



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Laboratório de Fisiologia Renal “Prof. Fernando Alzamora”
Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia

**EFEITO DA ANGIOTENSINA (1-7) NA FUNÇÃO
RENAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
INJÚRIA RENAL AGUDA**

ROBERTA DA SILVA FILHA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Belo Horizonte

2015

ROBERTA DA SILVA FILHA

**EFEITO DA ANGIOTENSINA (1-7) NA FUNÇÃO RENAL EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE INJÚRIA RENAL AGUDA**

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

Belo Horizonte

2015

043

Filha, Roberta da Silva.

Efeito da angiotensina (1-7) na função renal em um modelo experimental de injúria renal aguda [manuscrito] / Roberta da Silva Filha. - 2015.

96 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Angiotensina (1-7) - Teses. 2. Função renal - Teses. 3. Paraquat - Teses. 4. Injúria renal - Teses. 5. Fisiologia - Teses. I. Vieira, Maria Aparecida Ribeiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

"EFEITO DA ANGIOTENSINA (1-7) NA FUNÇÃO RENAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE INJÚRIA RENAL AGUDA"

ROBERTA DA SILVA FILHA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 20 de novembro de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. ANDERSON JOSÉ FERREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR.ª. MARIA DA GLÓRIA RODRIGUES MACHADO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE MINAS GERAIS


PROFA. DR.ª. MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 20 de novembro de 2015

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Renal “Professor Fernando Alzamora”, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira, na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

A todos que fazem
da ciência um meio de compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar pessoas especiais em meu caminho.

À professora Maria Aparecida não somente por acreditar em meu potencial, mas por acreditar que seria possível. Agradeço pela orientação, confiança, pelos ensinamentos e pelos “puxões” de orelha. Obrigada por ser mais que uma orientadora, mas também uma mãe preocupada e zeladora com sua ‘cria’.

Aos meus pais, meu ponto de apoio e refúgio. Obrigada por oferecerem-me a oportunidade de estudar, os privando de tantas coisas. Minha eterna admiração e gratidão. Compartilho com vocês mais uma etapa vencida.

Às minhas irmãs, Andreza, Fernanda e Elaine que sempre estiveram por perto e foram meu incentivo constante. Obrigada pelo apoio e enorme amor dispensado. Vocês fazem parte dessa conquista.

Ao grupo Alzamora: vocês são mais que colegas de laboratório, são verdadeiros anjos e amigos. A caminhada foi mais divertida e de constante aprendizado com vocês. Esdras com sua enorme calma e palavras de conforto; Tati sempre sincera e buscando soluções para todos os problemas; Ledinha sempre sábia e pronta a ajudar; Mari com sua doçura e disposição; André para sempre o “aspirante”.

Ao amigo e eterno professor Roberto Lautner, por ser exemplo de um ótimo profissional. Obrigada pelo ensinamento, incentivo e apoio.

À Juliana Gregório, pela companhia no almoço e pelas ótimas conversas. Obrigada por sempre despertar meu melhor e o desejo em continuar frente às dificuldades.

Aos professores Robson Augusto Souza dos Santos, Virgínia Lemos e Marcelo Vidigal Caliari, pela contribuição na execução desse trabalho.

À professora Maria da Glória Rodrigues Machado, sempre solícita e disposta. Obrigada por seu fundamental auxílio ao projeto.

Ao José Roberto da Silva, vulgo Zezé, técnico do Laboratório de Hipertensão, pela sua disponibilidade e gentil maneira em ajudar.

À Kátia, funcionária da limpeza, pela boa conversa, animação e bom trabalho desempenhado.

À amiga Graziella pelas orações e apoio constante.

E a todos os outros amigos e familiares que sempre torceram pelas minhas conquistas.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O paraquat (PQ), um potente herbicida, é altamente tóxico e está associado à elevada mortalidade durante exposição humana e à danos significativos aos órgãos. Evidências indicam que o PQ seja um agente nefrotóxico responsável por lesões progressivas. Contudo, poucos estudos tem tido como foco os efeitos agudos do herbicida sobre a função e estrutura renais. O objetivo do presente estudo foi analisar as alterações estruturais e funcionais e o efeito da angiotensina (1-7) (Ang (1-7)) sobre os danos renais induzidos pelo PQ. Ratos Wistar machos (230 - 300 g) foram divididos em 8 grupos: os grupos NaCl (CTL) e NaCl - Ang (1-7) receberam NaCl 0,9% por via intraperitoneal (ip) e os grupos PQ e PQ - Ang (1-7) receberam PQ (20 mg/kg, ip). Quatro horas após a injeção de PQ, os grupos NaCl - Ang (1-7) e PQ - Ang (1-7) receberam Ang (1-7) (10 e 50 µg/kg, via intragástrica, ig). Após 24 h de exposição ao paraquat, os animais foram anestesiados e, amostras de sangue e urina foram coletadas para análise de função renal e os rins foram removidos para análise histológica, quantificação indireta de neutrófilos, macrófagos e peroxidação lipídica. Os resultados obtidos mostraram que o PQ afetou parâmetros renais, aumentando a creatinina sérica (mg/dl) (de $0,27 \pm 0,02$, n = 7, CTL, para $0,48 \pm 0,06$, n = 10), o que refletiu em uma queda do ritmo de filtração glomerular (Litros/24h) (de $2,05 \pm 0,16$, n = 7, CTL, para $0,96 \pm 0,11$, n = 10), e aumentou as frações de excreção (%) de Na⁺ (de $0,25 \pm 0,03$, n = 7, CTL, para $0,97 \pm 0,14$, n = 7) e de K⁺ (de $37,1 \pm 1,1$, n = 7, CTL, para $103,6 \pm 29,8$, n = 10). O fluxo urinário (Litros/24h) e a proteinúria (mg/24h) também foram aumentados pelo PQ (de $0,006 \pm 0,000$, n = 7, CTL, para $0,014 \pm 0,001$, n = 10, e de $1,35 \pm 0,21$, n = 7, CTL, para $7,58 \pm 0,70$, n = 10, respectivamente). Além disso, o PQ elevou tanto a excreção urinária da enzima gama GT (U/L) (de $10,1 \pm 1,8$, n = 7, CTL, para $107,2 \pm 25,4$, n = 10), como a concentração renal de hidroperóxidos lipídicos (µM) (de $0,48 \pm 0,04$, n = 6, CTL, para $3,52 \pm 0,39$, n = 7). Nenhuma ação benéfica da Ang (1-7) foi observada sobre a maioria dos danos renais investigados, exceto pela atenuação da excreção urinária da enzima gama GT (grupo PQ, $107,2 \pm 25,4$, n = 10 vs grupo PQ - Ang (1-7)10, $6,4 \pm 2,7$ U/L, n = 7), e uma diminuição na concentração de peróxidos de lípideo (grupo PQ, $3,52 \pm 0,39$, n = 7 vs grupo PQ - Ang (1-7)50, $2,13 \pm 0,08$ µM, n = 7) no tecido renal, o que sugere um efeito protetor da Ang (1-7) contra a lesão renal produzida pelo PQ.

Palavras-chave: Paraquat; Angiotensina (1-7); Função renal; Injúria renal.

ABSTRACT

Paraquat (PQ), a potent herbicide, due to its high toxicity has been associated to high mortality levels after human exposure and to significant organ damages. Some evidences indicate that PQ is a nephrotoxic agent which may be responsible for progressive renal lesions. However, few studies have investigated the acute effects of the herbicide on renal function and structure. The aim of this study was to evaluate the structural and functional changes and the effect of angiotensin (1-7) (Ang (1-7)) on the renal damage induced by PQ. Male Wistar rats (230 - 300 g) were divided into 8 groups: groups NaCl (CTL) and NaCl - Ang (1-7) received 0,9% NaCl through intraperitoneal route (ip) and groups PQ and PQ - Ang (1-7) received PQ (20 mg/kg, ip). Four hours after injection of PQ, groups NaCl - Ang (1-7) and PQ - Ang (1-7) received Ang (1-7) (10 and 50 μ g/kg, intragastrically, ig). After 24 h of PQ exposure, animals were anesthetized and blood and urine samples were collected for analysis of renal function and kidney were removed for histological analysis and indirect quantification of neutrophils, macrophages and lipid peroxidation. Our results showed that PQ affected renal parameters under study by increasing serum creatinine (mg/dl) (from 0.27 ± 0.02 , n = 7, CTL, to 0.48 ± 0.06 , n = 10), which reflected in a decrease in the glomerular filtration rate (Liters/24h) (from 2.05 ± 0.16 , n = 7, CTL, to 0.96 ± 0.11 , n = 10), and elevated fractional excretion (%) of Na^+ (from 0.25 ± 0.03 , n = 7, CTL, to 0.97 ± 0.14 , n = 7) and K^+ (from 37.1 ± 1.1 , n = 7, CTL, to 103.6 ± 29.8 , n = 10). Urine flow (Liters/24h) and proteinuria (mg/24h) were also increased by PQ (from 0.006 ± 0.000 , n = 7, CTL, to 0.014 ± 0.001 , n = 10, and from 1.35 ± 0.21 , n = 7, CTL, to 7.58 ± 0.70 , n = 10, respectively). In addition, PQ increased the urine excretion of renal gamma GT enzyme (U/L) (from 10.1 ± 1.8 , n = 7, CTL, to 107.2 ± 25.4 , n = 10), and renal concentration of lipid hydroperoxides (μ M) (from 0.48 ± 0.04 , n = 6, CTL, to 3.52 ± 0.39 , n = 7). No beneficial effect of Ang (1-7) was detected on the major renal damages under investigation, exception for the attenuation of urinary excretion of the enzyme gamma GT (group PQ, 107.2 ± 25.4 , n = 10 vs group PQ - Ang (1-7)₁₀, 6.4 ± 2.7 U/L, n = 7), and for a decrease in renal lipid peroxide concentration (group PQ, 3.52 ± 0.39 , n = 7 vs group PQ - Ang (1-7)₅₀, 2.13 ± 0.08 μ M, n = 7). The data suggest an Ang (1-7) protective effect on the renal damages induced by PQ.

Keywords: Paraquat; Angiotensin (1-7); Renal function; Renal injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura molecular do PQ	2
Figura 2: Mecanismo de ação do PQ	4
Figura 3: Representação esquemática da cascata formadora dos peptídeos angiotensinérgicos e ações renais dos componentes do SRA.....	9
Figura 4: Representação esquemática do papel do eixo ECA2 - Ang (1-7) - Mas no tecido renal	12
Figura 5: Tabela representativa da curva de sobrevida (%)	16
Figura 6: Fotografia da gaiola metabólica	21
Figura 7: Sumário do protocolo experimental	21
Figura 8: Efeito de diferentes dose de PQ sobre a sobrevida de ratos	31
Figura 9: Diferença dos pesos corporais antes e 24 h pós-administração de PQ	32
Figura 10: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre FU, ingestão de água, BH em ratos	35
Figura 11: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a creatinina plasmática em ratos	37
Figura 12: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre FU, RFG, FE _{H2O} em ratos	38
Figura 13: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a proteinúria em ratos	40
Figura 14: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a FE _{Na} ⁺ e FE _K ⁺	41
Figura 15: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a excreção urinária da enzima gama GT em ratos	42
Figura 16: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre o C _{osm} e C _{H2O} em ratos	43
Figura 17: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a atividade da NAG no tecido renal de ratos	45
Figura 18: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a concentração renal de hidroperóxido em ratos	46
Figura 19: Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre o aspecto morfológico do tecido renal de ratos	47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Sumário dos 8 grupos experimentais	19
Quadro 2A: Dosagem de proteína na urina lida em espectrofotômetro.....	25
Quadro 2B: Dosagem de proteína na urina lida em leitora de Elisa.....	25
Quadro 3A: Curva padrão para a enzima gama GT lida em leitora de Elisa	27
Quadro 3B: Dosagem da enzima gama GT na urina lida em leitora de Elisa,	27
Tabela 1: Peso absoluto dos rins e pulmão esquerdo em ratos normais e expostos ao PQ	34
Quadro 4: Sumário de trabalhos da literatura usando diferentes doses e modelos experimentais para avaliação do efeito do paraquat sobre a função renal	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang I: angiotensina I

Ang II: angiotensina II

Ang (1-7): angiotensina (1-7)

C_{H_2O} : clearance de água livre

C_{osm} : clearance osmolar

CTL: controle

DMSO: dimetil sulfóxido

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECA 2: enzima conversora de angiotensina 2

EROs: espécies reativas de oxigênio

Fe^{2+} : íon ferroso

Fe^{3+} : íon férrico

FE_{Na}^+ : fração de excreção de sódio

FE_K^+ : fração de excreção de potássio

FE_{H_2O} : fração de excreção de água

FOX: xilenol orange

FPR: fluxo plasmático renal

FSR: fluxo sanguíneo renal

GGT: gama glutamil transferase

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio

H_2SO_4 : ácido sulfúrico

HP β CB: hidroxipropil- β -ciclodextrina

HP β CB Ang (1-7): hidroxipropil- β -ciclodextrina + Angiotensina (1-7)

IL- interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase

IRA: injúria renal aguda

K⁺: potássio

LPO: peroxidação lipídica

MPO: enzima mieloperoxidase

Na⁺: sódio

NaCl: cloreto de sódio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Na₂EDTA: ácido etilenodiamino-tetra-acético

NF-κB: fator nuclear Kappa B

NAG: enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase

Na₂HPO₄: fosfato diácido de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

Na₂PO₄: fosfato trissódico

Na₃PO₄: fosfato de sódio

O⁻²: radical superóxido

OH⁻: radical hidroxil

PAH: ácido para-amino-hipúrico

PBS: salina tamponada com fosfato

PCP: prolil-carboxipeptidase

PEP: prolil-endorpeptidase

PQ: paraquat

RFG: ritmo de filtração glomerular

SNC: sistema nervoso central

SRA: sistema renina-angiotensina

TMB: 3,3' – 5,5' – tetrametilbenzidina

TNF-α: fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Paraquat	1
1.1.1 <i>Ações gerais do paraquat</i>	2
1.1.2 <i>Mecanismos de toxicidade do paraquat</i>	3
1.1.3 <i>Ações do paraquat em diferentes órgãos</i>	5
1.1.4 <i>Paraquat e função renal</i>	6
1.2 Paraquat e o Sistema renina-angiotensina	8
1.3 Angiotensina (1-7) e fisiologia renal	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 METODOLOGIA	15
3.1 Animais	15
3.2 Grupos experimentais	15
3.2.1 <i>Avaliação do efeito do paraquat sobre a sobrevivência dos animais</i>	15
3.2.2 <i>Possível efeito terapêutico da angiotensina (1-7) sobre os danos renais causados pela intoxicação aguda pelo paraquat</i>	17
3.2.3 <i>Coleta de amostras e tecidos</i>	19
3.3 Parâmetros gerais avaliados	20
3.4 Procedimentos analíticos para avaliação da função renal	20
3.4.1 <i>Dosagem de creatinina</i>	20
3.4.2 <i>Dosagem de sódio e potássio</i>	23
3.4.3 <i>Determinação das osmolalidades plasmática e urinária</i>	24
3.4.4 <i>Dosagem de proteína na urina</i>	24
3.4.5 <i>Gama glutamil transferase urinária</i>	26
3.5 Quantificação do acúmulo de neutrófilos e macrófagos no tecido renal	26
3.5.1 <i>Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	28
3.5.2 <i>Medida da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)</i>	28
3.6 Mensuração da peroxidação lipídica	29

3.7 Morfologia renal	29
3.8 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Curva de sobrevida	31
4.2 Parâmetros gerais	32
4.2.1 <i>Peso corporal</i>	32
4.2.2 <i>Peso dos rins e pulmões</i>	32
4.2.3 <i>Fluxo urinário, ingestão de água e balanço hídrico</i>	33
4.3 Parâmetros de função renal	36
4.3.1 <i>Creatinina sérica</i>	36
4.3.2 <i>Ritmo de filtração glomerular e fração de excreção de água</i>	36
4.3.3 <i>Proteinúria</i>	39
4.3.4 <i>Excreção de sódio e potássio</i>	39
4.3.5 <i>Excreção urinária da enzima gama glutamiltransferase</i>	41
4.3.6 <i>“Clearance” osmolar e “clearance” de água livre</i>	42
4.4 Processo inflamatório renal	43
4.4.1 <i>Atividade da mieloperoxidase renal</i>	43
4.4.2 <i>Atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase</i>	44
4.4.3 <i>Peroxidação lipídica</i>	44
4.5 Análise da morfologia renal	46
5 DISCUSSÃO	48
5.1 Paraquat versus curva de sobrevida	48
5.2 Efeito do paraquat sobre o peso corporal, peso dos rins e pulmões e ingestão de água	50
5.3 Avaliação da função renal	51
5.4 Avaliação dos mecanismos envolvidos na toxicidade do paraquat	54
5.5 Avaliação do tratamento com angiotensina (1-7) dos danos renais causados pelo paraquat	56
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Paraquat

O paraquat (PQ) (dicloreto de 1,1'- dimetil - 4,4'- bipyridínio) é um herbicida amplamente usado em vários países (Roberts *et al.*, 2011) para controle de ervas daninhas, principalmente, na agricultura e indústrias (Duarte, 2006). Sintetizado pela primeira vez em 1882 e empregado como herbicida em 1955, possui características ambientais favoráveis (Yu *et al.*, 2014) devido ao seu rápido efeito e desativação uma vez em contato com o solo (Li *et al.*, 2011) e baixa toxicidade ambiental (Pavan, 2013), embora esteja relacionado a altos índices de intoxicações acidentais e intencionais (Schmitt *et al.*, 2006).

Os primeiros casos de morte acidentais por intoxicação aguda pelo PQ ocorreram em 1964, os quais foram relatados em 1966 (Schmitt *et al.*, 2006) sendo, a insuficiência respiratória, a principal causa (Oreopoulos *et al.*, 1968).

Ao longo do tempo, o PQ vem sendo associado a altas taxas de letalidade durante exposição humana, devido à ingestão intencional ou exposição ocupacional podendo, uma única dose de 30 mg/kg, ser fatal (Yu *et al.*, 2014), embora a dose tóxica não tenha ainda sido estabelecida (Santos *et al.*, 2012).

Comercializado como Gramoxone® e disponível em solução a 20% (Senanayake *et al.*, 1993), o PQ é considerado efetivo na agricultura em termos de custos e ação sobre o solo (Yu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2010), uma vez que representa um composto de baixa toxicidade ambiental (Pavan, 2013) consequente à adsorção e desativação rápidas quando em contato com o solo (Li *et al.*, 2011).

Apresenta-se como um poderoso composto bipyridilo de contato não seletivo, livremente solúvel em água, moderadamente solúvel em álcoois inferiores e insolúvel em hidrocarboneto não volátil. Usualmente sintetizado como um sal dicloreto, é um sólido cristalino higroscópico, incolor, cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$ e peso molecular de 257,25 (Chan *et al.*, 1998) com poder eficaz de redução ao estado de cátion pela perda de um único elétron (Schmitt *et al.*, 2006) (Fig. 1).

Inúmeros países têm banido ou restringido a comercialização do PQ devido aos riscos à vida humana (Yu *et al.*, 2014). No Brasil, este é registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e tem sua venda autorizada principalmente por constituir uma ferramenta essencial para uso na agricultura sustentável do país.

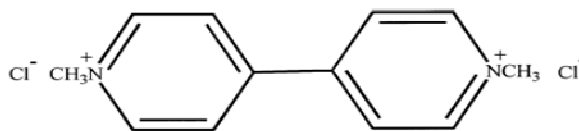


Figura 1. Estrutura molecular do PQ. Fonte: Chan *et al.*, 1998.

Estima-se que a intoxicação por este herbicida possa acarretar uma taxa de mortalidade entre 60 e 80% (Weng *et al.*, 2013) em um período de 24 a 72 h (Roberts *et al.*, 2011) tornando-se, portanto, um problema de saúde pública (Gil *et al.*, 2014).

1.1.1 Ações gerais do paraquat

As características clínicas da intoxicação aguda pelo PQ são, em grande parte, devido a efeitos intracelulares (Gawarammana *et al.*, 2011) e dependentes da via de exposição (Yu *et al.*, 2014), dose ingerida (Sandhu *et al.*, 2003), alteração da função renal (Kang *et al.*, 2009) e tratamento proposto (Hart *et al.*, 1984).

O PQ é rapidamente, mas fracamente, absorvido pelo trato gastrointestinal. Somente 5 - 15% atingem a corrente sanguínea com pico plasmático em torno de 2 - 6 h (Wunnapuk *et al.*, 2014), porém essa absorção é suficiente para iniciar uma potencial e grave intoxicação (Bertram *et al.*, 2013). Por via percutânea, a toxicidade sistêmica é improvável, mas substancialmente elevada se a pele estiver lesada (Tabak *et al.*, 1990).

As estratégias de tratamento baseiam-se na prevenção da absorção, rápida excreção do PQ absorvido e impedimento ou minimização dos danos celulares e teciduais (Serra *et al.*, 2003). A eliminação extracorpórea (Hong *et al.*, 2003), lavagem gástrica e diurese forçada (Afzali & Gholyaf, 2008) destacam-se como métodos de eficácia controversa (Sandhu *et al.*, 2003) e o uso recente de substâncias com ação antioxidante (Zhao *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2014; Yeh *et al.*, 2006) visa reverter o quadro toxicológico instalado.

Este herbicida não se liga às proteínas plasmáticas (Ferguson, 1971) pelo alto volume de distribuição (1 - 2 litros/kg), exibindo uma meia-vida de distribuição, em média, de 5 h e de eliminação correspondente a 84 h (Houzé *et al.*, 1990).

Serra *et al.* (2003) relataram que após a ingestão, o PQ distribui-se por todo o organismo através da circulação sanguínea, expondo os tecidos mais vascularizados a uma fixação rápida e precoce. Os pulmões, por sua vez, são os maiores alvos de fixação (4 h após a ingestão) (Serra *et al.*, 2003), coerente com a disponibilidade de oxigênio que reage com o

herbicida produzindo radicais livres e, assim, provocando uma injúria pulmonar associada à destruição do epitélio alveolar e progressiva inflamação e proliferação de tecidos fibrosos (Chen *et al.*, 2010).

1.1.2 Mecanismos de toxicidade do paraquat

Ainda que os mecanismos específicos de toxicidade do PQ não tenham sido completamente elucidados, pressupõe-se que haja a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) com subsequente “stress” oxidativo e consequentes danos teciduais (Yao *et al.*, 2015) e reações inflamatórias (Aires *et al.*, 2013).

A toxicidade celular induzida pelo PQ depende da presença de óxido-redutases capazes de reduzi-lo a um radical monocátion (PQ^+) por uma transferência de elétrons (Jandaae *et al.*, 2015). Sendo assim, o PQ é metabolizado por vários sistemas enzimáticos, incluindo NADPH-citocromo P450 redutase, óxido nítrico sintase (iNOS) e NADH desidrogenase (Li *et al.*, 2011).

Sob condições aeróbicas, o monocátion é rapidamente reoxidado a um radical dicátion (PQ^{+2}) gerando abundantemente radicais superóxido (Jiao *et al.*, 2012, Cocheme *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2003) que iniciam uma cascata de reações que levam à produção de EROs, principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\cdot) (Li *et al.*, 2011) (Fig. 2).

Os efeitos tóxicos do PQ estão envolvidos em um ciclo redox, em que, a geração de ânions superóxidos (O_2^-) (Sandhu *et al.*, 2003) podem estimular a peroxidação lipídica das membranas celulares (Móran *et al.*, 2010) e a depleção de NADPH, essencial para o funcionamento celular normal (Mainwaring *et al.*, 2006).

Dentre as reações, o H_2O_2 pode ser formado por dismutação do superóxido por ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Na presença do íon ferro, o H_2O_2 pode reagir com O_2^- e gerar o radical OH^\cdot (reação de Fenton) (Lheureux *et al.*, 1995), que possui um elevado potencial de oxirredução e toxicidade (Aguiar *et al.*, 2007) e tem sido associado aos danos teciduais por peroxidação dos lipídeos (Kim *et al.*, 2011). É válido destacar que, as EROs, assim como os radicais O_2^- , OH^\cdot e H_2O_2 , são produzidos também sob condições fisiológicas normais, como no crescimento e proliferação celular (Wysocki *et al.*, 2014), processos inflamatórios e apoptose (Silva & Jasiulionis, 2014).

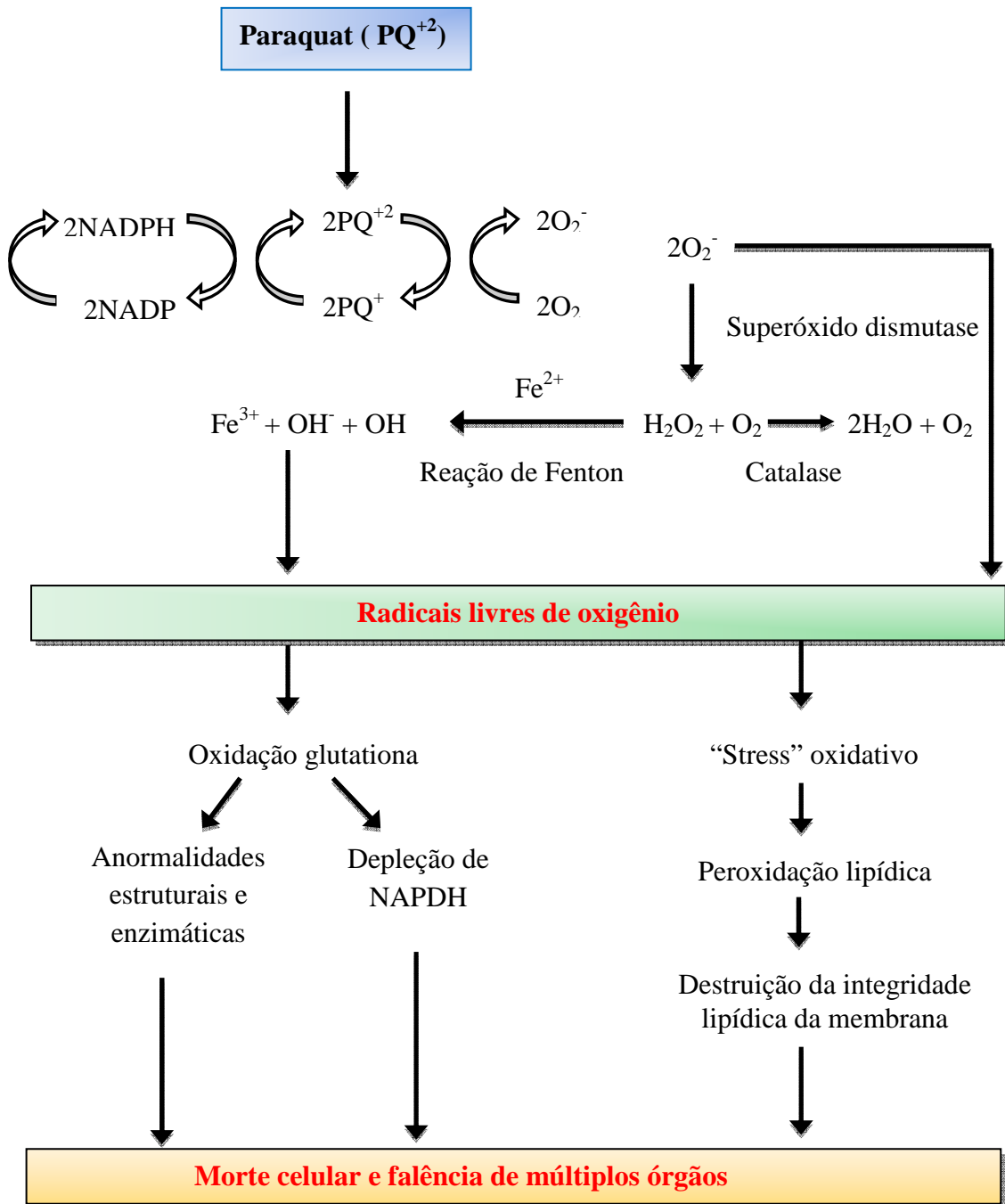


Figura 2. Mecanismo de ação do PQ. NADP: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida; O_2^- : ânion superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; Fe^{2+} : íon ferroso; Fe^{3+} : íon férrico; OH^- : radical hidroxil; OH^- : íon hidróxido; O_2 : oxigênio molecular. Fonte: Adaptado de Syngenta, 2015.

