.579	3010633	93.73
5	9.917	99353	3.03
6	17.434	26522	0.83



Certificate of Analysis

Product Name: Uroguanylin, human

Product #: 43-0-14

Lot #: P09125T1

Sequence: Asn - Asp - Asp - Cys - Glu - Leu - Cys - Val - Asn - Val - Ala - Cys - Thr - Gly - Cys - Leu

Molecular Weight: 1667.9 amu

Mass Spectral Analysis: MALDI-TOF "Exhibits correct MW" (see attached MS spectrogram)

HPLC Analysis: Peptide Purity: > 93.0% (see attached RP-HPLC chromatogram)

Solubility: 1mg/ml in 10% ACN with 90% water

Appearance: White lyophilized powder

Peptide Content: 84.0%

Counter Ion: Trifluoroacetate

Date of Mfg: 10/01/01

Amino Acid Analysis:

	Calc.	Found	Remark		Calc.	Found	Remark		Calc.	Found	Remark
Asn	1.00	1.00		Glu	1.00	1.10		Thr	1.00	1.00	
Asp	4.00	3.04		Gly	1.00	1.05		Val	2.00	1.94	
Cys	2.00	1.92	*1	Leu	2.00	2.07					

Remarks: Not for human use, research purposes only. *1 Cys-Cys disulfide bonds were partially destroyed during hydrolysis.

Quality Assurance By:

[Signature]
Quality Control Department

Date: 10/01/01

43-0-14 (671) P0912371 MW+H=1068.9

Date: <Unlabeled>.16 27 Sep 10 16:09 Cal: TEST071801G 14 Sep 10 13:17

Krios Compact MALDI 2 V5.2.2; * Linear High Power: 105, P.Ext @ 1000 (bn 115)

%Int. 100% =40 mv/sum= 2036 mv] Profiles 1-50 Smooth Av 5 -Baseline 30