No entanto, a interação do PQ com diferentes sistemas enzimáticos e complexos férricos resulta em um aumento na produção de radicais de oxigênio (Fukushima *et al.*, 2002) que induzem modificações celulares (Tan *et al.*, 2015), medeiam a transdução de sinais na inflamação (Gil *et al.*, 2014) e exercem efeitos pró-oxidantes (Ranjbar, 2014).

Em razão da alta letalidade, os estudos têm se concentrado na modificação da toxicocinética do herbicida de maneira que haja diminuição da sua absorção ou acelere sua eliminação (Yu *et al.*, 2014). Cabe ressaltar que não há um antídoto específico e a eficácia terapêutica permanece incerta (Weng *et al.*, 2013).

Entretanto, o emprego de agentes com propriedades antioxidantes vem sendo amplamente estudado, com o intuito de investigar o seu possível efeito protetor diante dos danos teciduais induzidos pelo PQ (Han *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015; Blanco-Ayala *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2014; Yeh *et al.*, 2006).

1.1.3 Ações do paraquat em diferentes órgãos

O PQ após ser absorvido, independente da via de exposição (Ranjbar, 2014), tende a se acumular em órgãos como o pulmão, fígado, cérebro, coração e rins (Delirrad *et al.*, 2015) exercendo efeitos tóxicos agudos (Gawarammana *et al.*, 2011). Estudos sugerem que o “stress” oxidativo (Takizawa *et al.*, 2007) e a inflamação induzidos pelo PQ (Dinis-Oliveira *et al.*, 2006a) são os principais responsáveis pelas lesões teciduais.

No pulmão, a exposição ao herbicida resulta em danos agudos e destruição de células epiteliais alveolares, edema pulmonar e infiltração de células inflamatórias em poucos dias, seguidos de uma fibrose pulmonar caracterizada por infiltração de miofibroblastos nos espaços alveolares e septos com diferenciação em fibroblastos e produção de colágeno (Li *et al.*, 2015a).

A vasculatura pulmonar é altamente afetada na injúria pulmonar aguda, aumentando a permeabilidade capilar e a disfunção de células endoteliais (Zocrato *et al.*, 2010) provenientes do aumento de células polimorfonucleares (Aires *et al.*, 2013) e citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , que desempenham papéis importantes na patogênese da lesão (Xiangdong *et al.*, 2011).

Embora o pulmão seja um dos principais órgãos afetados, o PQ pode exercer efeitos tóxicos sobre o fígado que, por sua vez, tem um potencial elevado em gerar EROs e também ser o local em que ocorre a transformação de xenobióticos (Han *et al.*, 2014a). A intoxicação por PQ pode causar insuficiência hepática aguda, evidenciada pela perda de sua integridade estrutural (Chen *et al.*, 2015) exibindo degeneração vacuolar dos hepatócitos e devastação dos vasos sanguíneos (Awadalla, 2012), aumento dos espaços sinusoidais, infiltração de linfócitos e apoptose (Ahmad *et al.*, 2013).

No entanto, os danos hepáticos ocasionados pelo “stress” oxidativo tendem a se caracterizar por uma expressão elevada de TNF- α , iNOS e IL-1 β (Guo *et al.*, 2014), assim como por um aumento da atividade das enzimas SOD e catalase (CAT) no tecido hepático (Han *et al.*, 2014b).

Recentemente, dados da literatura têm associado o contato com os herbicidas a um maior risco em desenvolver doenças neurodegenerativas, tais como o mal de Alzheimer (Chen *et al.*, 2015) o que implica em um aumento do “stress” oxidativo mitocondrial e declínio da cognição (Alural *et al.*, 2015; Hosamani *et al.*, 2014). Já a doença de Parkinson parece estar implicada com danos dos neurônios dopaminérgicos causados pelo herbicida PQ (Narasimhan *et al.*, 2014).

Li *et al.* (2015b) relataram que as lesões ocorridas no sistema nervoso podem manifestar-se como transtornos mentais, letargia, paralisia facial, tremores nas mãos, hidrocefalia e hemorragia cerebral. Estas lesões quanto mais graves, originam um “stress” reticular endoplasmático no tecido cerebral provenientes do “stress” oxidativo, inflamação e apoptose.

Por fim, as lesões cardíacas também são frequentes devido aos eventos cardiogênicos, incluindo arritmias, insuficiência e parada cardíaca (Dong *et al.*, 2013), além de mudanças histopatológicas (Ge *et al.*, 2010).

Portanto, o PQ pode ser caracterizado como uma substância tóxica sistêmica responsável por causar lesões multissistêmicas (Geller, 2014) que afetam a estrutura e função dos órgãos devido ao seu alto poder tóxico.

1.1.4 Paraquat e função renal

Os rins participam ativamente do processo de toxicidade e eliminação do PQ assim como sofrem danos induzidos pela ação direta desse herbicida. Após ser distribuído rapidamente na maioria dos tecidos, encontra-se em grandes concentrações no rim (Awadalla, 2012) e sua permanência está diretamente relacionada com a excreção renal (Prashad *et al.*, 1981) sendo, a velocidade desta, a maior determinante da duração da exposição sistêmica ao PQ (Chen *et al.*, 2007).

O PQ é filtrado nos capilares glomerulares (Bismuth *et al.*, 1990), reabsorvido pelos túbulos proximais (Ferguson, 1971) e uma pequena fração é ativamente secretada pelas células tubulares (Lock, 1979). Não é metabolizado, sendo que 90% do que foi absorvido encontram-se inalterado na via renal, dentro de 12 - 24 h (Jang *et al.*, 2014).

A excreção e secreção renais do PQ foram evidenciadas após administração intravenosa de seguidas doses, em cães, demonstrando que há uma rápida eliminação na urina e o “clearance” renal do herbicida permanece sempre superior ao valor do ritmo de filtração glomerular (RFG) (Hawksworth *et al.*, 1981).

A remoção do herbicida tende a ocorrer de maneira bifásica no rim, iniciada por uma fase precoce rápida seguida de uma fase tardia lenta que pode estar associada a uma redistribuição entre os tecidos e o plasma ou ser causada por uma lesão renal já instalada (Tsatsakis *et al.*, 1996), favorecendo uma maior toxicidade em outros órgãos e, assim, aumentando a veracidade de falência de múltiplos órgãos e morte (Wunnapuk *et al.*, 2014; Seok *et al.*, 2012).

Os efeitos tóxicos do PQ na função renal têm sido mencionados em vários estudos que relatam a ocorrência de danos funcionais e estruturais (Mohamed *et al.*, 2015a; Roberts *et al.*, 2011; Lamfon & Al-Rawi, 2007; Molck & Friis, 1998; Damin *et al.*, 1992), possivelmente, decorrentes do desenvolvimento de uma injúria renal aguda (IRA) (Mohamed *et al.*, 2015b; Xu *et al.*; 2014; Sobha *et al.*, 1989; Oreopoulos *et al.*, 1968). Dados recentes sugerem que a incidência de IRA secundária à exposição ao PQ é de, aproximadamente, 50% (Gil *et al.*; 2014).

Em vista disso, Lock (1979) sugeriu que o PQ poderia causar mudanças na hemodinâmica renal e redução da função renal 24 h após a administração oral, uma vez que houve redução do “clearance” do ácido para-amino-hipúrico (PAH) e da inulina, usados como marcadores do fluxo plasmático renal (FPR) e do RFG, respectivamente. Mais tarde, Chan *et al.* (1997) comprovaram que o PQ provocava redução significativa no RFG em resposta à redução do fluxo sanguíneo renal (FSR) ou devido à falência da função renal em resposta à inalação de 1,6 mg/kg. No entanto, uma dose superior (3,33 mg/kg) não produziu o mesmo efeito, sugerindo que a redução do RFG pode ser independente do efeito do PQ sobre o FSR (Chan *et al.*, 1997).

Cabe ressaltar que o “clearance” do PQ e o volume urinário reduzem significativamente quando ocorre um dano renal (Hawksworth *et al.*, 1981), supostamente, proveniente de mudanças histopatológicas, como perda da borda em escova, degeneração segmentar e necrose das células epiteliais proximais ou de mudanças hemodinâmicas secundárias à hipovolemia, bem como a um efeito nefrotóxico (Chan *et al.*, 1998).

Sendo assim, as mudanças funcionais decorrentes da perda da função renal também são evidenciadas por um aumento da creatinina (Mohamed *et al.*, 2015a) em um período de 12 - 24 h (Roberts *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2009) seguinte à intoxicação aguda. A recente

explicação para esse aumento é embasada em uma maior mobilização de creatina e produção de creatinina em resposta ao “stress” oxidativo induzido pelo PQ (Mohamed *et al.*, 2015a).

Vaziri *et al.* (1979), avaliando a função renal em casos de intoxicação humana, observaram a ocorrência de IRA caracterizada por glicosúria e aumento na excreção fracionada de Na^+ , K^+ e ácido úrico. Uma redução abrupta da função renal resultante de alterações da perfusão renal, filtração glomerular, disfunção tubular (Mehta & Chertow, 2003) e distúrbios na homeostase hidroeletrolítica são características da injúria (Katz *et al.*, 2003).

Assim, de acordo com o exposto, os estudos disponíveis sugerem que os efeitos tóxicos do herbicida levam a uma eventual lesão renal o que, portanto, valida uma investigação mais concisa dos danos induzidos pelo PQ, uma vez que há discrepâncias entre fatores como dose utilizada e tempo de exposição usados nos protocolos experimentais de intoxicação aguda.

1.2 Paraquat e o Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema de grande importância na regulação fisiológica da pressão sanguínea e do equilíbrio hidroeletrolítico através de mecanismos renais e não-renais (Zhong *et al.*, 2015; Wiecek *et al.*, 2003, Reid *et al.*, 1978). O sistema é composto por diferentes peptídeos, as angiotensinas, biologicamente ativos, que apresentam uma multiplicidade de ações biológicas mediadas por distintos subtipos de receptores (Chappell, 2012) (Fig. 3). Um estímulo sistêmico ou local pode induzir a liberação de renina que, por sua vez, promove a hidrólise proteolítica do angiotensinogênio originando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) que, subsequentemente, é convertido ao octapeptídeo angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) e, assim, iniciam suas ações (Yosypiv *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2000a) (Fig. 3).

Sabe-se hoje que outros peptídeos são formados a partir da hidrólise da Ang II, tais como Ang III (Ang (2-8)) que induz natriurese via receptor AT_2 no túbulo proximal; Ang IV (Ang (3-8)), formada nos glomérulos, que aumenta o FSR e diminui o transporte de Na^+ no túbulo proximal e Ang (1-7) que evoca efeitos diuréticos e natriuréticos (Ferrão *et al.*, 2014). A partir da formação de Ang (1-7), pode ocorrer a geração posterior de Ang (3-4), Ang (1-5) e Ang (1-4) como peptídeos intermediários. Outro peptídeo conhecido como angiotensina A (Ang A), está presente no plasma de seres humanos saudáveis e em níveis elevados em pacientes em fase terminal de injúria renal (Ellis *et al.*, 2012; Ferrão *et al.*, 2014) (Fig. 3).

Acredita-se que o SRA possa estar envolvido nos danos teciduais induzidos pela intoxicação pelo PQ, alterando principalmente a expressão de Ang II e a atividade da ECA, embora o mecanismo pelo qual o PQ altera a atividade do sistema permaneça questionável.

Estudos iniciais realizados em 1980, por Hollinger *et al.*, destacaram um aumento linear dose-resposta de ECA no plasma após 4 h da administração intraperitoneal de PQ (20 - 50 mg/kg de peso corporal), retornando ao nível, 24 h mais tarde. Contrariamente, houve uma redução na atividade da ECA pulmonar, secundária à necrose de células endoteliais dos capilares pulmonares (Hollinger *et al.*, 1980). Dados de Chen *et al.* (2005) corroboraram a queda na atividade da ECA no pulmão imediatamente após a administração de PQ, contribuindo para uma diminuição dos níveis de Ang II. Esse decréscimo na atividade da ECA pode ser usado como um marcador de injúria pulmonar, sendo as alterações no nível da enzima um indicativo de disfunção nas células endoteliais (Suntres & Shek, 1996a, Suntres & Shek, 1996b).

Mais tarde, em outro estudo, verificou-se que a expressão e atividade da ECA não alteram após exposição ao PQ, mas há um aumento na expressão de angiotensinogênio dose-dependente. Estes resultados sugerem que o angiotensinogênio serve como substrato para a geração de Ang II nos fibroblastos de pulmão (Lang *et al.*, 2010), uma vez que a Ang II é descrita como um importante regulador da resposta fibrótica no tecido lesionado (Marshall *et al.*, 2004), induzindo a proliferação de fibroblastos pela ativação do receptor AT₁ (Mohammadi-Karakania *et al.*, 2006).

Guo *et al.* (2015) confirmaram a participação da Ang II e receptores de angiotensina na patogênese da fibrose pulmonar, evidenciada pela lesão de células endoteliais e epiteliais, influxo de células inflamatórias e produção de mediadores químicos que conduzem à ativação de fibroblastos (Franklin, 1997).

Em suma, os estudos sugerem que as alterações na sinalização dos componentes do SRA podem estar envolvidos no desenvolvimento de danos pulmonares induzidos pelo PQ (Tung *et al.*, 2010) e que o uso de inibidores de ECA, como o lisinopril, e de antagonistas do receptor AT₁, como o losartan, pode apresentar um efeito antifibrótico (Mohammadi-Karakania *et al.*, 2006) e atenuar a injúria pulmonar (Guo *et al.*, 2015), respectivamente.

Existe também a possibilidade de que o PQ interfira seletivamente no efeito dipsogênico mediado pelo SRA no sistema nervoso central (SNC), consequente às ações neurotóxicas centrais causadas pelo herbicida, ao penetrar na barreira hematoencefálica, ocasionando danos cerebrais (Müller-Ribeiro *et al.*, 2010).

Entretanto, estudos são necessários para avaliar o papel do PQ e determinar sua relação com os componentes do SRA, visto que, este atua como um sistema tecidual cujos componentes protéicos e peptídicos são expressos em todos os órgãos e cujas ações são implicadas em numerosos eventos fisiológicos que influenciam as funções renais, neuronais, cardíacas, pancreáticas, vasculares, cognitivas, inflamatórias e reprodutivas (Chappell, 2012).

1.3 Angiotensina (1-7) e fisiologia renal

A Ang (1-7) é um produto biologicamente ativo pertencente a cascata do SRA (Nadu *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2004). Formada endogenamente no rim de várias espécies, encontra-se expressa em níveis teciduais que podem ser comparáveis ao do peptídeo Ang II (Chappell, 2012).

O heptapeptídeo Ang (1-7) é expresso nos glomérulos (Velez *et al.*, 2009), túbulos proximais (Wilson *et al.*, 2015), túbulos distais e ductos coletores (Ferrario *et al.*, 2002) e pode ser produzido por diferentes vias enzimáticas sendo, a Ang II, o substrato principal para a síntese desse peptídeo. Sabe-se que a ECA2 possui afinidade 400 vezes menor pela Ang I do que pela Ang II sendo, portanto, a Ang II o principal peptídeo a ser degradado pela ECA2. Indiretamente, a Ang (1-7) pode ser formada a partir da Ang (1-9) após a atuação da ECA2 sobre a Ang I. As enzimas endopeptidase neutra, prolil-carboxipeptidase (PCP) e prolil-endopeptidase (PEP) também estão envolvidas na geração de Ang (1-7) a partir da Ang II ou indiretamente a partir de Ang I (Fraga-Silva *et al.*, 2013; Botelho-Santos *et al.*, 2007) (Fig. 3).

Estudos têm preconizado que o rim não é apenas uma fonte importante para a produção de Ang (1-7), mas também um alvo para a atividade biológica da mesma (Handa, 1999). Cabe ressaltar que a concentração de Ang (1-7) encontra-se seis vezes maior no rim do que na circulação sistêmica (Zhang *et al.*, 2014) e que os níveis intra-renais podem ser regulados de acordo com as necessidades homeostáticas (Pinheiro *et al.*, 2009).

As ações celulares exercidas pela Ang (1-7) são principalmente dependentes da interação com o receptor Mas acoplado à proteína G (Santos *et al.*, 2003) (Fig. 4), sendo em grande parte antagônicas a muitas das ações exibidas pela Ang II (Ferrão *et al.*, 2014; McKinney *et al.*, 2014; Velez *et al.*, 2014; Chappell, 2012, Santos *et al.*, 2000a), as quais incluem vasoconstrição, fibrose, inflamação e efeitos pró-oxidantes (Wilson *et al.*, 2014; Wysocki *et al.*, 2014; Passos-Silva *et al.*, 2013). Dados da literatura ainda mostram que a Ang (1-7) pode apresentar efeito paradoxal, dependendo do modelo experimental e/ou da dose

utilizados (Zhang *et al.*, 2014; Castelo-Branco *et al.*, 2013; Gwathmey *et al.*, 2010; Haulica *et al.*, 2003; Garcia & Garvin *et al.*, 1994).

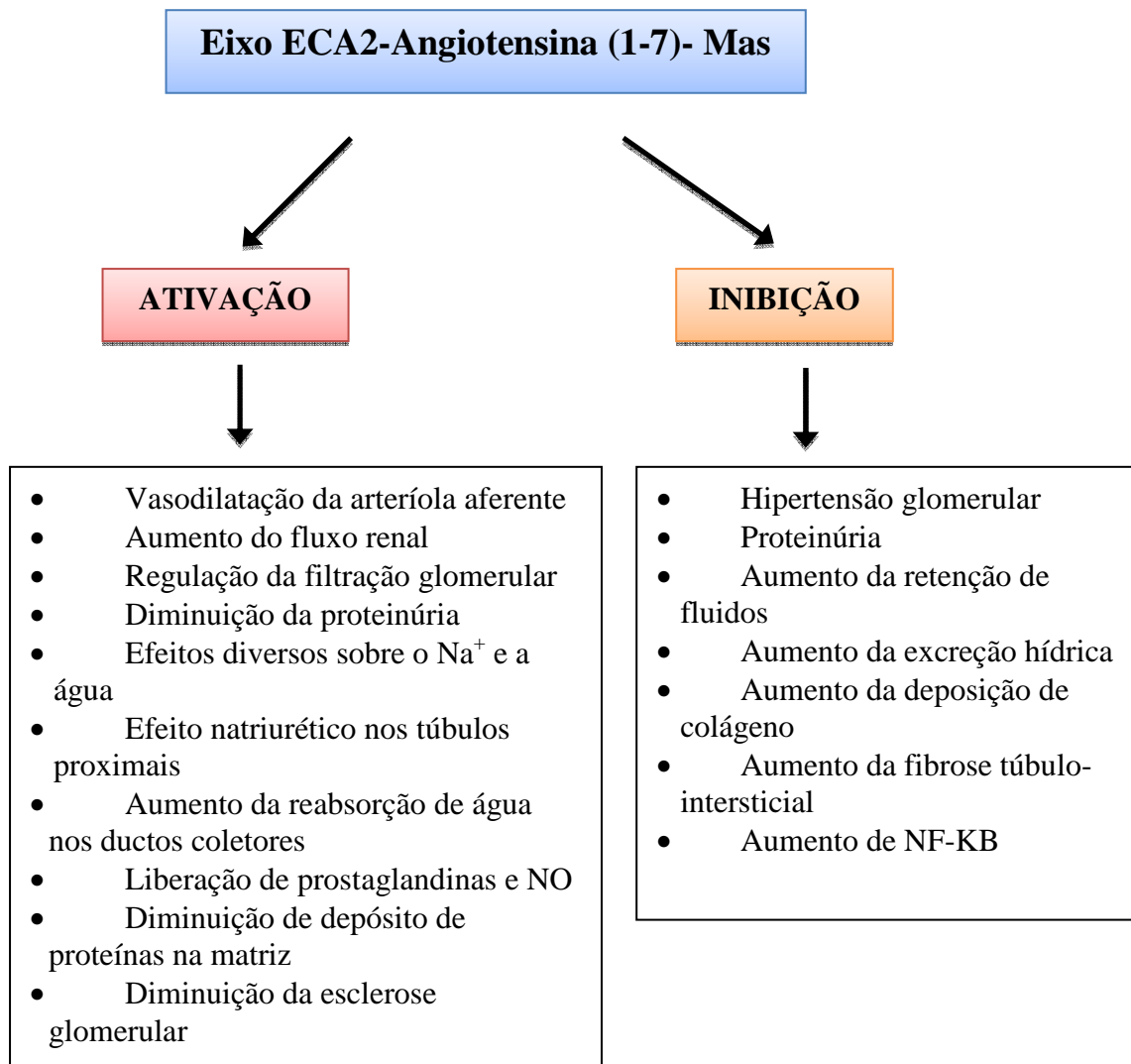


Figura 4. Representação esquemática do papel do eixo ECA2-Ang (1-7)-Mas no tecido renal. NO: óxido nítrico; NF-KB: fator de transcrição kappa B. Fonte: Adaptado de Simões e Silva *et al.*, 2013.

Efetivamente, a influência de Ang (1-7) sobre a função renal baseia-se no estado hidroeletrólítico, na atividade do sistema nervoso simpático renal e no nível de atividade do SRA (Silva *et al.*, 2013; Botelho-Santos *et al.*, 2007). Do mesmo modo, a dose do peptídeo, a via de administração, a duração do tratamento, o modelo de doença (Velez *et al.*, 2014) e o local de ação nos néfrons (Simões e Silva *et al.*, 2013) podem ter interferência.

Bürgelová *et al.* (2005) destacam a importância intrarenal de Ang (1-7) na regulação hemodinâmica renal e a sua atuação como um modulador das ações da Ang II. Existem evidências que a Ang (1-7) participa do balanço hidroeletrólítico por causar natriurese e diurese (Mansoori *et al.*, 2014; Ferrario & Varagic, 2010) influenciando, sobretudo, a excreção de água e eletrólitos (Santos *et al.*, 1996; Hilchey & Bell-Quilley, 1995; Dellipizzi *et al.*, 1994).

No entanto, acredita-se que Ang (1-7) possua também um papel relevante e eficaz no controle de distribuição do fluxo sanguíneo (Botelho-Santos *et al.*, 2007) mediante a atuação sobre o tônus arteriolar com conseqüente vasodilatação das arteríolas aferentes (Ren *et al.*, 2002) e aumento do FSR (Sampaio *et al.*, 2003).

Contudo, a Ang (1-7) exibe ações renoprotetoras que parecem estar envolvidas na modulação do “stress” oxidativo, inflamação e fibrose (Wysocki *et al.*, 2014). A redução do dano glomerular (Shi *et al.*, 2015; Papinska *et al.*, 2015) e de EROs (Kim *et al.*, 2012) no tecido renal, assim como a atenuação da migração de leucócitos, liberação de citocinas e vias fibrogênicas (Silva *et al.*, 2013) fundamentam esses efeitos.

Em face da gravidade do quadro de intoxicação pelo PQ, este tem sido bastante utilizado como modelo experimental. Isto porque o PQ produz efeitos rápidos, é de administração simples e há boa reprodutibilidade de dados (Han *et al.*, 2015). As referências na literatura, sobre os efeitos do PQ, são esparsas e muitas vezes oriundas da intoxicação humana, acidental ou intencional, o que implica na inexistência de informações prévias sobre o paciente com relação, por exemplo, à precisão da dose e o momento utilizados. Assim, é de relevância considerável explorar de forma mais concisa, o efeito do PQ sobre o conjunto de parâmetros renais a um só momento após a intoxicação (24 h). Havendo um melhor entendimento sobre tais parâmetros afetados, pode-se aprimorar e ampliar, futuramente, os métodos utilizados no tratamento da intoxicação pelo PQ.

Sendo a Ang (1-7) um potencial agente terapêutico nas doenças renais, neste estudo, uma das propostas foi investigar o efeito, se existente, desse heptapeptídeo sobre a função renal em ratos submetidos à intoxicação pelo herbicida PQ, esclarecendo que, nenhum trabalho associando um possível efeito da Ang (1-7) com os danos renais causados pelo PQ foi encontrado na literatura disponível.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do PQ sobre a função e estrutura renais, bem como investigar uma possível ação terapêutica da Ang (1-7) sobre tais efeitos.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar as alterações de função renal decorrentes da toxicidade do PQ. Parâmetros avaliados: filtração glomerular, reabsorção tubular de água e eletrólitos (sódio/potássio), excreção urinária da enzima gama glutamil transferase e proteinúria;
- Investigar um possível efeito da Ang (1-7) sobre as alterações de função renal induzidas pelo PQ;
- Avaliar a resposta inflamatória renal nos animais intoxicados por PQ e após o tratamento com Ang (1-7) através da pesquisa indireta, no tecido renal, do acúmulo de neutrófilos (atividade da enzima mieloperoxidase) e de infiltrado de células mononucleares (atividade da enzima lisossomal N-acetil- β -D-glicosaminidase);
- Analisar o “stress” oxidativo no tecido renal decorrente da toxicidade induzida pelo PQ e após o tratamento com Ang (1-7) através da medida, no tecido renal, da peroxidação lipídica (medida do peróxido renal);
- Avaliar o aspecto morfológico renal em resposta ao PQ e após o tratamento com Ang (1-7).

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados ratos Wistar, machos, procedentes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com peso variando entre 230 e 300 g. Desde o nascimento, os animais foram mantidos sob um ciclo de claridade - escuridão sendo, 14 h de claridade e 10 h de escuridão, temperatura ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$), recebendo água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 85/2015).

3.2 Grupos experimentais

3.2.1 Avaliação do efeito do paraquat sobre a sobrevivência dos animais

A taxa de sobrevivência de ratos tratados com PQ foi avaliada comparando 4 grupos experimentais: i) NaCl 0,9% (0,2 ml/100 g de peso corporal, via intraperitoneal (ip, n = 7), ii) PQ 10 mg/kg (ip, n = 5), iii) PQ 20 mg/kg (ip, n = 6) e iv) PQ 40 mg/kg (ip, n = 10). Após a injeção do NaCl 0,9% ou do PQ, a ocorrência de óbito dos ratos foi verificada de 6 em 6 h durante as primeiras 12 h e, em seguida, a cada 24 h, por um período de 4 dias (96 h). A dose de PQ usada para a intoxicação aguda foi aquela que causou sinais de intoxicação (piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular, diminuição da movimentação e falta de apetite) e que também provocou menor mortalidade 24 h após a administração do herbicida. A análise foi feita através do estimador Kaplan-Meier (Kaplan; Meier, 1958) seguida dos testes estatísticos de log-rank e Wilcoxon-Gehan, que avaliam a equivalência estatística entre as curvas e a influência das doses na taxa de risco de morte. A Figura 5 mostra uma tabela para facilitar a compreensão do modo como as curvas foram obtidas. Os valores de X correspondem ao tempo, horas em nosso estudo, e os valores de Y estão inseridos em quatro colunas que definem os grupos NaCl (1ª coluna) e tratados com PQ (2ª a 4ª colunas). Os valores "1" e "0" referem-se ao óbito e a sobrevivência na hora especificada na 1ª coluna, respectivamente. Cabe ressaltar que havendo mais de um óbito em determinado tempo, o mesmo estará duplicado na coluna X de acordo com o número de mortes.

Horas	NaCl	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
X	Y	Y	Y	Y
0	0			
6	0			
12	0			
24	0			
48	0			
72	0			
96	0			
0		0		
6		0		
12		0		
24		0		
48		0		
72		1		
72		1		
96		0		
0			0	
6			0	
12			0	
24			1	
48			1	
48			1	
48			1	
48			1	
72			0	
96			0	
0				0
6				1
6				1
6				1
6				1
12				1
12				1
24				0
48				0
72				0
96				0

Figura 5. Tabela representativa da forma como a curva da taxa de sobrevivência (%) foi obtida. A tabela mostra como os dados devem ser inseridos utilizando programa “Prism”. Os valores de X correspondem ao tempo (h) e os valores de Y estão inseridos em colunas que definem os grupos tratados com PQ. O valor "1" se refere ao óbito na hora especificada, e "0" à sobrevivência dos animais no período determinado.

3.2.2 Possível efeito terapêutico da angiotensina (1-7) sobre os danos renais causados pela intoxicação aguda pelo paraquat

Os ratos foram submetidos a um período de aclimação (4 dias) às gaiolas metabólicas sendo, em seguida, divididos aleatoriamente em 8 grupos experimentais. Os grupos receberam uma única dose de PQ (*Syngenta*, 20 mg/kg, ip) (Tan *et al.*, 2015; Aires *et al.*, 2013; Mainwaring *et al.*, 2006) ou apenas solução de NaCl a 0,9%, também por via ip.

Sabendo-se que o PQ possui forte fixação aos tecidos e que o pico de concentração nos pulmões varia de 4 - 7 h após a sua ingestão (Pavan, 2013; Roberts *et al.*, 2011; Sanhu *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2003; Smith e Heath, 1975), alguns grupos experimentais foram tratados por via intragástrica (ig), 4 h após a administração do PQ ou NaCl 0,9%, com as seguintes substâncias: i) hidropropil- β -ciclodextrina (CD, veículo para Ang (1-7)), ii) composto de Ang (1-7) incluída em CD numa dose que correspondia à dose de 10 μ g/kg de Ang (1-7) (grupo Ang (1-7)₁₀) e iii) composto de Ang (1-7) numa dose que correspondia à dose de 50 μ g/kg de Ang (1-7) (grupo Ang (1-7)₅₀).

- 1) Grupo NaCl (NaCl): os ratos receberam NaCl 0,9% em água deionizada (0,2 ml/100 g de peso corporal, ip);
- 2) Grupo PQ (PQ): os ratos receberam uma única injeção (ip) de PQ (20 mg/kg, 0,2 ml/100g de peso corporal de uma solução a 200 mg/ml diluído 1:20 em NaCl 0,9%, ip);
- 3) Grupo NaCl + CD (NaCl - CD): os ratos receberam NaCl 0,9% (0,2 ml/100 g de peso corporal, ip). Quatro horas após a injeção do NaCl, a cada rato foi administrada CD (76,3 μ g/kg, 0,25 ml/100 g de peso corporal de uma solução a 30,5 μ g/ml em água deionizada, ig). Esta dose correspondia à CD ligada a Ang (1-7) quando se utilizava a dose de 50 μ g/kg de Ang (1-7) pura;
- 4) Grupo NaCl + Ang (1-7)₁₀ μ g/kg (NaCl - Ang (1-7)₁₀): os ratos receberam NaCl 0,9% (0,2 ml/100 g de peso corporal, ip). Quatro horas após a injeção do NaCl, a cada rato foi administrado o complexo CD - Ang (1-7). O volume de 0,25 ml/100 g de peso corporal de uma solução do complexo a 10,1 μ g/ml (86,3 μ g/kg), em água deionizada,

foi administrado por via ig. A dose de 86,3 µg/kg do complexo correspondia a 10 µg/kg de Ang (1-7) pura;

- 5) Grupo NaCl + Ang (1-7)50 µg/kg (NaCl - Ang (1-7)50): os ratos receberam NaCl 0,9% (0,2 ml/100 g de peso corporal, ip). Quatro horas após a injeção do NaCl, os ratos receberam o complexo CD - Ang (1-7). O volume de 0,25 ml/100 g de peso corporal de uma solução do complexo a 52 µg/ml (126,3 µg/kg), em água deionizada, foi administrado por via ig. A dose de 126,3 µg/kg do complexo correspondia a 50 µg/kg de Ang (1-7) pura;
- 6) Grupo PQ + CD (PQ - CD): os ratos receberam PQ (20 mg/kg, 0,2 ml/100g de peso corporal de uma solução a 200 mg/ml diluído 1:20 em NaCl 0,9%, ip). Quatro horas após a injeção do PQ, a cada rato foi administrada CD (76,3 µg/kg, 0,25 ml/100 g de peso corporal de uma solução a 30,5 µg/ml em água deionizada, ig). Esta dose correspondia à CD ligada a Ang (1-7) quando se utilizava a dose de 50 µg/kg de Ang (1-7) pura;
- 7) Grupo PQ + Ang (1-7)10 µg/kg (PQ - Ang (1-7)10): os ratos receberam PQ (20 mg/kg, 0,2 ml/100g de peso corporal de uma solução a 200 mg/ml diluído 1:20 em NaCl 0,9%, ip). Quatro horas após a injeção do PQ, a cada rato foi administrado o complexo CD - Ang (1-7). O volume de 0,25 ml/100 g de peso corporal de uma solução do complexo a 10,1 µg/ml (86,3 µg/kg), em água deionizada, foi administrado por via ig. A dose de 86,3 µg/kg do complexo correspondia a 10 µg/kg de Ang (1-7) pura;
- 8) Grupo PQ + Ang(1-7) 50 µg/kg (PQ - Ang (1-7)50): os ratos receberam PQ (20 mg/kg, 0,2 ml/100g de peso corporal de uma solução a 200 mg/ml diluído 1:20 em NaCl 0,9%, ip). Quatro horas após a injeção do PQ, os ratos receberam o complexo CD - Ang (1-7). O volume de 0,25 ml/100 g de peso corporal de uma solução do complexo a 52 µg/ml (126,3 µg/kg), em água deionizada, foi administrado por via ig. A dose de 126,3 µg/kg do complexo correspondia a 50 µg/kg de Ang (1-7) pura.

O Quadro 1 sumariza os grupos experimentais, bem como o protocolo executado em cada um deles.

Quadro 1. Sumário dos 8 grupos experimentais usados neste projeto.

Grupo experimental	Nº de ratos/grupo	Procedimento experimental
NaCl	7	Os ratos receberam uma injeção única de NaCl 0,9% (ip) e foram sacrificados 24 h depois.
PQ	10	Os ratos receberam uma injeção única de PQ (ip) e foram sacrificados 24 h depois.
NaCl - CD	6	Os ratos receberam uma injeção única de NaCl 0,9% (ip). Após 4 h, receberam CD (ig) e foram sacrificados 24 h depois.
NaCl - Ang (1-7)10	6	Os ratos receberam uma injeção única de NaCl 0,9% (ip). Após 4 h, receberam CD - Ang (1-7) (86,3 µg/kg do complexo = 10µg/kg de Ang (1-7), ig) e foram sacrificados 24 h depois.
NaCl - Ang (1-7)50	6	Os ratos receberam uma injeção única de NaCl 0,9% (ip). Após 4 h, receberam CD - Ang (1-7) (126,3 µg/kg do complexo = 50µg/kg de Ang (1-7), ig) e foram sacrificados 24 h depois.
PQ - CD	6	Ratos receberam uma injeção única de PQ (20 mg/kg, ip). Após 4 h, receberam CD (ig) e foram sacrificados 24 h depois.
PQ - Ang (1-7)10	7	Os ratos receberam uma injeção única de PQ (20 mg/kg, ip). Após 4 h, receberam CD - Ang (1-7) (86,3 µg/kg do complexo = 10µg/kg de Ang (1-7), ig) e foram sacrificados 24 h depois.
PQ - Ang (1-7)50	7	Ratos receberam uma injeção única de PQ (20 mg/kg, ip). Após 4 h, receberam CD - Ang (1-7) (126,3 µg/kg do complexo = 50µg/kg de Ang (1-7), ig) e foram sacrificados 24 h depois.

3.2.3 Coleta de amostras e tecidos

Amostras de urina (~1 ml) foram coletadas antes e após o tratamento, armazenadas em

tubos tipo *ependorff* e congeladas a -20 °C para análises posteriores de parâmetros de função renal.

Amostras de sangue (~1 ml) também foram coletadas, no início (antes do tratamento) por punção de uma veia da cauda, previamente aquecida e limpa com álcool a 70%, utilizando cateteres e seringas estéreis e após o tratamento (final do experimento) através da veia cava inferior quando os animais já encontravam-se anestesiados. A coleta foi feita em frascos contendo (~2 gotas) o anticoagulante citrato de sódio a 6%. As amostras foram centrifugadas (12.000 rpm por 10 min), o plasma foi separado e armazenado para ensaios posteriores. Ao término do protocolo experimental os animais foram sacrificados sob anestesia com uma mistura de cetamina 10% (15 mg/kg) e xilazina 2% (7,5 mg/kg) (ip). Os rins foram perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS, 1x), decapsulados e pesados, assim como os pulmões que também foram extraídos e pesados. Os rins e pulmões foram fixados para análises morfológicas ou congelados (-80 °C).

3.3 Parâmetros gerais avaliados

Peso corporal: O peso corporal (g) foi determinado, por gravimetria, antes do período de aclimação, antes da administração do NaCl 0,9% ou do herbicida PQ e 24 h após o tratamento (término do experimento).

Ingestão de água e fluxo urinário: Durante o período de aclimação às gaiolas metabólicas (Fig. 6), após a administração de NaCl 0,9% ou PQ e 24 h após o tratamento (término do experimento), a ingestão de água e o fluxo urinário foram medidos diariamente. O fluxo urinário foi medido em proveta graduada enquanto que o volume de água ingerido foi medido diretamente no recipiente-bebedouro pertencente à gaiola metabólica. Já a Figura 7 sumariza a sequência de procedimentos experimentais a que os 8 grupos utilizados, neste estudo, foram submetidos.

3.4 Procedimentos analíticos para avaliação da função renal

3.4.1 Dosagem de creatinina

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado, não-protéico formado como resultado da desidratação não enzimática da creatina (Falcão *et al.*, 1999). Por sua vez, a

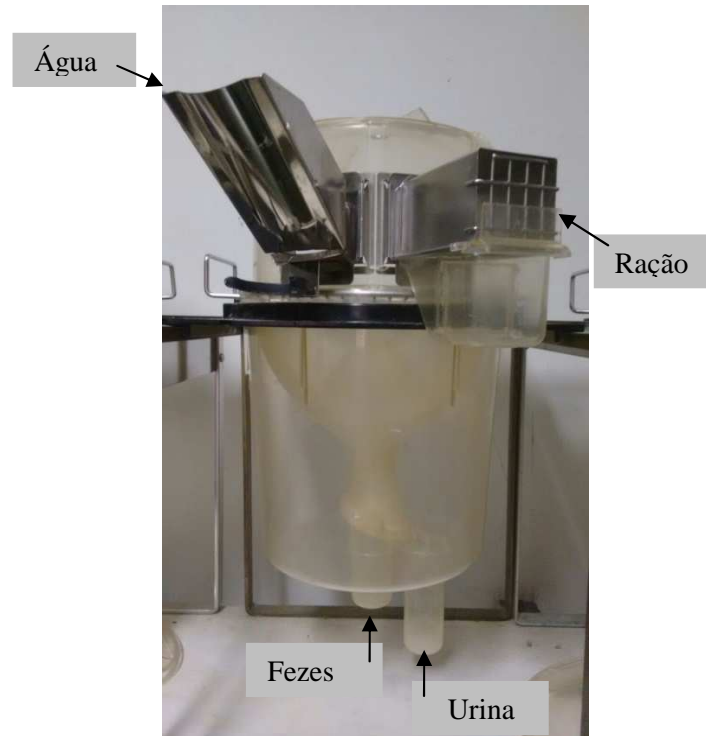


Figura 6. Fotografia de uma gaiola metabólica, onde é possível monitorar a ingestão de água e ração, assim como a produção de urina e fezes.

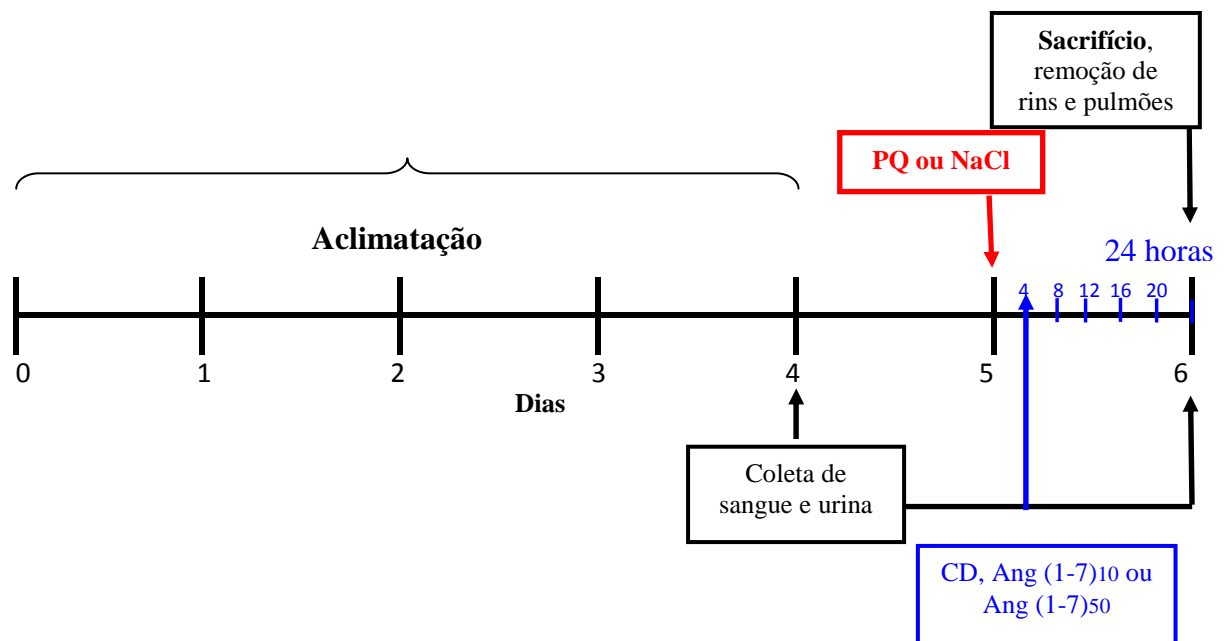


Figura 7. Sumário do protocolo experimental usado nos 8 grupos para avaliar o efeito do PQ sobre a estrutura e função renais, bem como o possível efeito terapêutico da Ang (1-7).

creatina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas e transportada para outros órgãos como músculo e cérebro, onde é fosforilada através da ação da enzima creatina quinase e estocada como fosfocreatina. Em condições fisiológicas, tanto a creatina como a fosfocreatina perdem espontaneamente a água ou ácido fosfórico, respectivamente, para formar a creatinina.

A creatinina pode ser mensurada no sangue ou urina e sua depuração é utilizada como uma medida do ritmo de filtração glomerular (RFG) e como um índice da função renal, uma vez que ela é livremente filtrada no glomérulo e ativamente secretada em pequenas proporções.

Sendo assim, o RFG foi determinado através do “clearance” de creatinina, a qual foi dosada utilizando o kit Bioclin (*Quibasa, Brasil*), conforme instruções do fornecedor.

As amostras de urina diluída (1:25) e plasma reagiram em meio alcalino com o ácido pícrico (60 mmol/l) formando um complexo creatinina-picrato de cor amarelo-avermelhada. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 min. As absorbâncias da amostra foram lidas em espectrofotômetro (*Barnstead/Turner SP-830 plus*) a 510 nm e a concentração da creatinina urinária foi corrigida pela diluição (mg/dl).

No entanto, decorrente à reação do ácido pícrico com os cromogênios plasmáticos, uma segunda leitura espectrofotométrica foi realizada para a amostra de plasma após adição de ácido acético (12,25 mol/l) e incubação em temperatura ambiente por 5 min. Assim, o pH do meio diminuiu havendo decomposição do picrato de creatinina, com conseqüente inalteração da cor derivada dos cromogênios. A diferença entre as leituras da amostra (antes e após a adição de ácido acético) forneceu a absorbância real da creatinina plasmática.

Uma curva padrão de creatinina foi construída usando o reagente padrão do kit (creatinina 3 mg/dl) que sofreu diluições seriadas (1:2) dando origem a soluções padrão com concentrações de 1,5; 0,75 e 0,375 (mg/dl), o que permitiu o cálculo do fator de calibração conforme a seguir:

$$\text{Fator de calibração (FC)} = \text{concentração do padrão/absorbância do padrão}$$

As concentrações de creatinina no plasma e urina foram determinadas multiplicando-se os valores da absorbância pelo fator de calibração (FC):

$$[\text{creatinina}]_{\text{urina}} \text{ (mg/dl)} = \text{absorbância da amostra} \times \text{FC} \times 25 \text{ (diluição)}$$

$$[\text{creatinina}]_{\text{plasma}} \text{ (mg/dl)} = (\text{absorbância da amostra pós- ácido acético} - \text{absorbância inicial da amostra}) \times \text{FC}$$

O “clearance” da creatinina (RFG) foi determinado pela equação:

$$\mathbf{RFG \text{ (Litros/24h)} = ([\text{creatinina}]_{\text{urina}} \times \text{fluxo urinário}) / [\text{creatinina}]_{\text{plasma}}}$$

Conhecendo-se o fluxo urinário (FU, Litros/24h) e o RFG, a fração de excreção de H₂O (FEH₂O) pode ser calculada:

$$\mathbf{FEH_2O = FU/RFG \times 100}$$

3.4.2. Dosagem de sódio e potássio

As concentrações de Na⁺ e K⁺, nas amostras de urina e plasma, foram determinadas por fotometria de chama (*CELM, FC 280*) usando padrão contendo 140 mEq/l de Na⁺ e 5 mEq/l de K⁺, diluído em água destilada (1:200). A espectroscopia de chama mede a intensidade da radiação emitida pelos átomos excitados dos metais-terrosos e essa intensidade é proporcional à concentração desses metais na amostra.

Para a determinação do Na⁺ e K⁺, alíquotas de 15 µl da amostra foram diluídas em 3 ml de água destilada (1:200) sendo, a dosagem em cada amostra, feita em duplicata contra o padrão apropriado (140 mEq/l de Na⁺ e 5 mEq/l de K⁺).

Para a dosagem do K⁺ na urina, foi feita uma diluição prévia da mesma (1:30) em água deionizada e, a partir dessa, uma nova diluição foi realizada (1:200) para se proceder à leitura sendo, a concentração lida diretamente no fotômetro de chama, multiplicada pelo fator de diluição (30).

Obtendo-se a concentração plasmática e urinária de Na⁺ e K⁺, os seguintes parâmetros renais foram avaliados quantitativamente:

$$\mathbf{\text{Fração de excreção Na}^+ \text{ (FE}_{\text{Na}^+}) = \text{quantidade excretada/quantidade filtrada} \times 100}$$

$$\mathbf{\text{Fração de excreção K}^+ \text{ (FE}_{\text{K}^+}) = \text{quantidade excretada/quantidade filtrada} \times 100}$$

Sendo:

$$\text{Quantidade excretada de Na}^+ = [\text{Na}^+]_{\text{urina}} \times \text{FU}$$

$$\text{Quantidade excretada de K}^+ = [\text{K}^+]_{\text{urina}} \times \text{FU}$$

$$\text{Quantidade filtrada de Na}^+ = [\text{Na}^+]_{\text{plasma}} \times \text{RFG}$$

$$\text{Quantidade filtrada de K}^+ = [\text{K}^+]_{\text{plasma}} \times \text{RFG}$$

3.4.3 Determinação das osmolalidades plasmática e urinária

As osmolalidades plasmática e urinária foram determinadas por osmometria de congelamento usando-se um osmômetro da *Advanced Instruments (Microsmette, USA)*. As amostras de plasma e urina foram previamente diluídas, em água deionizada, 1:2 e 1:5, respectivamente.

Antes das leituras, o osmômetro foi calibrado com soluções padrões cujas concentrações foram 100, 290 e 500 mOsm/kg. As osmolalidades plasmática e urinária (mOsm/kg) lidas diretamente no osmômetro foram corrigidas pelos respectivos fatores de diluição. De posse dessas medidas, os seguintes parâmetros renais puderam ser quantificados:

$$\mathbf{Cosm \text{ (Litros/24h)} = osmolalidade \text{ urina} / osmolalidade \text{ plasmática} \times FU}$$

$$\mathbf{CH_2O \text{ (Litros/24h)} = FU - Cosm}$$

Em que, **Cosm** e **CH₂O** significam “clearance” osmolar e “clearance” de água livre, respectivamente.

3.4.4 Dosagem de proteína na urina

Para esta dosagem, foi utilizado o kit comercial SensiProt (*Labtest®*, *Lagoa Santa, MG, Brasil*), que é um método colorimétrico. A reação baseia-se no fato de que as proteínas presentes na urina reagem com o vermelho de pirogalol e o molibdato dando origem a um composto cuja cor é azul. Naturalmente, que a intensidade da cor do meio de reação é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

Inicialmente, uma curva padrão de proteína foi feita utilizando-se a solução padrão de proteína fornecida no kit (65 mg/dl). A partir desta solução, diluições seriadas (1:2) foram feitas para obtenção de soluções de concentrações iguais a 32,50 e 16,25 (mg/dl). A absorbância foi lida, em leitora de Elisa (*Biotek*), a 600 nm. Assim, um fator de calibração (FC) foi obtido. A concentração de proteína nas amostras foi calculada multiplicando as absorbâncias, lidas diretamente na leitora de Elisa pelo FC obtido na curva padrão.

O Quadro 2A mostra os reagentes e respectivos volumes usados nas reações, feitas em tubo de ensaio e lidas em espectrofômetro convencional (*Barnstead Turner*), exatamente de acordo com instruções do fornecedor. Já o Quadro 2B mostra os reagentes e respectivos

volumes usados nas reações adaptadas para dosagem em placa de 96 poços e lidas em leitora de Elisa onde a reação teve seu volume final reduzido em 5 vezes.

Após a pipetagem dos reagentes em seus respectivos poços, as reações foram homogeneizadas por agitação da placa em agitador horizontal (*VDRL Shaker*) e incubada em estufa a 37 °C, por 5 min. Todas as reações foram feitas em duplicatas.

A concentração de proteína foi expressa em mg/dl, sendo:

$$[\text{proteínas}]_{\text{urina}} \text{ (mg/dl)} = \text{absorbância da amostra} \times \text{FC}$$

$$\text{Quantidade de proteínas na urina (mg/24 h)} = [\text{proteína}]_{\text{urina}} \times \text{FU}$$

Quadro 2A. Reagentes e respectivos volumes usados nas reações, feitas em tubos de ensaio e lidas em espectrofotômetro convencional, para dosagem de proteína na urina conforme instrução do fornecedor do kit.

Reagente	Branco	P1	P2	P3	Amostra
Água deionizada	50 µl	-	-	-	-
Padrão (P1 a P3) (65 mg/ml)	-	50µl (65 mg/ml)	50µl (32,5 mg/ml)	50µl (16,25 mg/ml)	-
Urina (Amostra)	-	-	-	-	50 µl
Reagente de cor	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Quadro 2B. Reagentes e respectivos volumes usados nas reações, feitas em poços de placas de 96 poços e lidas em leitora de Elisa, para dosagem de proteína na urina (adaptação do Quadro 2A obtido a partir das instruções do fornecedor do kit).

Reagente	Branco	P1	P2	P3	Amostra
Água deionizada	10 µl	-	-	-	-
Padrão (P1 a P3)	-	10 µl (65 mg/ml)	10 µl (32,5 mg/ml)	10 µl (16,25 mg/ml)	-
Urina (Amostra)	-	-	-	-	10 µl
Reagente de cor	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

3.4.5 Gama glutamil transferase urinária

O ensaio dessa enzima, na urina, foi feito utilizando um kit Doles, cuja dosagem é feita por um método colorimétrico. A reação baseia-se no princípio de que na mistura dos compostos γ -Glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida e glicilglicina, a enzima gama GT catalisa a transferência do grupamento glutamil do 1º composto para a glicilglicina, dando origem aos compostos γ - Glutamil-glicilglicina e 3-Carboxi-4-nitroanilina. Este último apresenta coloração de tonalidade rósea. A concentração da enzima é diretamente proporcional a 3-Carboxi-4-nitroanilina formada.

Antes do início das dosagens, uma curva padrão de gama GT foi feita utilizando-se a solução padrão da enzima fornecida no kit (100 mg/dl). A partir desta solução, diluições seriadas (1:2) foram feitas para obtenção de soluções de concentrações iguais a 50, 25 e 12,5 mg/dl (Quadro 3A). A absorbância foi lida, em leitora de Elisa (*Biotek*), a 515 nm. Através da curva obteve-se um fator de calibração (FC). A concentração de gama GT nas amostras foi calculada multiplicando as absorbâncias pelo FC obtido na curva padrão. Assim como para a dosagem de proteínas na urina, os volumes dos reagentes foram adaptados a partir das instruções do fornecedor, para que as reações fossem executadas em placa de 96 poços e lidas em leitora de Elisa. O volume final das reações foi reduzido em 20 vezes. Os protocolos para dosagem da gama GT tanto na curva padrão, como na urina, estão mostrados nos Quadros 3A e 3B, respectivamente.

3.5 Quantificação do acúmulo de neutrófilos e macrófagos no tecido renal

O acúmulo de neutrófilos no tecido renal foi mensurado indiretamente pela avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) (Aires *et al.*, 2013) ao passo que o infiltrado de células mononucleares nos rins foi quantificado pela medida dos níveis da enzima lisossomal N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) (Barcelos *et al.*, 2005) presente em níveis elevados em macrófagos ativados (Belo *et al.*, 2004).

Ao término do protocolo experimental, o tecido renal foi removido e armazenado a -80 °C. Após descongelamento, um fragmento (0,1 g de tecido para 1,9 ml de tampão) foi homogeneizado com solução tampão 1 (NaCl 0,1 mol/l, Na₃PO₄ 0,02 mol/l, Na₂EDTA 0,015 mol/l, pH 4,7) e centrifugado a 10.000 rpm, a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e, ao “pellet”, adicionou-se 200 μ l de solução tampão 1, 1,5 ml de solução de NaCl 0,2% e NaCl 1,6% + glicose 5%. Uma nova homogeneização foi realizada.

Quadro 3A. Reagentes e respectivos volumes usados nas reações para a curva padrão da enzima gama GT, feitas em poços de placas de 96 poços e lidas em leitora de Elisa (adaptação do protocolo obtido do fornecedor do kit).

Reagentes	P1 (100 mg/dl) μL	P2 (50 mg/dl) μL	P3 (25 mg/dl) μL	P4 (12,5 mg/dl) μL
Solução padrão (P1 a P4)	25	25	25	25
Solução inibidora	125	125	125	125
Nitrito de sódio 1,5%	2,0	2,0	2,0	2,0
Agitar a placa em agitador horizontal e deixar em repouso, à temperatura ambiente, por 3 min.				
Sulfamato de amônia 10%	4,5	4,5	4,5	4,5
Agitar a placa em agitador horizontal e deixar em repouso, à temperatura ambiente, por 2 min.				
Reagente de cor	50	50	50	50
Volume total da reação	206,5	206,5	206,5	206,5
Homogeneizar a placa em agitador horizontal, ler a absorbância em leitora de Elisa, a 515 nm.				

Quadro 3B. Reagentes e respectivos volumes usados nas reações, feitas em poços de placas de 96 poços e lidas em leitora de Elisa, para dosagem de gama GT na urina (adaptação do protocolo obtido do fornecedor do kit).

Reagentes	Branco (μL)	Amostra (μL)
Substrato de uso	25	25
Incubar a placa em estufa ou banho maria a 37 °C por 2 min.		
Amostra (urina)	-----	2,5
Incubar a placa em estufa ou banho maria a 37 °C por 10 min.		
Solução inibidora (placa ainda a 37 °C)	125	125
Retirar a placa da estufa ou banho maria.		
Amostra (urina)	2,5	-----
Nitrito de sódio 1,5%	2,0	2,0
Agitar a placa em agitador horizontal e deixar repousar, à temperatura ambiente, por 3 min.		
Sulfamato de amônia a 10%	4,5	4,5
Agitar a placa em agitador horizontal e deixar repousar, à temperatura ambiente, por 2 min.		
Reagente de cor	50	50
Volume total da reação (por poços)	206,5	206,5
Homogeneizar a placa em agitador horizontal e ler a absorbância, na leitora de Elisa, a 515 nm.		

3.5.1 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

O “pellet” obtido na última centrifugação citado no item 3.5, foi ressuspenso em solução tampão Na_3PO_4 0,05 mol/l, pH 5,4 contendo 0,5% de hexadecyl-trimethylammonium bromide (TMB; *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e re-homogeneizado. Após três ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm a 4 °C, por 15 min, para a execução do ensaio enzimático.

No ensaio, 25 μl de 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*), dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO; *Merck, Darmstadt, Alemanha*) para uma concentração final de 1,6 mmol/l, foram adicionados a 100 μl de H_2O_2 (0,002 % v/v) e 25 μl da amostra.

A reação foi iniciada pela adição da solução de TMB à amostra e a microplaca de 96 poços foi incubada a 37 °C por 5 min. Em seguida, adicionou-se H_2O_2 e uma nova incubação foi realizada. A reação foi interrompida pela adição de 100 μl de H_2SO_4 (1 mol/l) e quantificada a 450 nm em espectrofotômetro (*Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA*).

Os resultados foram expressos como modificações na absorvância (densidade óptica - OD) por miligrama de tecido.

3.5.2 Medida da atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

O “pellet” (item 3.5) obtido na centrifugação foi ressuspenso em solução de NaCl 0,9% contendo 0,1% de Triton X-100 (*Promega*) e re-homogeneizado para a realização do ensaio enzimático.

A reação iniciou-se pela incubação das amostras (100 μl), por 10 min, a 37 °C, com 100 μl do substrato p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glicosaminidase (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) dissolvido em tampão fosfato/citrato (ácido cítrico 0,1 mol/l, Na_2HPO_4 0,1 mol/l, pH 4,5) para uma concentração final de 2,24 mmol/l.

Para a interrupção da reação, 100 μl de tampão glicina 0,2 mol/l (glicina 0,8 mol/l, NaCl 0,8 mol/l, NaOH 0,8 mol/L, pH 10,6) foram adicionados. O produto da hidrólise do substrato foi quantificado a 405 nm em espectrofotômetro (*Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA*).

Os resultados foram expressos como modificações na absorvância (densidade óptica - OD) por miligrama de tecido.

3.6 Mensuração da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada pela técnica da oxidação ferrosa do Xilenol Orange (FOX) (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994), em espectrofotômetro, com algumas modificações. O intuito desta investigação foi analisar o “stress” oxidativo no tecido renal decorrente da intoxicação causada pelo PQ antes e após o tratamento com Ang (1-7).

O método consiste na oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) a íon férrico (Fe^{3+}) pelos hidroperóxidos lipídicos, em meio ácido.

Após ser removido, o rim foi homogeneizado em PBS, 10% p/v, e adicionado ao reagente de FOX. A reação deve ser feita em ambiente escuro, por 30 min, à temperatura ambiente. A absorbância foi lida em 560 nm (Capettini *et al.*, 2008).

A concentração dos hidroperóxidos nas amostras foi calculada considerando a seguinte equação:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot C$$

A_{λ} = absorbância a 560 nm

ϵ_{λ} = coeficiente de extinção molar do cromóforo = $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

C = concentração de hidroperóxidos em mol/L.

3.7 Morfologia renal

A análise morfológica dos rins foi feita utilizando técnicas convencionais para análise histológica dos mesmos. O estudo histológico compreendeu uma investigação do compartimento glomerular e do compartimento túbulo-intersticial renal em busca de alterações histológicas decorrentes da intoxicação aguda por PQ seguida ou não por tratamento com Ang (1-7).

A preparação do material histológico foi realizada de acordo com os métodos de histotécnica preconizados por Prophet *et al.*, (1994). Os tecidos removidos foram inicialmente fixados em solução de formalina 10%, por 24 h e, em seguida, submetidos à desidratação em álcool etílico a 70% e absoluto.

Posteriormente, os tecidos passaram por diafanização com o intuito de remover os restos teciduais e, sequencialmente, foram embebidos em substância miscível com parafina e incluídos em blocos. Os blocos foram submetidos à microtomia sendo obtidos cortes de 5 μm

de espessura, os quais foram transferidos para lâminas de vidro. As preparações obtidas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE).

As análises morfológica e morfométrica foram realizadas no Depto. de Patologia/ICB/UFMG com a colaboração do Prof. Marcelo Vidigal Caliarí.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm EPM$). Para a comparação dos dados intragrupos (NaCl ou PQ) foi usada ANOVA seguida do teste de Newmann-Keuls. Para a comparação dos dados intergrupos (NaCl *versus* PQ) foi usada Two-way-ANOVA seguida do teste de Bonferroni. O nível de significância considerado significativo foi um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de sobrevida

As curvas de sobrevivência obtidas com diferentes doses de PQ (NaCl = veículo, 10, 20 e 40 mg/kg, ip) foram investigadas por um período total de 96 h (Fig. 8). Nas primeiras 12 h, a taxa de sobrevivência foi medida de 6 em 6 h. A partir das 12 h, essa taxa passou a ser observada a cada 24 h.

Com exceção da dose de 40 mg/kg, o PQ, nas outras 2 doses utilizadas, não apresentou letalidade até 48 h após sua administração.

Como 20 mg/kg de PQ é uma dose já descrita como sendo tóxica e também por ser uma dose de uso consensual por grupos de pesquisa do Depto. de Fisiologia e Biofísica/ICB que investigam o efeito do PQ sobre o sistema pulmonar, no presente trabalho, 20 mg/kg foi a dose de escolha para os estudos. Também, o tempo de escolha para examinar os efeitos da intoxicação foi de 24 h. Para ambos, dose e tempo de intoxicação de escolha, foram levados em consideração o protocolo já largamente utilizado pelos outros grupos que investigam o efeito do PQ, como citado anteriormente, e a ausência de mortalidade em 24 h pós-intoxicação com a dose de 20 mg/kg (Fig. 8).

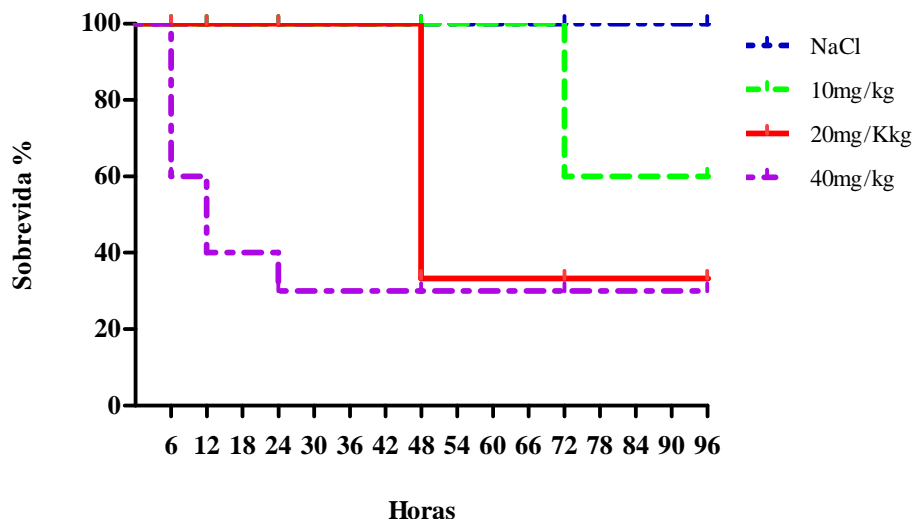


Figura 8. Efeito de diferentes doses de PQ sobre a sobrevida de ratos. A curva foi estimada pelo método de Kaplan-Meier. Os valores estão expressos em porcentagem de sobrevivência nos tempos indicados até 96 h após a exposição ao herbicida. Os ratos receberam, via ip, NaCl 0,9% (controle) ou PQ nas doses indicadas.

4.2 Parâmetros Gerais

Além dos parâmetros que serão apresentados a seguir, nos animais expostos ao PQ, foram observados sinais clínicos como piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular, diminuição da movimentação e falta de apetite.

4.2.1 Peso corporal

O peso corporal dos ratos que compuseram os grupos controle (NaCl 0,9%, 25 ratos) e PQ, 30 ratos), antes do início do experimento, foi de $261,0 \pm 6,5$ e de $269,3 \pm 2,9$ g, respectivamente. No entanto, conforme mostra a Figura 9, os ratos do grupo PQ tiveram redução acentuada do peso corporal. Por exemplo, o grupo que recebeu apenas NaCl 0,9% apresentou um ganho de peso de $3,7 \pm 1,3$ g enquanto que no grupo que recebeu apenas PQ foi observada uma perda de peso de $34,1 \pm 2,0$ g. Este efeito do PQ não foi significativamente afetado pela CD nem pela Ang (1-7) nas doses de 10 ou 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Fig. 9).

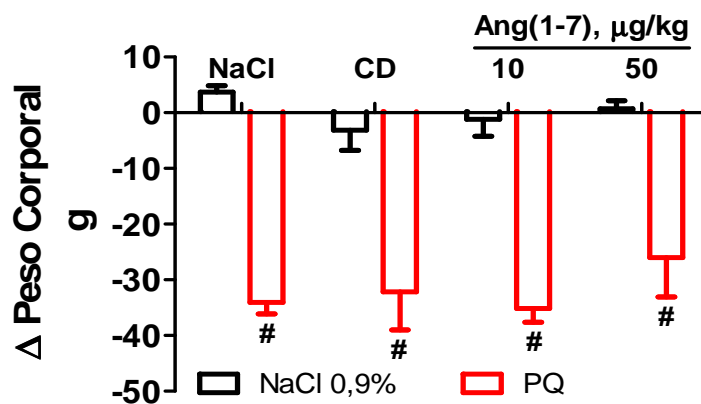


Figura 9. Diferença dos pesos corporais antes e 24 h pós-administração de PQ. A Ang (1-7) não modificou a perda de peso induzida pelo PQ. NaCl: controle (NaCl 0,9%, n = 7); PQ (n = 10); CD (n=6); Ang (1-7)10 (n = 7) e Ang (1-7)50 (n = 7). Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni: #p < 0,05 PQ vs NaCl 0,9%.

4.2.2 Peso dos rins e pulmões

A Tabela 1 sumariza o peso absoluto dos rins direito e esquerdo, do pulmão esquerdo (PE). Pode ser observado que o peso do rim esquerdo e direito foram similares nos 8 grupos sob estudo. O peso do pulmão esquerdo no grupo que recebeu apenas PQ não foi

estatisticamente diferente do grupo NaCl (Controle, NaCl 0,9% apenas). No entanto, no grupo que recebeu NaCl e não PQ, o tratamento com Ang (1-7), nas doses de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aumentou de forma significativa o peso do pulmão esquerdo, embora o aumento tenha sido similar entre as 2 doses. Já no grupo que recebeu PQ, o tratamento com Ang (1-7) aumentou o peso desse pulmão somente com a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Este aumento, por sua vez, foi maior no grupo PQ - Ang (1-7)₁₀ quando comparado ao aumento observado no grupo NaCl - Ang (1-7)₁₀ (Tab. 1).

4.2.3 Fluxo urinário, ingestão de água e balanço hídrico

Apesar de ser um parâmetro de avaliação de função renal, o fluxo urinário (FU) será inicialmente apresentado nesta seção para permitir que o balanço hídrico seja avaliado. Conforme pode ser observado pela Figura 10A, primeiramente, a Ang (1-7), nas doses de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, não foi capaz de modificar o FU nos animais controles (NaCl, barras pretas). Já o PQ aumentou significativamente o FU quando comparado ao grupo NaCl, sendo que, este aumento não foi afetado pelo tratamento com Ang (1-7). O grupo injetado com PQ e tratado com CD, veículo para a Ang (1-7), apresentou aumento do FU similar ao apresentado nos demais grupos que receberam PQ (Fig. 10A).

Os valores de FU (Litros/24h) nos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%) e PQ foram os seguintes:

NaCl e PQ, $0,006 \pm 0,000$ (n = 7) e $0,014 \pm 0,001$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $0,006 \pm 0,002$ (n = 6) e $0,015 \pm 0,002$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₁₀ e PQ - Ang (1-7)₁₀, $0,008 \pm 0,001$ (n = 6) e $0,017 \pm 0,002$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₅₀ e PQ - Ang (1-7)₅₀, $0,008 \pm 0,001$ (n = 6) e $0,013 \pm 0,002$ (n = 7), respectivamente.

Contrariamente, a Figura 10B mostra uma redução na ingestão de água subsequente à administração do PQ nos mesmos grupos citados acima. Pode ser observado que a Ang (1-7), nas doses de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ provocou respectivamente uma elevação e uma redução na ingestão de água pelos ratos dos grupos controles (NaCl, barras pretas). Esse peptídeo, na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, não afetou a ingestão de água pelo grupo que recebeu PQ quando comparado ao grupo que recebeu NaCl 0,9% (Fig. 10B).

O volume de água ingerido (Litros/24h) pelos grupos administrados com NaCl 0,9% e PQ foram os seguintes:

Tabela 1. Peso relativo dos rins e pulmão em ratos normais e expostos ao PQ.

Peso	Grupos Experimentais							
	NaCl	NaCl - CD	NaCl - Ang10	NaCl - Ang50	PQ	PQ - CD	PQ - Ang10	PQ - Ang50
Rim direito	0,34 ± 0,01 (7)	0,46 ± 0,07 (5)	0,34 ± 0,03 (6)	0,38 ± 0,02 (6)	0,39 ± 0,01 (10)	0,40 ± 0,02 (6)	0,40 ± 0,02 (7)	0,40 ± 0,02 (7)
Rim esquerdo	0,33 ± 0,00 (7)	0,38 ± 0,02 (5)	0,34 ± 0,02 (6)	0,37 ± 0,03 (6)	0,38 ± 0,01 (10)	0,39 ± 0,02 (6)	0,39 ± 0,00 (7)	0,39 ± 0,02 (7)
Pulmão esquerdo	0,37 ± 0,00 (7)	0,48 ± 0,04 (6)	0,54 ± 0,03 (6)*	0,55 ± 0,08 (6)*	0,41 ± 0,01 (9)	0,55 ± 0,06 (6)	0,77 ± 0,11 (7) *#	0,59 ± 0,07 (7)

Após o sacrifício dos animais, os órgãos foram isolados e pesados em balança apropriada. *p < 0,05 vs NaCl ou vs PQ (Oneway ANOVA seguida do teste de Newmann-Keuls, dentro dos grupos NaCl ou PQ); #p < 0,05 vs NaCl - Ang10 (Two-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni). NaCl - Ang10, NaCl - Ang50, PQ - Ang10 e PQ - Ang50 correspondem aos grupos NaCl -Ang (1-7)10, NaCl - Ang (1-7)50, PQ - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)50, respectivamente. O peso relativo de cada órgão foi calculado: (peso do órgão/peso corporal do animal) x 100.

NaCl e PQ, $0,027 \pm 0,002$ (n = 7) e $0,010 \pm 0,002$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $0,024 \pm 0,003$ (n = 6) e $0,008 \pm 0,004$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $0,041 \pm 0,003$ (n = 6) e $0,000 \pm 0,001$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $0,010 \pm 0,001$ (n = 6) e $0,010 \pm 0,005$ (n = 7), respectivamente.

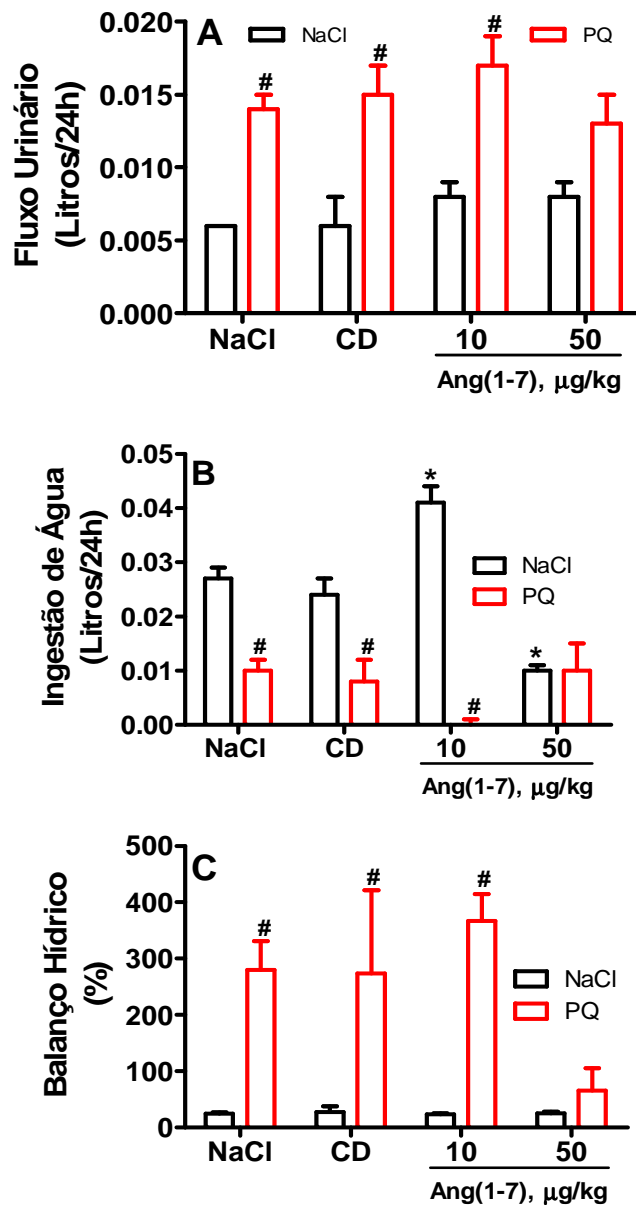


Figura 10. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) em ratos. A, fluxo urinário, B, ingestão de água e C, balanço hídrico. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Oneway ANOVA seguida de teste de Newmann-Keuls (intragrupo): *p < 0,05 vs NaCl; Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): [#]p < 0,05 vs NaCl (intergrupo).

As alterações no FU e na ingestão de água foram refletidas no balanço hídrico, ou seja, aumentos e reduções no FU e na ingestão de água, respectivamente, foram acompanhados por aumentos no balanço hídrico (Fig. 10C). Similarmente ao observado para a ingestão de água, a Ang (1-7) (50 µg/kg), não afetou o balanço hídrico no grupo que recebeu PQ quando comparado ao grupo que recebeu NaCl 0,9% (Fig. 10C).

O balanço hídrico (%) nos grupos administrados com NaCl 0,9% (NaCl) e PQ foram os seguintes:

NaCl e PQ, $24,5 \pm 2,4$ (n = 7) e $280,3 \pm 51,2$ (n = 9), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $27,7 \pm 10,1$ (n = 6) e $273,6 \pm 147,9$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $23,1 \pm 2,8$ (n = 6) e $367,1 \pm 47,7$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $25,0 \pm 3,0$ (n = 6) e $65,6 \pm 39,4$ (n = 7), respectivamente.

4.3 Parâmetros de função renal

4.3.1 Creatinina sérica

Conforme ilustrado na Figura 11, a exposição ao PQ levou a um aumento na concentração plasmática de creatinina quando comparado ao seu respectivo controle, 24 h após sua administração.

As concentrações plasmáticas de creatinina (mg/dl) nos grupos administrados com NaCl 0,9% (NaCl) e PQ foram as seguintes:

NaCl e PQ, $0,27 \pm 0,024$ (n = 7) e $0,48 \pm 0,06$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $0,20 \pm 0,03$ (n = 6) e $0,33 \pm 0,05$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $0,26 \pm 0,04$ (n = 6) e $0,47 \pm 0,06$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $0,34 \pm 0,03$ (n = 6) e $0,67 \pm 39,4$ (n = 7), respectivamente.

4.3.2 Ritmo de filtração glomerular e fração de excreção de água

Para que a fração de excreção de água pudesse ser avaliada, o FU (Fig. 10A) foi novamente apresentado. Na Figura 12A, pode ser observado que a Ang (1-7) (10 e 50 µg/kg),

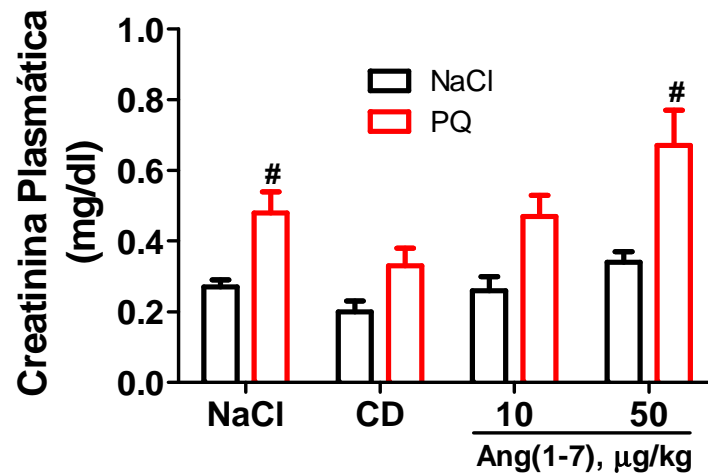


Figura 11. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a creatinina plasmática em ratos. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Twoway ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): [#]p < 0,05 vs NaCl.

não alterou o FU nos animais controles (NaCl, barras pretas), mas que o PQ aumentou significativamente esse parâmetro. Esse efeito do PQ não foi afetado pelo tratamento com Ang (1-7).

Concomitantemente ao aumento da creatinina plasmática (Fig. 11), houve queda do ritmo de filtração glomerular (RFG) induzida pelo PQ, a qual não foi significativamente afetada pela Ang (1-7) (10 µg/kg) sendo, portanto esse peptídeo, incapaz de promover um efeito benéfico na melhoria do dano na filtração glomerular causado pelo PQ no protocolo por nós utilizado (Fig. 12B). A CD, veículo para a Ang (1-7), embora tenha aparentemente revertido o efeito do PQ, tal efeito não foi estatisticamente significativo (p > 0,05). A Ang (1-7), na dose de 50 µg/kg provocou uma diminuição no RFG dos ratos dos grupos controles (NaCl, barras pretas) (Fig. 12B).

Os valores de RFG (Litros/24h), estimado pelo “clearance” de creatinina, nos grupos NaCl e PQ foram os seguintes:

NaCl e PQ, $2,05 \pm 0,16$ (n = 7) e $0,96 \pm 0,11$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $1,59 \pm 0,25$ (n = 5) e $1,71 \pm 0,40$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $1,68 \pm 0,20$ (n = 6) e $0,81 \pm 0,19$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $1,05 \pm 0,19$ (n = 5) e $0,59 \pm 0,09$ (n = 7), respectivamente.

O aumento do FU (Fig. 12A) associado à queda do RFG (Fig. 12B) repercutiu em um aumento da fração de excreção de água nos animais que receberam PQ, efeito este, não alterado pelo tratamento com Ang (1-7) (Fig. 12C). A Ang (1-7) (50 µg/kg) induziu uma elevação na fração de excreção de água nos ratos dos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%, barras pretas). (Fig. 12C).

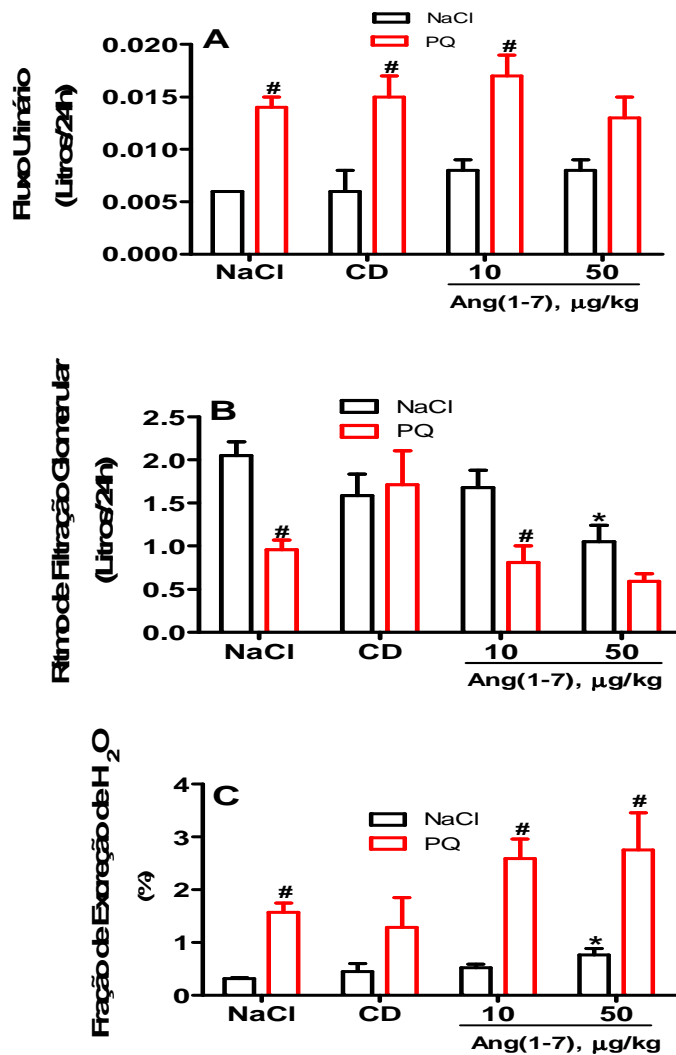


Figura 12. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) em ratos. A, fluxo urinário, B, ritmo de filtração glomerular e C, fração de excreção de água. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Oneway ANOVA seguida de teste de Newmann-Keuls (intragrupo): * p < 0,05 vs NaCl; Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): # p < 0,05 vs NaCl.

A fração de excreção de água (FE_{H₂O})(%), nos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%) e PQ foram as seguintes:

NaCl e PQ, $0,31 \pm 0,02$ (n = 7) e $1,57 \pm 0,18$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $0,44 \pm 0,16$ (n = 5) e $1,29 \pm 0,57$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $0,52 \pm 0,06$ (n = 6) e $2,59 \pm 0,38$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $0,76 \pm 0,13$ (n = 5) e $2,75 \pm 0,71$ (n = 7), respectivamente.

4.3.3 *Proteinúria*

A proteinúria é um marcador precoce e sensível do comprometimento renal, estando associada ao aumento da permeabilidade glomerular, diminuição da reabsorção tubular ou presença de proteínas anormais na circulação.

A Figura 13 mostra que a injeção de PQ promoveu um aumento na quantidade de proteínas excretadas na urina quando comparado ao seu respectivo controle, 24 h após sua administração. Este efeito do PQ não foi afetado pelo pós-tratamento com Ang (1-7), em nenhuma das 2 doses utilizadas (10 e 50 µg/kg).

As quantidades de proteínas na urina (mg/24h) nos grupos administrados com NaCl 0,9% (NaCl) e PQ foram as seguintes:

NaCl e PQ, $1,35 \pm 0,21$ (n = 7) e $7,58 \pm 0,70$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $1,39 \pm 0,49$ (n = 6) e $8,43 \pm 1,55$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $2,68 \pm 0,55$ (n = 6) e $5,95 \pm 0,72$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $1,63 \pm 0,47$ (n = 6) e $7,20 \pm 1,04$ (n = 7), respectivamente.

4.3.4 *Excreção de sódio e potássio*

A fração de excreção de Na^+ apresentou-se bastante elevada nos animais expostos à intoxicação pelo PQ em relação ao grupo NaCl (Fig. 14A). Mais uma vez, a Ang (1-7) não foi capaz de interferir com tal efeito do PQ.

A fração de excreção de Na^+ (%), nos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%) e PQ foram as seguintes:

NaCl e PQ, $0,25 \pm 0,03$ (n = 7) e $0,97 \pm 0,14$ (n = 7), respectivamente;

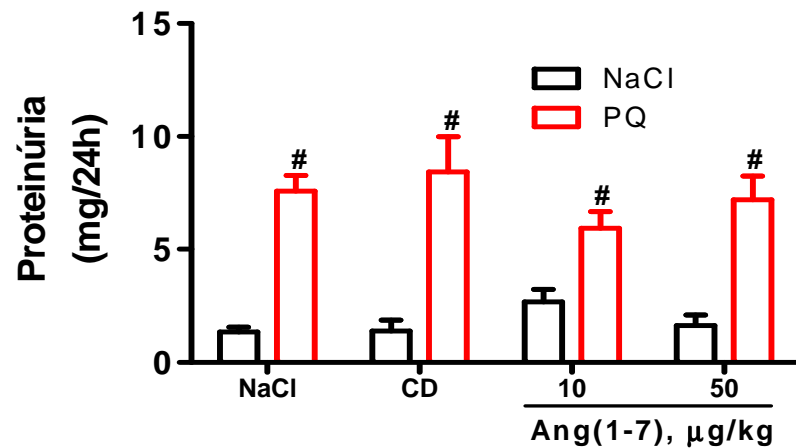


Figura 13. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a proteinúria em ratos. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): # $p < 0,05$ vs NaCl.

NaCl - CD e PQ - CD, $0,22 \pm 0,04$ (n = 6) e $0,50 \pm 0,17$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₁₀ e PQ - Ang (1-7)₁₀, $0,24 \pm 0,02$ (n = 6) e $1,00 \pm 0,23$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₅₀ e PQ - Ang (1-7)₅₀, $0,63 \pm 0,13$ (n = 6) e $1,38 \pm 0,41$ (n = 7), respectivamente.

De acordo com a Figura 14B, a fração de excreção de K^+ também foi aumentada pela administração de PQ quando comparada aos ratos do grupo que recebeu NaCl 0,9% (grupo NaCl). Mais uma vez, a Ang (1-7) não foi capaz de interferir com tal efeito do PQ. Embora a fração de excreção de K^+ , aparentemente, tenha se mostrado mais elevada nos grupos PQ que receberam Ang (1-7) quando comparada aos grupos NaCl que receberam o heptapeptídeo, este aumento não atingiu significância estatística (Fig. 14B).

A fração de excreção de K^+ (%), nos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%) e PQ foram as seguintes:

NaCl e PQ, $37,1 \pm 1,1$ (n = 7) e $103,6 \pm 29,8$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $35,8 \pm 6,5$ (n = 6) e $81,7 \pm 45,5$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₁₀ e PQ - Ang (1-7)₁₀, $45,2 \pm 3,2$ (n = 6) e $139,0 \pm 57,5$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₅₀ e PQ - Ang (1-7)₅₀, $55,5 \pm 13,8$ (n = 6) e $109,9 \pm 17,8$ (n = 7), respectivamente.

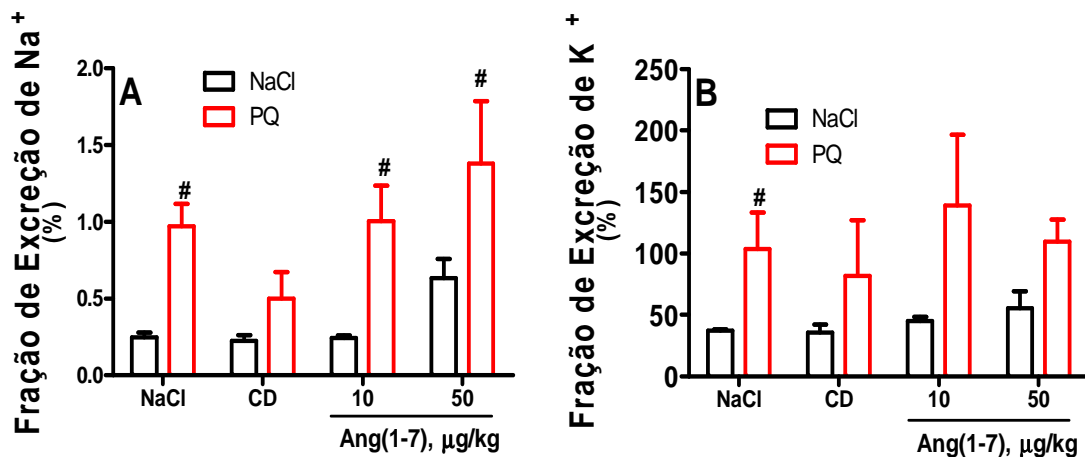


Figura 14. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) em ratos. A, fração de excreção de Na⁺ e B, fração de excreção de K⁺. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): #p < 0,05 vs NaCl.

4.3.5 Excreção urinária da enzima gama glutamiltransferase

A enzima gama glutamiltransferase (gama GT), presente no citoplasma das células do epitélio ‘orla’ em escova dos túbulos renais proximais e da alça de Henle, é utilizada como um biomarcador precoce da lesão tubular renal, podendo ser quantificada na urina. Devido ao seu alto peso molecular a gama GT circulante não sofre filtração glomerular e, portanto, a enzima encontrada na urina é de origem tubular (Rossier *et al.*, 1995).

A Figura 15 mostra que a injeção de PQ promoveu um aumento na concentração urinária da enzima gama GT comparado ao seu respectivo controle, 24 h após sua administração. A Ang (1-7) apresentou um efeito paradoxal sobre o aumento, induzido pelo PQ, da gama GT urinária. Enquanto que na dose de 10 µg/kg, a Ang (1-7) bloqueou tal aumento, a dose de 50 µg/kg mostrou-se inefetiva.

As concentrações da enzima gama GT na urina (unidades/litro) nos grupos administrados com NaCl 0,9% (NaCl) e PQ foram as seguintes:

NaCl e PQ, $10,1 \pm 1,8$ (n = 7) e $107,2 \pm 25,4$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $9,7 \pm 2,0$ (n = 6) e $38,9 \pm 19,6$ (n = 5), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $5,7 \pm 1,6$ (n = 6) e $6,4 \pm 2,7$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $4,7 \pm 1,2$ (n = 6) e $88,2 \pm 40,2$ (n = 7), respectivamente.

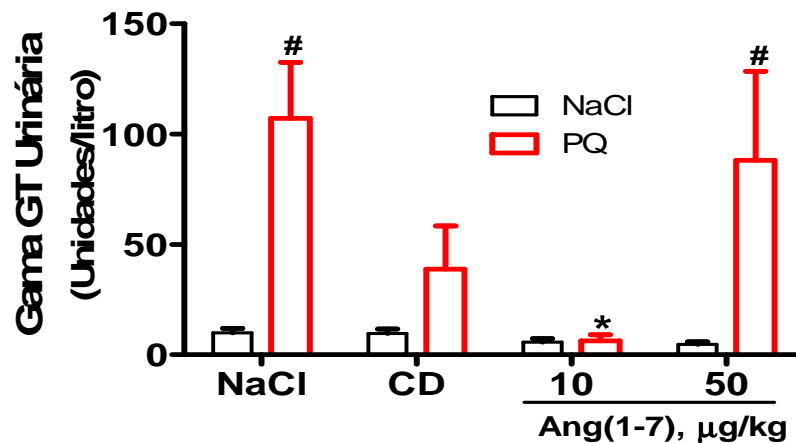


Figura 15. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a excreção urinária da enzima gama GT em ratos. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Oneway ANOVA seguida de teste de Newmann-Keuls (intragrupo): * $p < 0,05$ vs PQ; Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): # $p < 0,05$ vs NaCl.

4.3.6 “Clearance” osmolar e “clearance” de água livre

A intoxicação por PQ não afetou, de forma significativa, o “clearance” osmolar (Fig. 16A) e o pós-tratamento com Ang (1-7) não produziu qualquer alteração sobre tal parâmetro.

Os valores de “clearance” osmolar (Litros/24h) nos grupos administrados com NaCl 0,9% (NaCl) e PQ foram os seguintes:

NaCl e PQ, $0,044 \pm 0,002$ (n = 7) e $0,048 \pm 0,003$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $0,038 \pm 0,007$ (n = 6) e $0,049 \pm 0,002$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $0,057 \pm 0,003$ (n = 6) e $0,045 \pm 0,005$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $0,043 \pm 0,006$ (n = 6) e $0,044 \pm 0,004$ (n = 7), respectivamente.

Já com relação ao “clearance” de água livre, foi observado que a Ang (1-7) tornou o mesmo mais negativo nos ratos dos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%, barras pretas) (Fig. 16B), embora o PQ, por si só, não tenha produzido alterações significativas. Mas, a Ang (1-7), na menor dose utilizada (10 µg/kg), tornou tal “clearance” menos negativo nos animais intoxicados (grupo PQ - Ang (1-7)10) quando comparados ao grupo NaCl - Ang (1-7)10.

Os valores de “clearance” de água livre (Litros/24h) nos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%) e PQ foram os seguintes:

NaCl e PQ, $-0,038 \pm 0,002$ (n = 7) e $-0,034 \pm 0,003$ (n = 10), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $-0,031 \pm 0,006$ (n = 6) e $-0,034 \pm 0,003$ (n = 6), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₁₀ e PQ - Ang (1-7)₁₀, $-0,048 \pm 0,002$ (n = 6) e $-0,027 \pm 0,006$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)₅₀ e PQ - Ang (1-7)₅₀, $-0,035 \pm 0,006$ (n = 6) e $-0,031 \pm 0,005$ (n = 7), respectivamente.

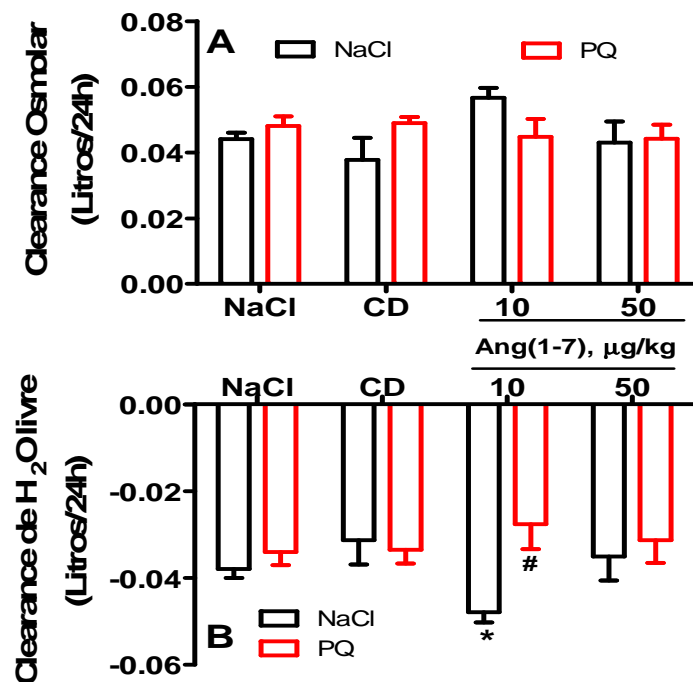


Figura 16. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) em ratos. A, “clearance” osmolar e B, “clearance” de água livre. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Oneway ANOVA seguida de teste de Newmann-Keuls (intragrupo): * p < 0,05 vs NaCl; Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): # p < 0,05 vs NaCl.

4.4 Processo inflamatório renal

4.4.1 Atividade da mieloperoxidase renal

A dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) correlaciona-se com a quantidade de neutrófilos recrutados em uma lesão durante processo de inflamação permitindo que o componente inflamatório seja demonstrado quantitativamente. Contudo, em nosso estudo, não foi possível a quantificação do conteúdo de MPO nas amostras de tecido renal. A atividade de

MPO renal não foi detectada em nenhum dos grupos experimentais, nem mesmo no grupo controle (NaCl 0,9% apenas). Esta observação não condiz com resultados já relatados na literatura. É importante salientar que a técnica utilizada na dosagem da MPO é capaz de detectar sua atividade no tecido renal até em animais saudáveis, não submetidos a qualquer tratamento. Tal resultado está relatado em outros trabalhos (Portella, 2010; Diniz-Oliveira *et al.*, 2006; Pompermayer *et al.*, 2005). Por isso, em nosso estudo, não se pode descartar a possibilidade de que a enzima MPO, no tecido renal, tenha sido inativada.

4.4.2 Atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase

O ensaio de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) permite quantificar indiretamente o acúmulo de macrófagos, em um determinado tecido, em decorrência de um processo inflamatório. No nosso estudo, foi investigado o acúmulo de macrófagos no tecido renal 24 h após intoxicação por PQ. O nível de atividade dessa enzima não foi estatisticamente diferente entre todos os 8 grupos estudados não havendo, portanto, infiltrado de macrófagos no rim (Fig. 17).

Os resultados da quantificação de neutrófilos (atividade de MPO renal não detectável) e macrófagos (Fig. 17) no tecido renal estão em consonância com os achados da análise histológica (Fig. 19, pg.48), onde nenhum infiltrado de células inflamatórias foi evidenciado.

Os valores de atividade da enzima NAG renal (OD por 100 mg de tecido) nos grupos NaCl (Controle, NaCl 0,9%) e PQ foram os seguintes:

NaCl e PQ, $0,63 \pm 0,07$ (n = 6) e $0,53 \pm 0,04$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $0,57 \pm 0,05$ (n = 6) e $-0,67 \pm 0,08$ (n = 5), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $0,52 \pm 0,06$ (n = 6) e $0,68 \pm 0,05$ (n = 7), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $0,61 \pm 0,08$ (n = 6) e $0,61 \pm 0,04$ (n = 7), respectivamente.

4.4.3 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica, resultante da ação de radicais livres induzidos pelo mecanismo bioquímico do PQ sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gera uma série de produtos, dentre os quais, o hidroperóxido lipídico (LOOH).

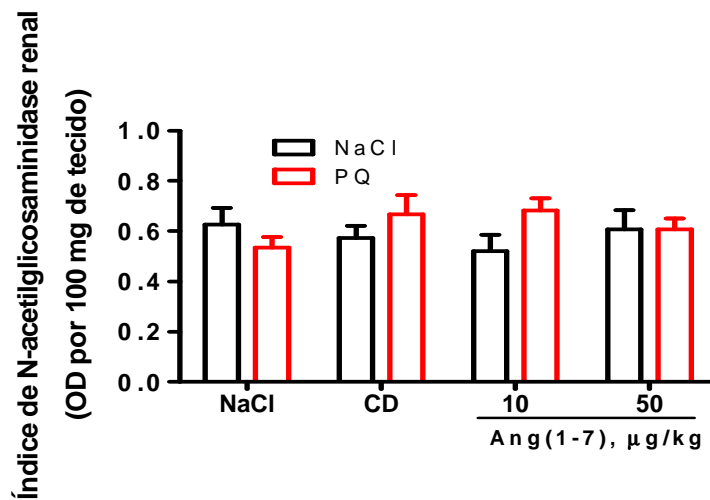


Figura 17. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) no tecido renal de ratos. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina).

A Figura 18 mostra que a injeção de PQ induziu elevação da quantidade renal de peróxidos de lipídeo, o LOOH, produto primário do processo de peroxidação quando comparado ao seu respectivo controle, 24 h após sua administração. Isto pôde ser observado em todos os grupos expostos à intoxicação.

Antagonizando a ação do PQ, observou-se que a Ang (1-7)50 reduziu a formação de radicais lipídicos, iniciadores e propagadores da peroxidação lipídica ($p < 0,05$).

A Ang (1-7) apresentou efeitos que foram dependentes das 2 doses utilizadas. Na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a Ang (1-7) não afetou o aumento no LOOH renal, mas na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi observada uma redução da formação desse composto quando comparado ao grupo PQ.

Os valores das concentrações do composto LOOH renal (μM) nos grupos administrados com NaCl 0,9% (NaCl) e PQ foram as seguintes:

NaCl e PQ, $0,48 \pm 0,04$ ($n = 6$) e $3,52 \pm 0,39$ ($n = 7$), respectivamente;

NaCl - CD e PQ - CD, $0,53 \pm 0,03$ ($n = 6$) e $3,00 \pm 0,44$ ($n = 5$), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)10 e PQ - Ang (1-7)10, $0,62 \pm 0,03$ ($n = 6$) e $2,61 \pm 0,09$ ($n = 7$), respectivamente;

NaCl - Ang (1-7)50 e PQ - Ang (1-7)50, $0,50 \pm 0,03$ ($n = 5$) e $2,13 \pm 0,08$ ($n = 7$), respectivamente.

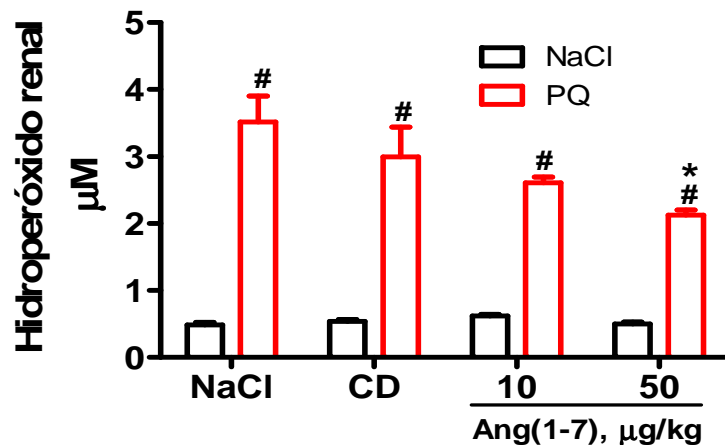


Figura 18. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre a concentração renal de hidropéroxido em ratos. NaCl (NaCl 0,9%); CD (ciclodextrina). Oneway ANOVA seguida de teste de Newmann-Keuls (intragrupo): * $p < 0,05$ vs PQ; Two-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni (intergrupo): [#] $p < 0,05$ vs NaCl.

4.5 Análise da morfologia renal

Conforme apresentado na Figura 19, não foram encontradas alterações significativas nos animais dos grupos NaCl e PQ, assim como o tratamento com Ang (1-7) não afetou o aspecto morfológico dos rins. Em todos os grupos experimentais, observou-se a preservação da arquitetura tecidual, identificada pela presença de tecido epitelial cúbico nos túbulos renais. O túbulo proximal apresenta células com citoplasma fortemente acidófilo, coradas intensamente de vermelho pelo corante hematoxilina-eosina (HE). As células do parênquima renal encontram-se nítidas, certificadas pela presença de núcleos centrais e esféricos com nucléolo. Houve preservação da área intersticial e não existem sinais de infiltrado de células inflamatórias mononucleares.

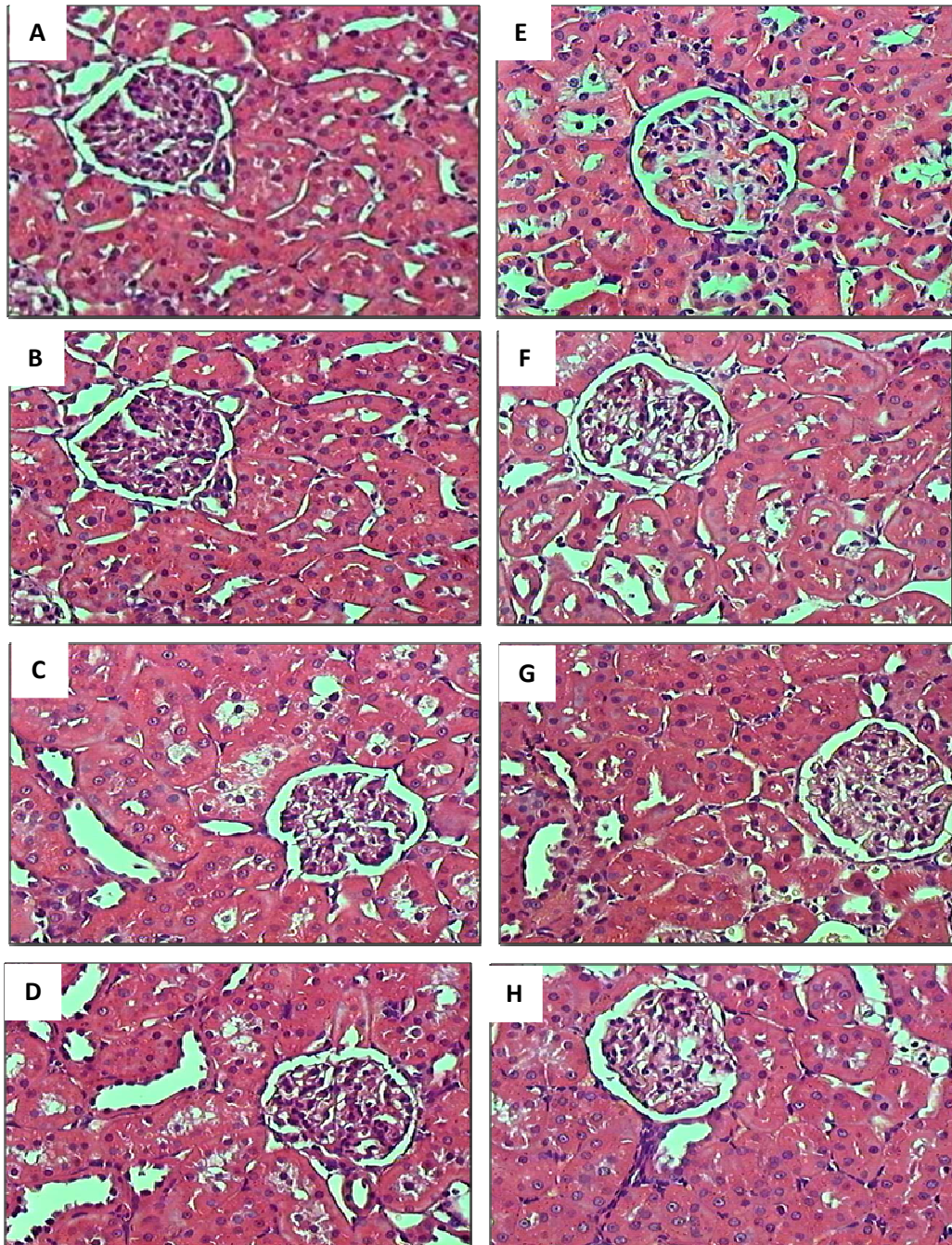


Figura 19. Efeito da intoxicação aguda pelo PQ com e sem pós-tratamento com Ang (1-7) sobre o aspecto morfológico do tecido renal de ratos. A Figura mostra cortes histológicos típicos obtidos do rim esquerdo de ratos dos grupos sob estudo. **A**, grupo NaCl; **B**, grupo NaCl - CD; **C**, grupo NaCl - Ang(1-7)10; **D**, grupo NaCl - Ang (1-7)50, **E**, grupo PQ; **F**, grupo PQ - CD; **G**, grupo PQ - Ang (1-7)10; **H**, grupo PQ - Ang (1-7)50. Coloração: hematoxilina-eosina; aumento de 40x; CD, ciclodextrina.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, pela primeira vez, o efeito do PQ sobre um conjunto de parâmetros renais foi abordado de forma concisa. Este também é o primeiro estudo onde um possível efeito da Ang (1-7) sobre os danos renais causados pela intoxicação com PQ foi investigado.

5.1 Paraquat *versus* curva de sobrevida

As **curvas de sobrevida** apresentadas, nesse estudo, mostraram que, com o PQ nas doses de 10 e 20 mg/kg, a taxa de sobrevida é de 100%, 24 h após a sua administração intraperitonealmente. Com 20 mg/kg, esta taxa diminui para cerca de 33%, 48 h pós-administração e para 60%, 72 h pós-administração de 10 mg/kg de PQ. Já utilizando camundongos C57BL/6J, Shao *et al.* (2015) relataram que a taxa de sobrevida dos mesmos era de 90%, 24h após a administração, também via intraperitoneal, de 10 mg/kg de PQ. Para efeito de comparação, às 72 h, quando a taxa de sobrevida com a dose de 10 mg/kg, em nosso estudo, foi de 60%, no trabalho de Shao *et al.* (2015) esta taxa foi de cerca de 80%, valor este, superior ao por nós obtido. Uma possível explicação para tal diferença pode ser devido à diferença de espécies utilizadas nos 2 trabalhos.

No presente trabalho, a dose de PQ de escolha foi 20 mg/kg e a medida dos parâmetros avaliados foi feita 24 h após administração do PQ. Com relação à dose, trabalhos da literatura mostram que diversas doses do mesmo têm sido utilizadas. Para permitir uma melhor compreensão, o Quadro 4 sumariza diversos trabalhos onde diferentes doses e modelos experimentais foram usados na avaliação da função renal. Ren *et al.* (2014), por exemplo, verificaram que a metalotioneína, um agente antioxidante e inativador de radicais livres minimiza a lesão pulmonar aguda causada pelo PQ, em camundongos, provavelmente via mecanismos de antioxidação e antiapoptose. Nesse trabalho, o PQ foi administrado, intragastricamente, na dose de 50 mg/kg e a análise foi feita 24 h após a administração. Embora o tempo de intoxicação tenha sido o mesmo, a dose foi 2,5 vezes superior à dose por nós utilizada. Novamente, deve-se salientar que no trabalho de Ren *et al.* (2014) foram utilizados camundongos diferentemente do nosso estudo, onde foram usados ratos. A diferença de espécies e de órgão-alvos de estudo (pulmão *vs* rim) pode implicar em diferenças de sensibilidade.

Quadro 4. Trabalhos da literatura usando diferentes doses e modelos experimentais para avaliação do efeito do paraquat sobre a função renal.

Modelo experimental	Dose de PQ e via de administração	Efeitos renais	Autores
Ratos Wistar	680µmol/kg, vo/108 µmol/kg, sc.	Aumento de uréia plasmática; redução na depuração de PAH.	Lock e Ishmael, 1979.
Ratos Wistar	680µmol/kg, vo/108 µmol/kg, sc.	Declínio do FU após 24 h.	Lock, 1979.
Macacos	6, 10, 16, 24, 32 e 40mg/kg, iv.	Aumento de creatinina sérica; proteinúria; poliúria (24 h).	Purser e Rose, 1979.
Camundongos C57BL/6J	2,1 mg/kg, iv.	Acúmulo de PQ no túbulo proximal.	Waddell e Marlowe, 1980.
Galinhas	25µg/g ⁻¹ , iv.	Queda do RFG e FU.	Prashad <i>et al.</i> , 1981.
Cães	25 mg/kg, iv.	Diminuição na [Na ⁺] e [K ⁺] no plasma; isquemia renal e necrose tubular.	Giri <i>et al.</i> , 1982.
Ovelhas	1, 2, 4, 8 mg/kg, veia jugular.	“Clearance” de creatinina reduzido.	Webb <i>et al.</i> , 1983.
Ratos Sprague-Dawley	0,48 a 48µmol/kg, sc.	Perda de peso e redução na ingestão de alimentos.	Dey <i>et al.</i> , 1987.
Coelhos	3 e 6 mg/kg, ip.	Redução do peso corporal e peso relativo dos rins.	Hassan <i>et al.</i> , 1989.
Camundongos ddY	120 mg/kg, ip.	Aumento de creatinina sérica e uréia; poliúria; proteinúria; hiponatremia.	Nagano <i>et al.</i> , 1992.
Camundongos ddY	60 mg/kg, ip.	Aumento do nível de ácido tiobarbitúrico.	Takenata e Goto, 1994.
Ratos Wistar	0,1; 0,33; 1,6 e 3,33 mg/kg, veia jugular e femoral.	Aumento no FU e redução de RFG.	Chan <i>et al.</i> , 1997.
Coelhos	5 mM, incubação de células do túbulo proximal.	Diminuição do nível de PAH.	Molck e Friis, 1997.
Ratos	10 mg/kg, ip.	Aumento da peroxidação lipídica renal.	Adachi <i>et al.</i> , 2000.
Babuínos	0,05 mM, incubação de células do túbulo proximal.	Aumento na atividade da enzima gama GT.	Machaalani <i>et al.</i> , 2001.
Ratos Wistar	25 mg/kg, ip.	Aumento na atividade de MPO e peroxidação lipídica, lesões tubulares.	Diniz-Oliveira <i>et al.</i> , 2006a.
Ratos Wistar	27,5 mg/kg, ip.	Alterações histológicas tubulares.	Ramírez-Zambrano <i>et al.</i> , 2007.
Ratos albinos	3,46 mg/kg, vo.	Alterações histológicas glomerulares e tubulares.	Lamfon e Al-Rawi, 2007.
Ratos Wistar	125 mg/kg, vo.	Hemorragia intersticial e depósito de colágeno.	Diniz-Oliveira <i>et al.</i> , 2009.
Camundongos C57BL/6J	10 e 50 mg/kg, ip.	Aumento na produção de radicais superóxidos.	Kurisaki e Hiraiwa, 2009.
Ratos albinos	1,5 mg/kg, ip.	Necrose glomerular e tubular.	Awadalla <i>et al.</i> , 2012.
Ratos Wistar	15, 30 e 45 mg/kg, ip.	Níveis aumentados do “stress” oxidativo renal e diminuição do “stress” antioxidante.	Rifaioğlu <i>et al.</i> , 2013.
Ratos Wistar	30 mg/kg, iv.	Aumento da creatinina, degeneração tubular e atrofia do glomérulo.	Wei <i>et al.</i> , 2014.
Ratos Wistar	20 mg/kg, ip.	Aumento na relação peso do rim/peso corporal, creatinina sérica, NGAL, degeneração glomerular e tubular.	Tan <i>et al.</i> , 2015.

5.2 Efeito do paraquat sobre o peso corporal, peso dos rins e pulmões e ingestão de água

Neste estudo, foi observado que a exposição ao PQ resultou em uma perda notável de **peso corporal**, mesmo que a intoxicação tenha tido duração de apenas um dia. Resultado muito semelhante foi relatado por Shao *et al.* (2015), os quais observaram que camundongos tratados com PQ (10 mg/kg) apresentaram uma perda acentuada de peso, um dia após a intoxicação. Outros trabalhos da literatura, utilizando diferentes tempos de intoxicação e doses diversas de PQ, também obtiveram resultados similares (Malekinejad *et al.*, 2014; Beretta *et al.*, 1981; Greenberg *et al.*, 1978). A perda de peso, por nós observada, pode ter sido consequência de alterações no equilíbrio hidroeletrólítico, uma vez que a mesma foi acompanhada de uma diminuição na **ingestão de água**, além do aumento na excreção de sódio e poliúria. De modo semelhante, Hassan *et al.* (1989) também atribuíram a redução do peso corporal à desidratação corporal e/ou à redução da ingestão de água e alimentos. Por sua vez, Dey *et al.* (1987) constataram uma diminuição de 10-15% no consumo alimentar, 24 h após a exposição. Tal efeito, possivelmente, pode ter sido causado por uma ação do PQ sobre as áreas cerebrais que controlam a ingestão de alimentos (Edmonds & Edwards, 1995).

Müller-Ribeiro *et al.* (2010) chamam a atenção para o fato de que o PQ tem ações neurotóxicas centrais que interferem no mecanismo da sede. Estes autores observaram que ratos expostos ao PQ, submetidos à privação de água por 24 h, não alteraram o consumo de água quando comparados com os ratos controle, os quais manifestaram uma forte resposta de ingestão. Desta maneira, foi proposto que o herbicida deve agir através de uma via neural que medeia exclusivamente o comportamento de beber.

A redução do peso corporal associada a uma menor ingestão de água e alimentos podem também ser consequentes a adinamia induzida pelo PQ. Tal observação foi verificada por Fahim *et al.* (2013), em que, ratos Wistar tratados diariamente por 3 semanas com PQ (10 mg/kg, ip) apresentaram dificuldade de movimentos e redução significativa da atividade motora.

Ao avaliar o peso relativo dos **rins e pulmão**, foi verificado que o PQ não afetou, de forma significativa, o peso de nenhum desses órgãos quando comparado ao peso dos órgãos dos ratos que receberam NaCl 0,9%. Com relação ao peso dos rins, os dados da literatura são controversos. Assim como em nosso estudo, existem trabalhos em que nenhuma alteração do peso dos rins foi detectada (Dikshith *et al.*, 1979; Lock *et al.*, 1979; Ecker *et al.*, 1975). Observação oposta foi relatada por Hassan *et al.* (1989) que observaram uma redução no peso dos rins em resposta ao PQ entre o 1° e 3° dias de intoxicação. Mais controverso ainda, foi a

observação de Tan *et al.* (2015), os quais verificaram um aumento na razão peso do rins/peso corporal. Essa discrepância entre os resultados relatados, possivelmente, podem ser devido aos diferentes modelos experimentais usados, com doses e tempo de exposição variáveis. Com relação ao peso do pulmão, os nossos dados também estão em desacordo com a observação de Fisher *et al.* (1975) de que houve um ganho de, aproximadamente, 7% no peso dos pulmões, após 24 h de exposição ao PQ. Cabe ressaltar, que o pulmão é considerado um dos principais órgão-alvo da intoxicação por PQ (Choi *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013; Kimbrough & Linder, 1973) com consequente edema pulmonar nas primeiras horas de exposição (Nordquist *et al.*, 1995).

5.3 Avaliação da função renal

Para investigar os efeitos do PQ sobre a função renal dos ratos nos diferentes grupos experimentais, amostras de sangue e urina foram coletadas 24 h após a intoxicação.

No presente estudo, a concentração de **creatinina sérica** foi elevada significativamente pelo PQ quando comparada ao grupo controle. Aumentos similares no nível sérico de creatinina, num período de 12-24 h, vêm sendo relatado em outros estudos com humanos (Mohamed *et al.*, 2015a; Roberts *et al.*, 2011; Gil *et al.*; 2009; Oreopoulos *et al.*, 1968). Tal alteração pode ser justificada por uma deterioração renal progressiva que seria um reflexo direto da toxicidade do PQ sobre o órgão (Pond *et al.*, 1993), já que a creatinina é mantida em nível constante no sangue (Wei *et al.*, 2014).

Um pequeno aumento na creatinina sérica representa um declínio substancial no RFG (Endre *et al.*, 2011). Os dados deste estudo mostram que simultaneamente ao aumento da creatinina plasmática houve uma queda do **RFG** após exposição ao PQ. A redução do RFG provavelmente foi devido às alterações hemodinâmicas renais decorrentes da perda de fluidos (Lock & Ishmael, 1979) ou da redução no fluxo sanguíneo glomerular conforme sugerido por Chan *et al.* (1997) e Giri *et al.* (1982). Também em consonância com nossos dados, está o trabalho recente de Tan *et al.* (2015), os quais mostraram que o PQ, em ratos, além de aumentar a creatinina plasmática, também aumentou a microalbuminúria. O aumento destes elementos são indicativos de lesão glomerular. Embora não tenha sido mensurado, nesse estudo, uma redução no fluxo plasmático renal (FPR) poderia indiretamente ser responsável pela queda do RFG. Alguns estudos sugerem que o PQ possa alterar o FPR já que o mesmo foi capaz de reduzir a depuração do ácido para-amino-hipúrico (PAH) (Molck & Friis, 1997; Chan *et al.*, 1997; Lock, 1979; Ecker *et al.*, 1975), marcador clássico usado para determinação

do FPR. Estas observações indicam que o herbicida pode causar mudanças intrínsecas na hemodinâmica renal (Lock, 1979).

Relatos recentes têm considerado que o rápido aumento da creatinina, após a intoxicação com PQ, pode não ser exclusivamente devido à redução do RFG, mas também consequente a uma demanda energética maior exigida pelo “stress” oxidativo induzido pelo PQ, o que potencializaria os danos ao tecido renal (Mohamed *et al.*, 2015a; Wysocki *et al.*, 2014).

Uma deficiência renal exacerba o acúmulo de PQ nos órgãos, uma vez que ocorre redução em sua depuração (Tomita *et al.*, 2006). Esta pode se tornar 10 - 20 vezes menor (Bismuth *et al.*, 1990) e a concentração sérica do PQ pode aumentar em até 5 vezes (Chan *et al.*, 1998). Essa interpretação é sustentada pelos dados anteriormente obtidos por Purser & Rose (1979) que, após administrar diferentes doses de PQ, em macacos, observaram que o “clearance” renal do herbicida foi elevado nas primeiras 10 h, o qual foi reduzido, acentuadamente, após 14 h, fato sugestivo de uma falência renal. Esta, então, retarda a eliminação do PQ e agrava ainda mais o potencial da lesão. Cabe ressaltar que o “clearance” do PQ excede o “clearance” de creatinina quando as funções renais estão preservadas (Wei *et al.*, 2014).

Nesse estudo, as alterações nos parâmetros renais, observadas na intoxicação pelo PQ, são características de uma injúria renal. Em consonância com nossos resultados, muitos outros estudos têm relatado que a intoxicação aguda por PQ leva a um quadro de IRA (Jin *et al.*, 2015; Mohamed *et al.*, 2015b; Pavan, 2013; Kan *et al.*, 2012; Seok *et al.*, 2012; Purser e Rose, 1979; Oreopoulos *et al.*, 1968) caracterizada por um declínio rápido da função renal onde se observa aumento da creatinina sérica e queda do RFG (Singh *et al.*, 2012).

Ao analisar o FU, verifica-se que o grupo PQ apresentou uma significativa diurese quando comparado ao grupo que recebeu NaCl 0,9%. A poliúria é uma característica da intoxicação, nas primeiras 24 h, seguida por uma redução do FU às 48 h (Purser & Rose, 1979) e, posteriormente, anúria (Leroy *et al.*, 1982; Kodagoda *et al.*, 1973). Acredita-se que em consequência à diurese, ocorra uma redução do volume plasmático com subsequentes mudanças hemodinâmicas (Chan *et al.*, 1998).

Um aumento significativo na FE_{H_2O} também foi observado no grupo PQ. Esse aumento é um reflexo da intensa diurese e da redução do RFG observados no grupo PQ. O aumento desse parâmetro se justifica por ser uma variável diretamente proporcional ao FU e inversamente proporcional ao “clearance” de creatinina.

O aumento na excreção urinária de proteínas ou **proteinúria** é um reflexo da alteração na integridade da estrutura glomerular e tubular. Os principais mecanismos responsáveis pela mesma são o aumento na permeabilidade dos capilares glomerulares e deficiência na reabsorção de proteínas pelos túbulos proximais (D'Amico & Bazzi, 2003). Similarmente ao observado para outros parâmetros renais, o PQ provocou um aumento acentuado na excreção urinária de proteínas, 24 h após a exposição. Nosso resultado está de acordo com outros dados já relatados na literatura. Por exemplo, a ocorrência de proteinúria foi observada em humanos (Song *et al.*, 2011; Lheureux *et al.*, 1995; Varizi *et al.*, 1979). Segundo Nagano *et al.* (1992), a intoxicação de camundongos aumentou a proteinúria devido a danos na barreira glomerular causados por espécies reativas de oxigênio geradas em resposta ao PQ.

Pela análise das FE_{Na^+} e FE_{K^+} , verifica-se que o PQ aumentou tanto a fração de excreção do sódio, quanto a de potássio. Este efeito pode ser devido a uma diminuição na reabsorção dos mesmos devido a lesões tubulares produzidas pelo PQ. No trabalho de Nagano *et al.* (1992) foi sugerido que a poliúria associada ao aumento da depuração de eletrólitos se deve à redução de reabsorção nos túbulos, principalmente, nos túbulos proximais (Serra *et al.*, 2003; Varizi *et al.*, 1979) que têm capacidade de acumular PQ (Molck & Friis, 1997).

A nefrotoxicidade parece ser restrita ou predominante no túbulo proximal onde ocorre secreção do PQ (Ecker *et al.*, 1975). Waddell & Marlowe (1980) verificaram que 24 h após a administração intravenosa de PQ, o mesmo se encontrava em grandes quantidades nesse túbulo. Mais tarde, Bairaktari *et al.* (1998), avaliou a urina, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, de 2 pacientes intoxicados com PQ. Com os resultados, os autores associaram a lesão tubular proximal com proteinúria, glicosúria, aminoacidúria, acidúria, fosfatúria e alterações na concentração eletrolítica sérica. Cabe enfatizar que as alterações estruturais interferem diretamente na função normal dos túbulos, ocasionando prejuízos, principalmente, na região onde ocorre reabsorção.

A presença da enzima **gama GT** na urina é considerada um indicador de lesão tubular. Em nosso estudo foi constatado que o PQ aumenta a excreção urinária da gama GT, quando comparada aos grupos que receberam apenas NaCl 0,9% sugerindo, portanto, a ocorrência de dano tubular renal. Resultado similar foi obtido por Machaalani *et al.* (2001) que relataram, em babuínos, um aumento na expressão dessa enzima em células tubulares proximais em cultura incubadas com solução de PQ (0,05 mM), por 90 min, a 37 °C. Os autores ainda ressaltaram, nesse trabalho, que as células do túbulo proximal são mais suscetíveis à toxicidade do PQ em comparação com células do túbulo distal.

Em nosso estudo, o PQ, por si só, não afetou o C_{osm} nem C_{H_2O} , quando comparado ao grupo NaCl (Controle, NaCl 0,9%). Nenhum trabalho relatando o efeito do PQ, sobre tais parâmetros, foi encontrado na literatura disponível. Porém, pelos nossos resultados, pode-se especular que o PQ não apresenta efeito significativo ou detectável sobre a reabsorção de água nos ductos coletores.

A **análise histológica dos rins**, no presente estudo, mostra que o PQ não produziu alterações detectáveis, apresentando aspecto morfológico normal com preservação das estruturas renais semelhante ao observado nos rins dos ratos do grupo NaCl (Controle, NaCl 0,9%). Em desacordo com nossa observação, está o trabalho de Rifaioğlu *et al.* (2013), os quais observaram que o PQ (30 mg/kg, 24 h após intoxicação), em ratos, produziu alterações degenerativas do túbulo proximal e hemorragia, enquanto que na dose de 45 mg/kg, tal quadro foi agravado pois ainda induziu necrose glomerular. Observação semelhante à de Rifaioğlu *et al.* (2013) já havia sido relatada por Ramírez-Zambrano *et al.*, em 2007, onde verificaram que o PQ (27,5 mg/kg, 24 h pós-PQ), também em ratos, induziu necrose tubular aguda caracterizada por perda da borda apical das células epiteliais, que ainda apresentavam citoplasma vacuolizado e mitocôndrias edemaciadas. As razões para as discrepâncias entre esses trabalhos e os dados obtidos em nosso estudo não são compreendidas já que: i) também usaram ratos, ii) pelo menos uma das doses utilizada foi próxima à por nós utilizada e iii) o tempo de intoxicação foi o mesmo (24 h). De qualquer forma, as doses usadas pelos autores foram superiores à por nós utilizada, mesmo considerando a dose de PQ de 27,5 mg/kg (Ramírez-Zambrano *et al.*, 2007), comparada a 20 mg/kg (dose utilizada em nosso trabalho). A menor dose aqui usada poderia, pelo menos em parte, explicar as discrepâncias entre os dados obtidos.

Em resumo, os resultados até aqui discutidos, mostram que o PQ produz danos na função renal, danos estes, já instalados 24 h após a intoxicação.

5.4 Avaliação dos mecanismos envolvidos na toxicidade do paraquat

De um modo geral, os mecanismos envolvidos na ação tóxica do PQ podem ser resumidos em reações ciclo redox que compreendem a geração de ânions superóxidos e levam à formação de agentes altamente tóxicos: i) *oxidação do NADPH celular*, ii) *peroxidação lipídica* e iii) *inflamação* (Ranjbar, 2014; Suntres *et al.*, 2002). A geração de EROs e a inflamação desempenham um papel crucial no desenvolvimento dos danos teciduais

induzidos pelo PQ por aumentar a adesão e infiltração de neutrófilos e promover a produção e secreção de macrófagos (Toygar *et al.*, 2015).

Para investigar o envolvimento de tais mecanismos, em nosso estudo, neutrófilos e macrófagos no tecido renal foram mensurados, indiretamente, através da determinação da atividade das enzimas **MPO** e **NAG**, respectivamente. Inexplicavelmente, a atividade de MPO renal não foi detectada em nenhum dos grupos experimentais, nem mesmo no grupo NaCl (Controle, NaCl 0,9% apenas). Utilizando protocolo semelhante para dosagem de MPO, Diniz-Oliveira *et al.* (2006b) observaram que a atividade da MPO foi marcadamente elevada nos rins de animais expostos ao PQ (25 mg/kg, ip), por 26 h, reflexo indireto da infiltração de leucócitos polimorfonucleares no órgão durante a reação inflamatória.

É importante salientar que a técnica utilizada na dosagem da MPO é capaz de detectar sua atividade no tecido renal até em animais sadios, não submetidos a qualquer tratamento. Tal dosagem pode ser conferida em outros trabalhos (Portella, 2010; Diniz-Oliveira *et al.*, 2006a; Pompermayer *et al.*, 2005). Por isso, em nosso estudo, não se pode descartar a possibilidade de que a enzima MPO, no tecido renal, tenha sido inativada. Portanto, é indispensável que nova dosagem da enzima seja feita em amostra do mesmo tecido renal que se encontra armazenado.

A pesquisa, no tecido renal, de atividade da NAG, uma enzima lisossômica intracelular liberada por macrófagos durante o processo inflamatório crônico, mostrou que o PQ não foi capaz de alterá-la, significativamente, quando comparada à atividade no grupo que recebeu apenas NaCl 0,9%, o que indica não haver, portanto, o influxo de macrófagos para o tecido renal na intoxicação pelo PQ. Diferentemente, Tan *et al.* (2015) relataram que o PQ desencadeia um processo inflamatório que resulta em um aumento de proteases lisossomais, entre as quais, a NAG. No entanto, a avaliação da atividade dessa enzima foi feita 48 h após a intoxicação e não 24 h, como em nosso estudo. O tempo pós-PQ mais prolongado poderia explicar a diferença entre os resultados obtidos. Com 24 h, os danos renais seriam mais precoces e a migração de macrófagos para o rim ainda não teria sido afetada pelo PQ. Segundo Gillitzer & Goebeler (2001), os macrófagos possuem ação lenta se comparados aos neutrófilos, por isso, são recrutados para o local da inflamação mais tardiamente.

Por fim, a análise da **peroxidação lipídica**, que é caracterizada por uma deteriorização oxidativa dos lipídeos poliinsaturados (Suntres, 2002) mostra uma correlação entre a exposição ao PQ e o aumento da peroxidação, uma vez que a concentração de hidroperóxido lipídico (LOOH), marcador da peroxidação lipídica, foi significativamente aumentada após a intoxicação. Já em 1975, especulava-se que a peroxidação lipídica era um mecanismo

bioquímico envolvido na toxicidade do PQ (Bus *et al.*, 1975) e que as EROs produzidas, em resposta ao herbicida, reagem com a membrana fosfolipídica causando danos celulares e nefrotoxicidade (Hannemann & Baumann, 1988). Adicionalmente, Takenata & Goto (1994) verificaram, em camundongos ddY, que o aumento da peroxidação lipídica ocorre gradualmente e atinge o nível máximo 12 h após a administração do herbicida (60 mg/kg). Diversos outros trabalhos têm reportado o aumento da peroxidação lipídica em resposta ao PQ, tanto *in vivo* (Diniz-Oliveira *et al.*, 2006a; Hauck *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002; Adachi *et al.*, 2000), quanto *in vitro* (Senator *et al.*, 2004).

Em resumo, a peroxidação lipídica, causada pelo PQ, pode desempenhar um importante papel na disfunção renal (Kurisaki & Hiraiwa, 2009) podendo correlacionar-se com as respostas inflamatórias secundárias ao dano (Ogata & Manabe, 1990).

5.5 Avaliação do tratamento com angiotensina (1-7) dos danos renais causados pelo paraquat

A Ang (1-7) é um peptídeo endógeno que desempenha um papel importante na regulação da hemodinâmica e função tubular renais (Silva *et al.*, 2013). Amplamente expressa nas estruturas renais como túbulos proximais (Wilson *et al.*, 2015), túbulos distais e ductos coletores (Ferrario *et al.*, 2002), a Ang (1-7) possui níveis intra-renais regulados de acordo com as necessidades homeostáticas. A maioria dos efeitos da Ang (1-7) são opostos aos efeitos da Ang II, mas os seus efeitos renais nem sempre se contrapõem aos do octapeptídeo (Simões e Silva & Flynn, 2012).

No presente estudo, a administração de Ang (1-7), por si só, não afetou o FU, nem o BH. Já sobre a **ingestão de água**, a Ang (1-7) teve um efeito paradoxal promovendo um efeito dipsogênico (aumento) e antidipsogênico (redução) nos grupos NaCl - Ang (1-7)₁₀ e NaCl - Ang (1-7)₅₀, respectivamente. Tais observações não encontram suporte na literatura. Nos trabalhos disponíveis e que relatam o efeito da Ang (1-7) sobre a ingestão de água foi verificado que a mesma não produz qualquer efeito sobre tal parâmetro (Gironacci *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2003). Resultado similar também foi relatado por Pinheiro *et al.* (2009), em camundongos C57BL/6J Knockout-Mas e C57BL/6J Wildtype-Mas. No entanto, no grupo PQ - Ang (1-7)₁₀, comparado ao grupo NaCl - Ang (1-7)₁₀, a ingestão de água foi totalmente bloqueada (PQ impediu o aumento produzido pela Ang (1-7) e reduziu a zero a ingestão de água basal). Para efeito de comparação, Müller-Ribeiro *et al.* (2010) relatou que o PQ atenuou

a ação dipsogênica da Ang II, quando administrados ao mesmo tempo por via intracerebroventricular em ratos.

Com relação ao **FU** e em discordância com nossos dados, Santos *et al.* (1996) verificaram que a Ang (1-7) induziu antidiurese em ratos submetidos a uma sobrecarga hídrica, a qual estava associada a uma redução do “clearance da creatinina”. Efeito antidiurético semelhante foi relatado por Simões e Silva *et al.* (1998) que observaram que a infusão crônica do antagonista de receptor Mas, A-779, produziu um aumento dose-dependente na diurese. Uma possível razão para a discrepância entre os trabalhos seria: i) no nosso trabalho, os ratos estavam com livre acesso à água, ii) no trabalho de Santos *et al.* (1996), uma sobrecarga de água foi imposta aos animais antes da administração de Ang (1-7) e iii) no trabalho de Simões e Silva *et al.* (1998), os animais foram implantados com bombas osmóticas (contendo o A-779), o que implica em liberação lenta e contínua do antagonista, o que pode levar a resultados distintos pelo aspecto “crônico” da inibição dos receptores de Ang (1-7).

No presente estudo, a Ang (1-7) (50 µg/kg), por si só, reduziu o **RFG** e, como consequência, aumentou a FE_{H_2O} , já que o FU não foi afetado, significativamente. Em concordância, está o trabalho de Santos *et al.* (1996) que observaram que a Ang (1-7) reduziu o “clearance” de creatinina (\downarrow RFG) em ratos, sugerindo que a Ang (1-7) participa no controle do balanço hídrico por influenciar a excreção de água. A Ang (1-7), nas doses utilizadas, não interferiu na queda do RFG produzida pelo PQ. Igualmente, a Ang (1-7) não interferiu na **proteinúria** eliciada pelo PQ. Estas observações sugerem que os danos na filtração glomerular causados pelo herbicida não estão relacionados às vias de sinalização das ações da Ang (1-7). No entanto, e contrários aos nossos resultados, alguns estudos têm mostrado que a Ang (1-7) reduz o dano glomerular em animais diabéticos (Shi *et al.*, 2015; Papinska *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013) indicando uma influência benéfica da mesma. Esse efeito renoprotetor parece estar associado à redução de EROs (Kim *et al.*, 2012), via atenuação da atividade da NADPH oxidase, maior fonte de produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Benter *et al.*, 2008) e a uma melhora do processo inflamatório (Mori *et al.*, 2014). Apesar de alguns trabalhos, como o de Gonzalez *et al.* (2002), que mostrou que a administração aguda de Ang (1-7) aumenta a produção de tiobarbitúrico, um marcador de dano oxidativo, muitos estudos têm sugerido que a Ang (1-7) seja um potencial terapêutico em modelos de lesão renal (Shi *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015; Mori *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2014). Em um modelo de isquemia renal bilateral seguida por reperfusão, a administração do agonista AVE099 induziu uma renoproteção significativa, apresentando diminuição da creatinina sérica e das lesões

histológicas, além de uma redução do infiltrado inflamatório no rim e pulmão (Barroso *et al.*, 2012). Alguns relatos preconizam que a Ang (1-7) pode atenuar a lesão por aumentar o “clearance” de creatinina (Zhang *et al.*, 2014) e reduzir alguns parâmetros renais como a proteinúria (Silveira *et al.*, 2013; Giani *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010), fluxo urinário e fração de excreção de Na^+ (Pinheiro *et al.*, 2009). Similarmente, a Ang (1-7) perfundida em rins isolados e intactos de ratos Sprague-Dawley resultou em um aumento do RFG e da excreção de água e eletrólitos (Hilchey & Bell-Quilley, 1995; Dellipizzi *et al.*, 1994). Em consonância com tais observações, a administração crônica do antagonista seletivo de Ang (1-7), A779, produziu diurese e natriurese em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR) (Simões e Silva *et al.*, 1998). Já com relação ao K^+ , os dados são controversos. Enquanto Dellipizzi *et al.* (1994) relataram que a Ang (1-7) induz caliurese em ratos Sprague-Dawley, Pinheiro *et al.* (2009) não observaram alteração significativa na excreção de K^+ por camundongos C57BL/6J Knockout-Mas quando comparados à excreção por C57BL/6J Wildtype-Mas. Em nosso trabalho, no entanto, a Ang (1-7), por si só, não afetou a FE_{Na^+} , nem a FE_{K^+} nas 2 doses utilizadas. Também não modificou o aumento nas frações de excreção de Na^+ e K^+ induzido pelo PQ. Conjuntamente, os nossos dados indicam que a Ang (1-7), por si só, ou associada ao PQ, sob as nossas condições como a utilização de doses únicas administradas isoladamente ou após um período curto de intoxicação (4 h) com PQ e o curto período de ação pós-intoxicação (20 h) pode não ter favorecido a detecção de algum possível efeito do heptapeptídeo.

Em nosso estudo, o C_{osm} não foi afetado pelo PQ e a Ang (1-7), *per se*, ou associada ao PQ também não exibiu qualquer efeito sobre tal parâmetro. Porém, a Ang (1-7) (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), por si só, tornou o $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}}$ mais negativo quando comparado ao grupo NaCl (Controle, NaCl 0,9%) indicando que o peptídeo aumenta a reabsorção de água livre. Segundo Ferreira *et al.*, (2006), ratos transgênicos que superexpressam Ang (1-7) apresentam uma menor depuração de água livre ($\text{C}_{\text{H}_2\text{O}}$ mais negativo), o que está de acordo com a nossa observação. Ainda neste estudo, foi observado que o efeito da Ang (1-7) foi prontamente revertido pelo PQ. Pode-se especular que o PQ interfere com algum dos mecanismos acionados pela Ang (1-7) para aumentar a reabsorção de água nos ductos coletores. Estes mecanismos poderiam estar relacionados a elementos como vasopressina, aquaporinas, gradiente medular concentrado, transporte de soluto no ramo ascendente da alça de Henle, etc. No entanto, uma dessas possibilidades, um possível aumento da vasopressina, é contestada por trabalhos da literatura que relatam que a Ang (1-7) parece não influenciar os níveis plasmáticos desse hormônio. Em um desses trabalhos (Ferreira *et al.*, 2006) foi verificado que a maior reabsorção de água livre

em ratos transgênicos que superexpressam Ang (1-7) não encontra paralelismo a um aumento na vasopressina plasmática. Neste trabalho e no de Santos *et al.* (1996), os níveis plasmáticos desse hormônio não se encontram alterados. Nenhum trabalho fazendo associação entre os outros possíveis mecanismos e a Ang (1-7) foi encontrado na literatura.

Conforme já discutido anteriormente (item 5.4), a atividade de **MPO** renal, de forma inexplicável, não foi detectada em nenhum dos grupos experimentais, nem mesmo no grupo NaCl (Controle, NaCl 0,9% apenas). Assim, qualquer possível efeito da Ang (1-7) sobre essa enzima também não pode ser avaliado. As possíveis razões para a não detecção da enzima estão discutidas no item 5.4.

Neste estudo, a Ang (1-7), por si só, ou associada ao PQ não produziu qualquer alteração significativa sobre os níveis renais de **NAG**. Porém, alguns estudos têm demonstrado que o eixo ECA2-Ang (1-7)-Mas pode influenciar as respostas inflamatórias modulando a migração de leucócitos, a liberação de citocinas e as vias fibróticas (Silva *et al.*, 2013). Desse modo, foi descrita uma capacidade notável da Ang (1-7) em reduzir tanto a fibrose renal, via diminuição do fator de transcrição NF-kB (Giani *et al.*, 2011), como a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6 (Souza e Costa-Neto, 2012). Cabe ressaltar que na intoxicação por PQ, o NF-kB renal e as citocinas TNF- α e a IL-6 séricas estão elevados (Tan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013). Nesse estudo, nenhuma citocina, plasmática ou renal, foi quantificada. Mas, como o PQ não causou nenhuma alteração da NAG renal poderia se supor que as citocinas, principalmente renais, também não teriam sido afetadas pelo herbicida nas condições aqui utilizadas. Em contrapartida, deve-se levar em consideração que o método de dosagem da NAG pode não ser tão sensível e, assim, a presença de um pequeno número de leucócitos no tecido renal implicaria em pequena quantidade de enzima, a qual poderia não ser detectada. Já as citocinas liberadas por um possível efeito do PQ talvez pudessem ser detectadas já que os métodos de mensuração das mesmas são muito sensíveis. Em face disso, a quantificação de algumas citocinas se torna bastante relevante e recomendável. O mesmo raciocínio se aplica para a ausência de efeito da Ang (1-7), nesse estudo.

Pelo que foi discutido até aqui, ficou constatado que a maioria dos parâmetros analisados e que foram afetados pelo herbicida, não foram influenciados pela Ang (1-7) sob as condições utilizadas. Por isso, ao avaliar o possível efeito terapêutico do heptapeptídeo foi, de certa forma, surpreendente o fato de que a Ang (1-7): i) na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, bloqueou o aumento na excreção urinária da enzima gama GT induzido pelo PQ e ii) na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ inibiu parcialmente o aumento na concentração de peróxidos de lipídeo no tecido renal em

resposta ao PQ. Cabe ressaltar que a Ang (1-7), na dose de 50 µg/kg (grupo PQ - Ang (1-7)50) não teve qualquer efeito sobre o aumento da excreção urinária da enzima gama GT observado no grupo PQ. Como na dose de 10 µg/kg a Ang (1-7) mostrou-se eficaz, poder-se-ia esperar que na dose de 50 µg/kg, o heptapeptídeo ainda exibesse algum efeito sobre a elevação, induzida pelo PQ, na excreção urinária da enzima. Porém, assim como em nosso estudo, outros trabalhos têm relatado resultados conflitantes com relação a doses de Ang (1-7) utilizadas. Jiang *et al.* (2013) relataram que a infusão de Ang (1-7) (0,1, 1,1 e 11,1 nmol, via intracerebroventricular), em ratos normotensos e SHR, produziu efeitos distintos também dependentes da dose. Nas doses de 1,1 e 11,1 nmol, a Ang (1-7) diminuiu a expressão de Ang II e receptores AT1 e os níveis de malondialdeído no cérebro dos animais de ambas as linhagens. Ao contrário, a Ang (1-7) aumentou a expressão da enzima superóxido dismutase somente na dose de 11,1 nmol, sem que a dose de 1,1 nmol apresentasse aí qualquer efeito. De forma similar, Zhang *et al.* (2010) ao utilizar diferentes doses de Ang (1-7) (144, 288 e 576 µg/kg) em um modelo de glomerulonefrite induzida com anticorpo monoclonal anti-Thy-1, mostraram que a dose 576 µg/kg foi capaz de aumentar o volume urinário e reduzir a proteinúria observada nesse modelo.

Embora o aumento da enzima **gama GT** urinária seja um marcador de lesão tubular, não podemos descartar a hipótese de que esse aumento também possa representar um aumento no “stress” oxidativo. Segundo Radovanovic *et al.* (2014), em humanos, há uma correlação entre a gama GT sérica e a deficiência cardiovascular crônica, onde ocorre disfunção endotelial e remodelamento ventricular. Esses distúrbios, por sua vez, estão relacionados com “stress” oxidativo. Assim, os autores sugerem que o aumento da atividade da gama GT sérica pode ser usada como um marcador de aumento do “stress” oxidativo em humanos.

É importante lembrar que em nosso estudo foi avaliada a gama GT na urina e não no soro. A gama GT urinária, acredita-se, tem origem tubular e, por isso, não se pode descartar que seu nível aumentado possa ser indicativo de aumento do “stress” oxidativo no tecido renal. Como discutido acima, a Ang (1-7) exibe efeito antioxidativo, o que poderia explicar o bloqueio do aumento da atividade de gama GT induzida pelo PQ.

No presente estudo, a Ang (1-7) (50 µg/kg), inibiu parcialmente o aumento na concentração do **hidroperóxido renal** induzido pelo PQ. Novamente, o efeito antioxidante da Ang (1-7) tem sido confirmado por outros trabalhos recentes. Um deles mostrou que a injúria renal no diabetes induzido pela estreptozomicina foi melhorada pela Ang (1-7) de forma dose-dependente. Os autores atribuíram esse efeito a uma redução do “stress” oxidativo avaliada pela queda nos níveis de malondialdeído, um marcador de peroxidação lipídica (Zhang *et al.*,

2014). Em consonância, Mori *et al.* (2014) verificaram que em camundongos dB/dB (modelo de diabetes tipo 2 que apresenta nefropatia diabética), a administração de Ang (1-7) através de bombas osmóticas, por 28 dias, melhorou a nefropatia por reduzir a inflamação, o “stress” oxidativo, a fibrose e a lipotoxicidade renal.

Em conjunto, os dados desse estudo mostram que o PQ induz injúria renal, pois altera a maioria dos parâmetros renais avaliados. No entanto, a Ang (1-7), sob condições utilizadas (doses, tempo de tratamento), não foi capaz de modificar a maioria dessas alterações. Contudo, as observações de que a Ang (1-7) bloqueou o aumento da excreção urinária da enzima gama GT e inibiu, parcialmente, o aumento da peroxidação lipídica renal induzida pelo herbicida indicam que tal peptídeo pode ter um efeito protetor em lesões renais similares aquelas evocadas pelo PQ.

6 CONCLUSÃO

- **O herbicida paraquat induz injúria renal**, pois alterou os parâmetros renais como filtração glomerular e excreção de água e eletrólitos;

- **A Angiotensina (1-7) não foi capaz de modificar a maioria das alterações produzidas pelo paraquat**, pois o tratamento com o peptídeo não produziu qualquer alteração sobre os parâmetros renais, tais como, creatinina, excreção urinária de proteínas e eletrólitos, sob as condições utilizadas nesse estudo;

- **A Angiotensina (1-7) pode exibir um efeito protetor contra as lesões evocadas pelo paraquat**, uma vez que bloqueou o aumento da excreção urinária da enzima gama GT e inibiu, parcialmente, o aumento da peroxidação lipídica renal diante da exposição ao herbicida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, J.; TOMITA, M.; YAMAKAWA, S.; ASANO, M.; NAITO, T.; UENO, Y. 7-Hydroperoxycholesterol as a marker of oxidative stress in rat kidney induced by paraquat. **Free Radical Research**, v.33, n.3, p.321-327, 2000.

AFZALI, S.; GHOLYAF, M. The effectiveness of combined treatment with methylprednisolone and cyclophosphamide in oral paraquat poisoning. **Archives of Iranian Medicine**, v.11, n.4, p.387-391, 2008.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mechanism and applications of the fenton reaction assisted by iron-reducing phenolic compounds. **Química Nova**, v.30, n.3, 2007.

AHMAD, I.; SHUKLA, S.; KUMAR, A.; SINGH, B.K.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.K.; SINGH, D.; PANDEY, H.P.; SINGH, C. Biochemical and molecular mechanisms of N-acetyl cysteine and silymarin-mediated protection against maneb- and paraquat-induced hepatotoxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.201, n.1, 2013.

AIRES, R.D.; CAPETTINI, L.S.; SILVA, J.F.; RODRIGUES-MACHADO, M.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M.; CORTES, S.F.; LEMOS, V.S. Paraquat poisoning induces TNF- α -dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats. **Plos One**, v.8, n.9, 2013.

ALURAL, B.; OZERDEM, A.; ALLMER, J.; GENÇ, K.; GENÇ, S. Lithium protects against paraquat neurotoxicity by NRF2 activation and miR-34a inhibition in SH-SY5Y cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2015.

AWADALLA, E.A. Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.64, p.431-434, 2012.

BAIRAKTARI, E.; KATOPODIS, K.; SIAMOPOULOS, K.C.; TSOLAS, O. Paraquat-induced renal injury studied by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. **Clinical Chemistry**, v.44, n.6, p.1256-1261, 1998.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of Leukocyte Biology**, v.78, 2005.

BARROSO, L.C.; SILVEIRA, K.D.; LIMA, C.X.; BORGES, V.; BADER, M.; RACHID, M.; SANTOS, R.A.S.; SOUZA, D.G.; SIMÕES E SILVA, A.C.; TEIXEIRA, M.M. Renoprotective effects of AVE0991, a nonpeptide Mas receptor agonist, in experimental acute renal injury. **International Journal Hypertension**, 2012.

BELO, A.V.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA, M.A.N.D.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. **Life Sciences**, v.74, n.23, p.2827-2837, 2004.

BENTER, I.F.; YOUSIF, M.H.; DHAUNSI, G.S.; KAUR, J.; CHAPPELL, M.C.; DIZ, D.I.

Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. **American Journal of Nephrology**, v.28, n.1, p.25-33, 2008.

BERETTA, G.; FADINI, L.; MONTESISSA, C.; POMPA, G. Membrane lipid composition of subcellular fractions from lungs of rats treated with paraquat. **Pharmacological Research Communications**, v.13, p.433-442, 1981.

BERTRAM, A.; HAENEL, S.; HADEM, J.; HOEPER, M.M.; GOTTLIEB, J.; WARCEKE, G.; KASCHINSKI, S.; HAFER, C.; KÜHN-VELTEN, N.; GÜNTHER, D.; KIELSTEIN, J. Tissue concentration of paraquat on day 32 after intoxication and failed bridge to transplantation by extracorporeal membrane oxygenation therapy. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v.14, n.45, 2013.

BISMUTH, C.; GARNIER, R.; BAUD, F.J.; MUSZYNSKI, J.; KEYES, C. Paraquat poisoning: a overview of the current status. **Drug Safety**, v.5, p.243-251, 1990.

BLANCO-AYALA, T.; ANDÉRICA-ROMERO, A.C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radical Research**, v.48, n.6, p.623-640, 2014.

BORGES, E.L.; DE BARROS PINHEIRO, M.; PRATA, L.O.; SALES, W.A.; SILVA, Y.A.; CALIARI, M.V.; RODRIGUES-MACHADO, M.G. Effect of lung fibrosis on glycogen content in different extrapulmonary tissues. **Lung**, v.192, n.1, p.125-131, 2014.

BOTELHO-SANTOS, G.A.; SAMPAIO, W.O.; REUDELHUBER, T.L.; BADER, M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A.S. Expression of an angiotensin-(1-7) producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.292, p.2485-2490, 2007.

BÜRGELOVÁ, M.; KRAMER, H.J.; TEPLAN, V.; THUMOVÁ, M.; CARONERVENKA, L.S. Effects of angiotensin-(1-7) blockade on renal function in rats with enhanced intrarenal Ang II activity. **Kidney International**, v.67, p.1453-1461; 2005.

BUS, J.S.; AUST, S.D.; GIBSON, J.E. Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. **Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology**, v.11, n.1, p. 31-38, 1975.

CAPETTINI, L.S.A., CORTES, S.F.; GOMES, M.A.; SILVA, G.A.B.; PESQUERO, J.L.; LOPES, M.J.; TEIXEIRA, M.M.; LEMOS, V.S. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology**, v.295, p.2503-2511, 2008.

CASTELO-BRANCO, R.C.; LEITE-DELOVA, D.C.A.; MELO-AIRES, M. Dose-dependent effects of angiotensin-(1-7) on the NHE3 exchanger and $[Ca^{+2}]_i$ in in vivo proximal tubules. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.304, n.10, p.1258-1265, 2013.

CHAN, B.S.H.; SEALE, J.P.; DUGGIN, G.G. The mechanism of excretion of paraquat in rats. **Toxicology Letters**, v.90, p.1-9, 1997.

CHAN, B.S.H.; LAZZARO, V.A.; SEALE, J.P.; DUGGINET, G.G. The renal excretory mechanisms and the role of organic cations in modulating the renal handling of paraquat. **Pharmacology Therapy**, v.79, n.3, p.193-203, 1998.

CHAPPELL, M.C. The non-classical renin-angiotensin system and renal function. **Comprehensive Physiology**, v.2, n.4, p.2733-2752, 2012.

CHEN, C-M.; CHOU, H-C.; HSU, H-H.; WANG, L.F. Transforming growth factor- β 1 upregulation is independent of angiotensin in paraquat-induced lung fibrosis. **Toxicology**, v.216, n.2-3, p.181-187, 2005.

CHEN, Y.; ZHANG, S.; SORANI, M.; GIACOMINI, K.M. Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.332, n.2, 2007.

CHEN, J.G.; ELDRIDGE, D.L.; LODESERTO, F.J.; MING, D.Y.; TURNER, K.M.; VANDERFORD, J.L.; SPORN, T.A.; SCHULMAN, S.R. Paraquat ingestion: A challenging diagnosis. **Pediatrics**, v.125, p.1505-1509, 2010.

CHEN, J.L.; DAI, L.; ZHANG, P.; CHEN, W.; CAI, G.S.; QI, X.W.; HU, M.Z.; DU, B.; PANG, Q.F. Methylene blue attenuates acute liver injury induced by paraquat in rats. **Internacional Immunopharmacology**, 2015.

CHOI, S.C.; OH, S.; MIN, Y.G.; CHA, J.Y.; GIL, H.W.; HONG, S.Y. Evaluation of exhaled nitric oxide in acute paraquat poisoning: A pilot study. **Medical Science Monitor**, v.20, p.167-172, 2014.

COCHEME, H.M.; MURPHY, M.P. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. **Journal of Biological Chemistry**, v.238, p.1786-1798, 2008.

D'AMICO, G.; BAZZI, C. Pathophysiology of proteinuria. **Kidney International**, v.63, p.809-825, 2003.

DAMIN, F.; FRANK, B.; WIN FRIED, H.; HARTMUT, M.; LAUS, W. Failure of radiotherapy to resolve fatal lung damage due to paraquat poisoning. **Chest**, v.100, p.1146-1165, 1992.

DELIRRAD, M.; MAJIDI, M.; BOUSHEHRI, B. Clinical features and prognosis of paraquat poisoning: a review of 41 cases. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.8, n.5, p.8122-8128, 2015.

DELLIPIZZI, A.M.; HILCHEY, S.D.; BELL-QUILLEY, C.P. Natriuretic action of angiotensin(1-7). **British Journal of Pharmacology**, v.111, p.1-3, 1994.

DEY, M.S.; KRIEGER, R.I.; RITTER, R.C. Paraquat-induced, dose-dependent conditioned taste aversions and weight loss mediated by the area postrema. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.87, p.212-222, 1987.

DIKSHITH, T.S.S.; DALTA, K.K.; RAIZADA, R.B.; KUSHWAH, S.H. Effect of paraquat dichloride in male rabbits. **Indian Journal Experimental Biology**, v.17, p.926-928, 1979.

DINIS-OLIVEIRA, R.J.; DUARTE, J.A.; REMIÃO, F.; SÁNCHEZ-NAVARRO, A.; BASTOS, M.L. Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat intoxicated rats. **Toxicology**, v.227, p.73-85, 2006a.

DINIS-OLIVEIRA, R.J.; SARMENTO, A.; REIS, P.; AMARO, A.; REMIÃO, F.; BASTOS, M.L.; CARVALHO, F. Acute paraquat poisoning report of a survival case following intake of a potential lethal dose. **Pediatric Emergency Care**, v.22, n.7, 2006b.

DINIS-OLIVEIRA, R.J.; PONTES, H.; BASTOS, M.L.; REMIAO, F.; DUARTE, J.A.; CARVALHO, F. An effective antidote for paraquat poisonings: the treatment with lysine acetylsalicylate. **Toxicology**, v.255, p.187-193, 2009.

DONG, X.S.; XU, X.Y.; SUN, Y.Q.; WEI-LIU; JIANG, Z.H.; LIU, Z. Toll-like receptor 4 is involved in myocardial damage following paraquat poisoning in mice. **Toxicology**, v.312, p.115-122, 2013.

DUARTE, S. Herbicidas paraquat e diquat. **Toxicologia aplicada**, Núcleo de Estudos de Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://lcc.nutes.ufrj.br/toxicologia/regcurso.htm>

ECKER, J.L.; HOOK, J.B.; GIBSON, J.E. Nephrotoxicity of paraquat in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.34, p.178-186, 1975.

EDMONDS, B.K.; EDWARD, G.L. The area postrema is involved in paraquat-induced conditioned aversion behavior and neuroendocrine activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Brain Research**, v.712, n.1, p.127-133, 1995.

ELLIS, B.; LI, X.C.; ZHUO, J.L. Evidence for a functional intracellular angiotensin system in the proximal tubule of the kidney. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.302, n.5, p.494-509, 2012.

ENDRE, Z.H.; PICKERING, J.W.; WALKER, R.J. Clearance and beyond: the complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.301, p.697-707, 2011.

FAHIM, M.A.; SHEHAB, S.; NEMMAR, A.; ADEM, A.; DHANASEKARAN, S.; HASAN, M.Y. Daily Subacute paraquat exposure decreases muscle function and substantia nigra dopamine level. **Physiological Research**, v.62, p.313-321, 2013.

FALCÃO, M. C.; OKAY, Y.; RAMOS, J.L.A. Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration in preterm newborn infants. **Revista do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina de São Paulo**, v.54, n.4, p.121-126, 1999.

FERGUSON, D.M. Renal handling of paraquat. **British Journal of Pharmacology**, n.42, v.4, p.636, 1971.

FERRÃO, F.M.; LARA, L.S.; LOWE, J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? **World Journal of Nephrology**, v.3, n.3, p.64-76, 2014.

FERRARIO, C.M.; SMITH, R.D.; BROSNIHAN, B.; CHAPPELL, M.C.; CAMPESE, V.M.; VESTERQVIST, O. Effects of omapatrilat on the renin-angiotensin system in salt-sensitive hypertension. **American Journal Hypertension**, v.15, p.557-564, 2002.

FERRARIO, C.M.; VARAGIC, J. The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.298, n.6, p.297-305, 2010.

FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V.; CASTRO, C.H.; SILVA, G.A.; SILVA, A.C.; ALMEIDA, A.P.; BADER, M.; RENTZSCH, R.; REUDELHUBER, T.L.; SANTOS, R.A. Renal function in transgenic rats expressing an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein. **Regulatory Peptides**, v.137, n.3, p.128-133, 2006.

FISHER, H.K.; CLEMENTS, J.A.; TIERNEY, D.F.; WRIGHT, R.R. Pulmonary effects of paraquat in the first day after injection. **American Journal of Physiology**, v.228, p.1217-1223, 1975.

FRAGA-SILVA, R.A.; FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor pathway in hypertension. **Current Hypertension Reports**, v.15, p.31-38, 2013.

FRANKLIN, T.J. Therapeutic approaches to organ fibrosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.29, p.79-89, 1997.

FUKUSHIMA, T.; TANAKA, K.; LIM, H.; MORIYAMA, M. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v.7, p.89-94, 2002.

GARCIA, N.H.; GARVIN, J.L. Angiotensin 1-7 has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.5, p.1133-1138, 1994.

GAWARAMMANA, I.B.; BUCKLEY, N.A. Medical management of paraquat ingestion. **British Journal Clinical Pharmacology**, v.72, n.5, p.745-757, 2011.

GE, W.; ZHANG, Y.; HAN, X.; REN, J. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates paraquat-induced myocardial geometric and contractile alteration: role of ER stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, n.12, p.2068-2077, 2010.

GELLER, R.J. Poisoning and drug overdose. **The McGraw-Hill Global Education Holdings**, 6ed, p.344-346, 2014.

GIANI, J.F.; MUÑOZ, M.C.; PONS, R.A.; CAO, G.; TOBLLI, J.E.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.300, n.1, p.272-282, 2011.

GIL, H.W.; YANG, J.O.; LEE, E.Y.; HONG, S.Y. Clinical implication of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 in patients with acute paraquat intoxication. **Clinical Toxicology**, 2009.

GIL, H-W.; HONG, J-R.; JANG, S-H.; HONG, S-Y. Diagnostic and therapeutic approach for acute paraquat intoxication. **Journal of Korean Medicine Science**, v.29, p.1441-1449, 2014.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal Leukocyte Biololy**, v.69, p.513-521. 2001.

GIRI, S.N.; PARKER, H.R.; SPANGLER, W.L.; MISRA, H.P.; ISHIZAGI, G.; SCHIEDT, M.J.; CHANDLER, D.B. Pharmacokinetics of [14C] paraquat and associated biochemical and pathological changes in beagle dogs following intravenous administration. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.2, p.261-269, 1982.

GIRONACCI, M.M.; LONGO CARBAJOSA, N.A.; GOLDSTEIN, J.; CERRATO, B.D. Neuromodulatory role of angiotensin-(1-7) in the central nervous system. **Clinical Science**, v.125, n.2, p.57-65, 2013.

GONZALES, S.; NORIEGAA, G.O.; TOMARO, M.L.; PEÑA, C. Angiotensin-(1-7) stimulates oxidative stress in rat kidney. **Regulatory Peptides**, v.106, n.1-3, p.67-70, 2002.

GREENBERG, D.B.; REISER, K.M.; LAST, J.A. Correlation of biochemical and morphologic manifestations of acute pulmonary fibrosis in rats administered paraquat. **Chest Journal**, v.74, n.4, 1978.

GUO, H.; GAO, K.; LUO, L.; DENG, Q.; ZHANG, Y.; LUO, J.; LIU, L. Early acute liver injury in paraquat poisoning rats. **Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v.26, n.6, p.374-378, 2014.

GWATHMEY, T.M.; WESTWOOD, B.M.; CHAPPELL, M.C. Nuclear angiotensin-(1-7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.299, n.5, p.983-990, 2010.

HAN, W.; WU, D.; LIU, H.; LU, Y.; WANG, L.; HONG, G.; QIU, Q.; LU, Z. Curcumin alleviated liver oxidative stress injury of rat induced by paraquat. **Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v.32, n.5, p.352-356, 2014a.

HAN, J.; ZHANGA, Z.; YANGA, S.; WANGA, J.; YANGA, X.; TAN, D. Betanin attenuates paraquat-induced liver toxicity through a mitochondrial pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v.70, p.100-106, 2014b.

HAN, J.; MA, D.; ZHANG, M.; YANG, X.; TAN, D. Natural antioxidant betanin protects rats from paraquat-induced acute lung injury interstitial pneumonia. **Biomedical Research International**, 2015.

HANDA, R.K. Angiotensin(1-7) can interact with the rat proximal tubule AT receptor system. **American Journal of Physiology -Renal Physiology**, v.277, n.1, 1999.

HANNEMANN, J.; BAUMANN, K. Cisplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: different effects of antioxidants and radical scavengers. **Toxicology**, v.51, p.119-132, 1988.

HART, T.B.; NEVITT, A.; WHITEHEAD, A. A new statistical approach to the prognostic significance of plasma paraquat concentrations. **The Lancet**, 1984.

HASSAN, R.A.; AFZAL, M.; ALI, M.; GUBLER, C.J. Effect of paraquat administered Intraperitoneally on the nonpolar lipids of rabbits. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.17, p.47-58, 1989.

HAUCK, S.J.; AARON, J.M.; WRIGHT, C.; KOPCHICK, J.J.; BARTKE, A. Antioxidant enzymes, free-radical damage, and response to paraquat in liver and kidney of long-living growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice. **Hormone and Metabolic Research**, v.34, n.9, p.481-486, 2002.

HAULICA, I.; BILD, W.; MIBAILA, C.N.; IONITA, T.; BOISTEANU, C.P.; NEAGU, B. Biphasic effects of angiotensin (1-7) and its interactions with angiotensin II in rat aorta. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v.4, n.2, 2003.

HAWKSWORTH, G.M.; BENNETT, P.N.; DAVIES, D.S. Kinetics of paraquat elimination in the dog. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.57, p.139-145, 1981.

HILCHEY, S.D.; BELL-QUILLEY, C.P. Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I₂ release. **Hypertension**, v.25, 1238-1244, 1995.

HOLLINGER, S.W. PATWELL, J.E. ZUCKERMAN, A.B. GOREN, G. PARSONS, S.N. GIRI. Effect of paraquat on serum angiotensin converting enzyme. **American Review of Respiratory Disease.**, v.121, p.795-798, 1980.

HOSAMANI, R.; KRISHNA, G.; MURALIDHARA. Standardized Bacopa monnieri extract ameliorates acute paraquat-induced oxidative stress, and neurotoxicity in prepubertal mice brain. **Nutritional Neuroscience**, 2014.

HONG, S.Y.; YANG, J.O.; LEE, E.Y.; KIM, S.H. Effect of haemoperfusion on plasma paraquat concentration in vitro and in vivo. **Toxicology and Industrial Health**, v.19, p.17-23, 2003.

HOUZÉ, P.; BAUD, F.J.; MOUY, R.; BISMUTH, C.; BOURDON, R.; SCHERRMANN, J.M. Toxicokinetics of paraquat in humans. **Human Experimental Toxicology**, v.9, n.1, p.5-12, 1990.

ISHII, K.; ADACHI, J.; TOMITA, M.; KUROSAKA, M.; UENO, Y. Oxysterols as indices of oxidative stress in man after paraquat ingestion. **Free Radical Research**, v.36, n.2, p.163-168, 2002.

JANDAAE, E.; LASCALAA, A.; CARRESIA, C.; PARAFATIA, M.; APRIGLIANO, S.; RUSSOA, V.; SAVOIA, C.; ZIVIANIB, E.; MUSOLINOADE, V.; MORANIC, F.; ISIDOROC, C.; MOLLACE, V. Parkinsonian toxin-induced oxidative stress inhibits basal autophagy in astrocytes via NQO2/quinone oxidoreductase 2: Implications for neuroprotection. **Autophagy**, v.11, n.7, p.1063-1080, 2015.

JANG, H.E.; BAE, F.J.; HWANG, K.; KANG, Y.; YUN, S.; CHO, H.S.; CHANG, S-H.; PARK, D.J . Hemolytic uremic syndrome associated with paraquat intoxication. **Journal of Clinical Apheresis**, v.29, n.3, p.183-186, 2014.

JIANG, T.; GAO, L.; SHI, L.; LU, J.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Angiotensin-(1-7) modulates renin–angiotensin system associated with reducing oxidative stress and attenuating neuronal apoptosis in the brain of hypertensive rats. **Pharmacological Research**, v.67, p.84-93, 2013.

JIAO, Y.; LU, L.; SMEYNE, R.J. Genetic dissection of strain dependent paraquat-induced neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta. **Plos One**, v.7, n.1, 2012.

JIN, K.; GUO, L.; SHAO, M.; ZHOU, S.; LIU, B. Intensity of hemoperfusion in acute paraquat-poisoned patients and analysis of prognosis. **Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v. 24, n.4, p. 263-269, 2015.

KAN, B.T.; LIU, H.M.; JIAN, X.D.; ZHANG, W.; ZHOU, Q.; WANG, J.R. Clinical studies of dynamic changes on the renal injury indicators of acute paraquat poisoning. **Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v. 30, n.11, p.839-841, 2012.

KANG, M-S.; FIL, H-W.; YANG, J-O.; LEE, E-Y.; HONG, S-Y. Comparison between kidney and hemoperfusion for paraquat elimination. **Journal of Korean Medicine Science**, v.24, p.156-160, 2009.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, v.53, p.457-481, 1958.

KATZ, D.V.; TROSTER, E.J.; VAZ, F.A.C. Dopamine and kidney in sepsis: a systematic review. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.49, n. 3, p.317-325, 2003.

KIM, H.; LEE, S.W.; BAEK, K.M.; PARK, J.S.; MIN, J.K. Continuous hypoxia attenuates paraquat-induced cytotoxicity in the human A549 lung carcinoma cell line. **Experimental e Molecular Medicine**, v.43, p.494-500, 2011.

KIM, S.; KIM, Y.; JEONG, K.; LEE, S.; LEE, T.; IHM, C.; MOON, J. Angiotensin II-induced mitochondrial nox4 is a major endogenous source of oxidative stress in kidney tubular cells. **Plos One**, v.7, n.7, 2012.

KIMBROUGH, R.D.; LINDER, R.E. The ultrastructure of the paraquat lung lesion in the rat. **Environmental Research**, v.6, n.3, p.265-263, 1973.

KODAGODA, N.; JAYEWARDENE, R.P.; ATTYGALLE, D. Poisoning with paraquat. **Forensic Science**, v.2; p.107-111, 1973.

KURISAKI, E.; HIRAIWA, K. Western blot analysis for 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins in paraquat-treated mice. **Legal Medicine**, v.11, n.1, p.431-433, 2009.

LAMFON, H.A.; AL-RAWI, M. Effect of antox on paraquat - induced histological and biochemical changes in kidney of albino rats. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3, n.10, p.988-993, 2007.

LANG, Y-D.; CHANG, S-F.; WANG, L-F.; CHEN, C-M. Chymase mediates paraquat-induced collagen production in human lung fibroblasts. **Toxicology Letters**, v.193, n.1, p.19-25, 2010.

LEROY, J.P.; VOLANT, A.; GUEDES, Y.; BRIERE, J. Massive poisoning by paraquat with early death (19 hours). Apropos of a case with ultrastructure study. **Annals of Diagnostic Pathology**, v.2, n.4, p.332-335, 1982.

LHEUREUX, P.; LEDUC, D.; VANBINST, R.; ASKENASI, R. Survival in a case of massive paraquat ingestion. **Chen**, v.107, p.285-289, 1995.

LI, Q.; PENG, X.; YANG, H.; WANG, H.; SHU, Y. Deficiency of multidrug and toxin extrusion 1 enhances renal accumulation of paraquat and deteriorates kidney injury in mice. **Molecular Pharmaceutics**, v.8, p.2476-2483, 2011.

LI, D.; ZHANG, X-W.; JIANG, X-Q.; YIN, Y-L.; FAN, Z.; SUN, C-B.; CHEN, X-H.; LI, Y-H.; LIU, K-X. Protective effects of thalidomide on pulmonary injuries in a rat model of paraquat intoxication. **Journal of Inflammation**, v.12, 2015a.

LI, H-F.; ZHAO, S-X.; XING, B-P.; SUN, M-L. Ulinastatin suppresses endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the hippocampus of rats with acute paraquat poisoning. **Neural Regeneration Research**, v.10, n.3, p.467-472, 2015b.

LIU, Z-N.; ZHAO, M.; ZHENG, Q.; ZHAO, H-Y.; HOU, W-J.; BAI, S-L. Inhibitory effects of rosiglitazone on paraquat-induced acute lung injury in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.34, p.1317-1324, 2013.

LOCK, E.A. The effect of paraquat and diquat on renal function in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.48, p.321-336, 1979.

LOCK, E.A.; ISHMAEL, J. The Acute toxic effects of paraquat and diquat on the rat kidney. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.50, p.67-76, 1979.

MACHAALANI, R.; LAZZARO, V.; DUGGIN, G.G. The characterisation and uptake of paraquat in cultured baboon kidney proximal tubule cells (bPTC). **Human and Experimental Toxicology**, v.20, n.2, p.90-99, 2001.

MAINWARING, G.; LIM, F.L.; ANTROBUS, K.; SWAIN, C.; CLAPP, M.; KIMBER, I.; ORPHANILDES, G.; MOGGS, J.G. Identification of early molecular pathways affected by paraquat in rat lung. **Toxicology**, v.225, p.157-172, 2006.

MALEKINEJAD, H.; KHORAMJOUY, M.; HOBENAGHI, R.; AMNIATTALAB, A. Atorvastatin attenuates the paraquat-induced pulmonary inflammation via PPARc receptors: A new indication for atorvastatin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.114, p.79-89, 2014.

MANSOORI, A.; ORYAN, S.; NEMATBAKHSI, M. Role of Mas receptor antagonist (A779) on pressure diuresis and natriuresis and renal blood flow in the absence of angiotensin II receptors type 1 and 2 in female and male rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.65, n.5, p.633-639, 2014.

MARSHALL, R.P.; GOHLKE, P; CHAMBERS, R.C. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.286, p.156-164, 2004.

MCKINNEY, C.A.; FATTAH, C.; LOUGHREY, C.M.; MILLIGAN, G.; NICKLIN, S.A. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. **Clinical Science**, v.126, n.12, p.815-827, 2014.

MEHTA, R.L.; CHERTOW, G.M. Acute renal failure definitions and classification: time for change? **J American Society Nephrology**, v.14, n.8, p.2178-2187, 2003.

MOHAMED, F.; ENDRE, Z.; JAYAMANNE, S.; PIANTA, T.; PEAKE, P.; PALANGASINGHE, C.; CHATHURANGA, U.; JAYASEKERA, K.; WUNNAPUK, K.; SHIHANA, F.; SHAHMY, S.; BUCKLEY, N. Mechanisms underlying early rapid increases in creatinine in paraquat poisoning. **Plos One**, v.10, n.3, 2015a.

MOHAMED, F.; BUCKLEY, N.A.; JAYAMANNE, S.; PICKERING, J.W.; PEAKE, P.; PALANGASINGHE, C.; WIJERATHNA, T.; RATNAYAKE, I.; SHIHANA, F.; ENDRE, Z.H. Kidney damage biomarkers detect acute kidney injury but only functional markers predict mortality after paraquat ingestion. **Toxicology Letters**, v.237, n.2, p.140-150, 2015b.

MOHAMMADI-KARAKANIA, A.; GHAZI-KHANSARIA, M.; SOTOUDEHB, M. Lisinopril ameliorates paraquat-induced lung fibrosis. **Clinica Chimica Acta**, v.367, n.1-2, p.170-174, 2006.

MOLCK, A.M.; FRIIS, C. The cytotoxic effect of paraquat to isolated renal proximal tubular segments from rabbits. **Toxicology**, v.122, n.1-2, p.123-132, 1997.

MOLCK, A.M.; FRIIS, C. Transport of paraquat by isolated renal proximal tubular segments from rabbits. **Pharmacology Toxicology**, v.83, n.5, p.208-213, 1998.

MORÁN, J.M.; ORTIZ-ORTIZ, M.A.; RUIZ-MESA, L.M.; FUENTES, J.M. Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.24, n.6, p.402-409, 2010.

MORI, J.; PATEL, V.B.; RAMPRASATH, T.; ALROB, O.A.; DESAULNIERS, D.; SCHOLEY, J.W.; LOPASCHUK, G.D.; OUDIT, G.Y. Angiotensin 1-7 mediates renoprotection against diabetic nephropathy by reducing oxidative stress, inflammation, and lipotoxicity. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.306, p.812-821, 2014.

MÜLLER-RIBEIRO, F.C.; COIMBRA, C.C.; RODRIGUES-MACHADO, M.G.; FONTES, M.A. Evidence that central action of paraquat interferes in the dipsogenic effect of Ang II. **Neurotoxicology**, v.31, n.3, p.305-309, 2010.

NADU, A.P.; FERREIRA, A.J.; REUDELHUBER, T.L.; BADER, M.; SANTOS, R.A. Reduced isoproterenol-induced renin-angiotensin changes and extracellular matrix deposition in hearts of TGR (A1-7)3292 rats. **Journal of the American Society Hypertension**, n.2, p.341-348, 2008.

NAGANO, N.; YAGI, M.; NISHIKORI, K. Protective effects of antioxidants on paraquat-induced acute renal failure in mice. **Japan Journal of Pharmacology**, v.59, p.481-483, 1992.

NARASIMHAN, M.; RIAR, A.K.; RATHINAM, M.L.; VEDPATHAK, D.; HENDERSON, G.; MAHIMAINATHAN, L. Hydrogen peroxide responsive miR153 targets Nrf2/ARE cytoprotection in paraquat induced dopaminergic neurotoxicity. **Toxicology Letters**, v.228, n.3, p.179-190, 2014.

NORDQUIST, R.E.; NGUYEN, H.; POYER, J.L.; CARUBELLI, R. The role of free radicals in paraquat-induced corneal lesions. **Free Radical Research**, v.23, n.1, p.61-71, 1995.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v.220, p.403-409, 1994.

OGATA, T.; MANABE, S. Correlation between lipid peroxidation and morphological manifestation of paraquat-induced lung injury in rats. **Archives of Toxicology**, v.64, p.7-13, 1990.

OREOPOULOS, D.G.; SINNIAN, R.; FENTON, S.S.A.; MCGEOWN, M.G.; BRUCE, J.H.. Acute renal failure in case of paraquat poisoning. **British Medical Journal**, v.1, p.749-750, 1968.

PAPINSKA, A.M.; MORDWINKIN, N.M.; MEEKS, C.J.; JADHAV, S.S.; RODGERS, K.E. Angiotensin-(1-7) administration benefits cardiac, renal, and progenitor cell function in db/db mice. **British Journal of Pharmacology**, 2015.

PASSOS-SILVA, D.G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. **Clinical Science**, v.124, p.443-456, 2013.

PAVAN, M. Acute kidney injury following paraquat poisoning in India. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v.7, n.1, p.64-66, 2013.

PINHEIRO, S.V.; FERREIRA, A.J.; KITTEN, G.T.; DA SILVEIRA, K.D.; DA SILVA, D.A.; SANTOS, S.H.; GAVA, E.; CASTRO, C.H.; MAGALHÃES, J.A.; DA MOTA, R.K.; BOTELHO-SANTOS, G.A.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R.A.; SIMÕES E SILVA, A.C. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. **Kidney International**, v.75, n.11, p.1184-1193, 2009.

POMPERMAYER, K.; SOUZA, D.G.; LARA, G.G.; SILVEIRA, K.D.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, A.A. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Kidney International**, v.67, p.1785-1796, 2005.

POND, S.M.; RIVOR, Y L.P.; HAMPSON, E.C.; ROBERTS, M.S. Kinetics of toxic doses of paraquat and the effects of hemoperfusion in the dog. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v.31, p.229-246, 1993.

PORTELLA, V.G. Desenvolvimento da insuficiência renal promovida pela sepse induzida pelo modelo CLP (cecal ligation and puncture): avaliação morfológica e de parâmetros renais e inflamatórios. Tese de doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 2010.

PRASHAD, D.N.; CHAMBERS, D.; BEADLE, D.J. Changes in renal function associated with paraquat dichloride toxicity in the domestic fowl. **General Pharmacology: The Vascular System**, v.12, n.4, p.291-293, 1981.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. Laboratory methods in histotechnology. **D.C. Americam Registry of Pathology**, 1994.

PURSER, D.A.; ROSE, M.S. The toxicity and renal handling of paraquat in cynomolgus monkeys. **Toxicology**, v.15, n.1, p.31-41, 1979.

QIAN, J.; YE, Y.; LV, L.; ZHU, C.; YE, S. FTY720 attenuates paraquat-induced lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v.21, n.2, p.426-431, 2014.

RADOVANOVIC, S.; SAVIC-RADOJEVIC, A.; PEKMEZOVIC, T.; MARKOVIC, O.; MEMON, L.; JELIC, S.; SIMIC, D.; RADIC, T.; PLJESA-ERCEGOVA, M.; SIMICB, T. Uric acid and gamma-glutamyl transferase activity are associated with left ventricular remodeling indices in patients with chronic heart failure. **Revista Española Cardiología**, v.67, n.8, p.632-642, 2014.

RAMÍREZ-ZAMBRANO, E.; ZAMBRANO, E.; ROJAS, G.; ZAMBRANO, M.; TENEUD, L. Protective effect of melatonin and sodium thiosulphate on histopathology and ultrastructure of the kidney in rats with acute paraquat poisoning. **Invest. Clin.**, v.48, n.1, p.81-89, 2007.

RANJBAR, Akram. Evidence of oxidative damage in paraquat toxicity. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v.16, n.12, p.1-7, 2014.

REID, I.A.; MORRIS, B.J.; GANONG, W.F. The renin-angiotensin system. **Annual Review of Physiology**, v.40, p.377-410, 1978.

REN, Y.; GARVIN, J.L.; CARRETERO, O.A. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. **Hypertension**, v.39, p.799-802, 2002.

REN, M.; WANG, Y.M.; ZHAO, J.; ZHAO, J.; ZHAO, Z.M.; ZHANG, T.F.; HE, J.; REN, S.P.; PENG, S.Q. Metallothioneins attenuate paraquat-induced acute lung injury in mice through the mechanisms of anti-oxidation and anti-apoptosis. **Food Chemical Toxicology**, v.73, p.140-147, 2014.

RIFAIOGLU, M.M.; SEFIL, F.; GOKCE,H.; NACAR, A.; DORUM, B.A.; DAVARCI, M. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on the dose-dependent acute nephrotoxicity with paraquat in a rat model. **Environmental Toxicology**, v.30, n.3, p.375-381, 2013.

ROBERTS, D.M.; WILKS, M.F.; ROBERTS, M.S.; SWAMINATHAN, R.; MOHAMED, F.; DAWSON, A.H.; BUCKLEY, N.A. Changes in the concentrations of creatinine, cystatin C and NGAL in patients with acute paraquat self-poisoning. **Toxicology Letters**, v. 202, n.1, p.69-74, 2011.

ROSSIER, Y.; DIVERS, T.J.; SWEENEY, R.W. Variations in urinary gamma glutamyl transferase/urinary creatinine ratio in horses with or without pleuropneumonia treated with gentamicin. **Equine Veterinary Journal**, v.27, n.3, p.217-220, 1995.

SAMPAIO, W.O.; NASCIMENTO, A.A.; SANTOS, R.A. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.284, p.1985-1994, 2003.

SANDHU, J.S.; DHIMAN, A.; MAHAJAN, R.; SANDHU, P. Outcome of paraquat poisoning - a five year study. **Indian Journal Nephrology**, v.13, p.64-68, 2003.

SANTOS, R.A.S.; SIMÕES E SILVA, A.C.; MAGALDI, A.J.; KHOSLA, M.C.; CESAR, K.R.; PASSAGLIO, K.T.; BARACHO, N.C.V. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. **Hypertension**, v.27, p.875-884, 1996.

SANTOS, R.A.S.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; SILVA, A.C.S. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.3, p.227-36, 2000a.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; ANDRADE, S.P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regulatory Peptides**, v.91, p.45-62, 2000b.

SANTOS, R.A.S.; HAIBARA, A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SIMOES E SILVA, A.C.; PAULA, RD.; PINHEIRO, S.V. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v.41, p.737-743, 2003.

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; NADU, A.P.; BRAGA, A.N.; DE ALMEIDA, A.P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. **Physiological Genomics**, v.17, p.292-299, 2004.

SANTOS, A.; MAIA, F.; COUTINHO, M.; RODRIGUES, A.L. General aspects of paraquat intoxication in domestic animals. **Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária**, v.5, p.43-55, 2012.

SCHMITT, G.C.; PANIZ, C.; GROTO, D.; VALENTINI, J.; SCHOTT, K.L.; POMBLUM, V.J.; GARCIA, S.C. General aspects and clinical laboratorial diagnostic of poisoning by paraquat. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v.42, n.4, p.235-243, 2006.

SENANAYAKE, N.; GURUNATHAN, G.; HART, T.B.; AMERASINGHE, P.; BABAPULLE, M.; ELLAPOLA, S.B.; UDUPIHILLE, M.; BASANAYAKE, V. An epidemiological study of the health of Sri Lankan tea plantation workers associated with long term exposure to paraquat. **British Journal of Industrial Medicine**, v.50, p.257-263, 1993.

SENATOR, A.; RACHIDI, W.; LEHMANN, S.; FAVIER, A.; BENBOUBETRA, M. Prion protein protects against DNA damage induced by paraquat in cultured cells. **Free Radical Biology Medicine**, v.37, n.8, p.1224-1230, 2004.

SEOK, S.; KIM, Y.; GIL, H.; SONG, H.; HONG, S. The time between paraquat ingestion and a negative dithionite urine test in an independent risk factor for death and organ failure in acute paraquat intoxication. **Journal of Korean Medical Science**, v.27, n.9, p.993-998, 2012.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M.M. Intoxicação por paraquat. **Acta Médica Portuguesa**, v.16, p.25-32, 2003.

SHAO, X.; LI, M.; LUO, C.; WANG, Y.-Y.; LU, Y.-Y.; FENG, S.; LI, H.; LANG, X.-B.; WANG, Y.-C.; LIN, C.; SHEN, X.-J.; ZHOU, Q.; JIANG, H.; CHEN, J.-H. Effects of rapamycin against paraquat-induced pulmonary fibrosis in mice. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v.16, n.1, p.52-61, 2015.

SHI, Y.; LO, C.S.; PADDA, R.; ABDO, S.; CHENIER, I.; FILEP, J.G.; INGELFINGER, J.R.; ZHANG, S.L.; CHAN, J.S. Angiotensin-(1-7) prevents systemic hypertension, attenuates oxidative stress and tubulointerstitial fibrosis, and normalizes renal angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor expression in diabetic mice. **Clinical Science**, v.128, n.10, p.649-663, 2015.

SILVA, A.C.S.; SILVEIRA, K.D.; FERREIRA, A.J.; TEIXEIRA, M.M. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. **British Journal of Pharmacology**, v.169, p.477-492, 2013.

SILVA, C.T.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v.66, n.1, 2014.

SILVEIRA, K.D.; BARROSO, L.C.; VIEIRA, A.T.; CISALPINO, D.; LIMA, C.X.; BADER, M.; ARANTES, R.M.; SANTOS, R.A.; SIMÕES E SILVA, A.C.; TEIXEIRA, M.M. Beneficial effects of the activation of the angiotensin-(1-7) MAS receptor in a murine model of adriamycin-induced nephropathy. **Plos One**, v.8, n.6, 2013.

SIMÕES E SILVA, A.C.; BELLO, A.P.; BARACHO, N.C.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective Angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. **Regulatory Peptides**, v.74, n.2-3, p.177-184, 1998.

SIMÕES E SILVA, A.C.; FLYNN, J.T. The renin angiotensin aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. **Pediatric Nefrology**, v.27, p.1835-1845, 2012.

SIMÕES E SILVA, A.C.; SILVEIRA, K.D.; FERREIRA, A.J.; TEIXEIRA, M.M. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis **British Journal Pharmacology**, v.169, n.3, p.477-492, 2013.

SINGH, A.P.; MUTHURAMAN, A.; JAGGI, A.S.; SINGH, N.; GROVER, K.; DHAWAN, R. Animal models of acute renal failure. **Pharmacological Reports**, v.64, p.31-44, 2012.

SMITH, P.; HEATH, D. The pathology of the lung in paraquat poisoning. **Journal of Clinical Pathology**, v.28, n.9, p.81-93, 1975.

SOBHA, H.; PUSHPAKUMARI, P.; NAMPOORI, M.R.; VISWESWARAN, R.K.; RAVINDRAN, M. Paraquat poisoning with acute renal failure - a case report. **Journal of the Association of Physiologists of India**, v.37, p.341-342, 1989.

SONG, Y.W.; CHOI, S.C.; YOU, Y.Y.; SHIN, Y.H.; PARK, E.J.; AHN, J.H.; MIN, Y.G.; JUNG, Y.S. Veiled paraquat poisoning: a focus on clinical characteristics. **Journal of the Korean of Clinical Toxicology**, v.9, n.1, p.14-19, 2011.

SOUZA, L.L.; COSTA-NETO, C.M. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. **Journal of Cellular Physiology**, v.227, p.2117-2122, 2012.

SUNTRES, Z.E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v.180, n.1, p.65-77, 2002.

SUNTRES, Z.E.; SHEK, P.N. The pulmonary uptake of intravenously administered liposomal alpha-tocopherol is augmented in acute lung injury. **Journal of Drug Targeting**, v.4, n.3, p.151-159, 1996a.

SUNTRES, Z.E.; SHEK, P.N. Alleviation of paraquat-induced lung injury by pretreatment with bifunctional liposomes containing α -tocopherol and glutathione. **Biochemical Pharmacology**, v.52, n.10, p.1515-1520, 1996b.

SYNGENTA, 2015. Paraquat poisoning: a practical guide to diagnosis, first aid and hospital treatment. Disponível em:
<http://www.syngenta.com/GLOBAL/CORPORATE/en/pqmedguide/Documents/paraquatbooklet.pdf>

TABAK, A.; TAITELMAN, U.; HOFFER, E. Percutaneous permeability to paraquat: *in vitro* experiments with human skin. **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**, v.9, n.4, 1990.

TAKENAKA, T.; GOTO, F. Alteration of lipid peroxidation and the activity of peroxide metabolism enzymes in the liver, kidney and lung following the administration of paraquat in mice. **The Japanese Journal of Anesthesiology**, v.43, n.1, p.34-40, 1994.

TAKIZAWA, M.; KOMORI, K.; TAMPO, Y.; YONAHARA, M. Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of cellular redox systems including antioxidative defense enzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p.355-363, 2007.

TAN, D.; WANG, Y.; BAI, B.; YANG, X.; HAN, J. Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.78, p.141-146, 2015.

TOMITA, M.; OKUYAMA, T.; KATSUYAMA, H.; ISHIKAWA, T. Paraquat-induced gene expression in rat kidney. **Archives of Toxicology**, v.80, p.687-693, 2006.

TOYGAR, M.; AYDIN, I.; AGILLI, M.; AYDIN, F.N.; OZTOSUN, M.; GUL, H.; MACIT, E.; KARSLIOGLU, Y.; TOPAL, T.; UYSAL, B.; HONCA, M. The relation between

oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity. **Human and Experimental Toxicology**, v.34, n.2, p.198-204, 2015.

TSATSAKIS, A.M; PERAKIS, K.; KOUMANTAKIS, E. Experience with acute paraquat poisoning in crete. **Veterinary and Human Toxicology**, v.38, n.2, 1996.

TUNG, J-N.; LANG, Y-D.; WANG, L-F.; CHEN, C-M. Paraquat increases connective tissue growth factor and collagen expression via angiotensin signaling pathway in human lung fibroblastos. **Toxicology in Vitro**, v.24, n.3, p.803-808, 2010.

VAIDYA, V.S.; FERGUSON, M.A.; BONVENTRE, J.V. Biomarkers of acute kidney injury. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v.48, p.463-493, 2008.

VAZIRI, N.D. NESS, R.L.; FAIRSHTER, R.D.; SMITH, W.R.; ROSEN, S.M. Nephrotoxicity of paraquat in man. **Archives of Internal Medicine**, v.139, p.172-174, 1979.

VELEZ, J.C.; RYAN, K.J.; HARBESON, C.E.; BLAND, A.M.; BUDISAVLJEVIC, M.N.; ARTHUR, J.M.; FITZGIBBON, W.R.; RAYMOND, J.R.; JANECH, M.G. Angiotensin-I is largely converted to angiotensin-(1-7) and angiotensin-(2-10) by isolated rat glomeruli. **Hypertension**, v.53, n.5, p.790-797, 2009.

VELEZ, J.C.Q.; JANECH, M.G.; HICKS, M.P.; MORINELLI, T.A.; RODGERS, J.; RODGERS, J.; SELF, S.E.; ARTHUR, J.M.; FITZGIBBON, W.R. Lack of renoprotective effect of chronic intravenous angiotensin-(1-7) or angiotensin-(2-10) in a rat model of focal segmental glomerulosclerosis. **Plos One**, v.9, 2014.

WADDELL, W.J.; MARLOWE, C. Tissue and cellular disposition of paraquat in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.56, p.127-140, 1980.

WEBB, D.B. Nephrotoxicity of paraquat in the sheep and the associated reduction in paraquat secretion. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.68, n.2, p.282-289, 1983.

WEI, T.; TIAN, W.; LIU, F.; XIE, G. Protective effects of exogenous b-hydroxybutyrate on paraquat toxicity in rat kidney. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.447, p.666-671, 2014.

WENG, C-H.; HU, C-C.; LIN, J.L.; LIN-TAN, D-T.; HSU, C-W.; YEN, T-H. Predictors of acute respiratory distress syndrome in patients with paraquat intoxication. **Plos One**, v.8, n.12, 2013.

WIECEK, A.; CHUDEK, J.; KOKOT, F. Role of angiotensin II in the progression of diabetic nephropathy - therapeutic implications. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.18, p.16-20, 2003.

WILSON, B.A.; MARSHALL, A.C.; ALZAYADNEH, E.M.; CHAPPELL, M.C. The ins and outs of angiotensin processing within the kidney. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.307, p.487-489, 2014.

WILSON, B.A.; CRUZ-DIAZ, N.; MARSHALL, A.C.; PIRRO, N.T.; SU, Y.; GWATHMEY, T.M.; ROSE, J.; CHAPPELL, M.C. An angiotensin-(1-7) peptidase in the

kidney cortex, proximal tubules, and human HK-2 epithelial cells that is distinct from insulin-degrading enzyme. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.308, n.6, 2015.

WUNNAPUK, K.; MOHAMMED, F.; GAWARAMMANA, I.; LIU, X.; VERBEECK, R.K.; BUCKLEY, N.A.; ROBERTS, M.S.; MUSUAMBA, F.T. Prediction of paraquat exposure and toxicity in clinically ill poisoned patients: a model based approach. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.78, n.4, p.855-866, 2014.

WYSOCKI, J.; ORTIZ-MELO, D.I.; MATTOCKS, N.K.; XU, K.; PRESCOTT, J.; EVORA, K.; YE, M.; SPARKS, M.A.; HAQUE, S.K.; BATLLE, D.; GURLEY, S.B. ACE2 deficiency increases NADPH-mediated oxidative stress in the kidney. **Physiological Reports**, v.2, n.3, 2014.

XIANGDONG, J.; MING, L.; YIJING, Z.; YANJUN, R.; GUANGRAN, L.; HONG, S. Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model. **Human Experimental Toxicology**, v.30, n.6, p.460-469, 2011.

XU, J.; ZHENG, J.; ZHU, J. Tumor necrosis factor- α induced protein 6 attenuates acute kidney injury following paraquat poisoning in rats. **Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases**, v.26, n.6, p.405-408, 2014.

YANG, H.; WEN, Y.; HOU-YOU, Y.; YU-TONG, W.; CHUAN-MING, L.; JIAN, X.; LU, H. Combined treatment with bone marrow mesenchymal stem cells and methylprednisolone in paraquat-induced acute lung injury. **BMC Emergency Medicine**, v.13, 2013.

YAO, R.; ZHOU, Y.; HE, Y.; JIANG, Y.; LIU, P.; YE, L.; ZHENG, Z.; LAU, W.B.; CAO, Y.; ZENG, Z. Adiponectin protects against paraquat-induced lung injury by attenuating oxidative/nitrative stress. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.9, n.1, p.131-136, 2015.

YEH, S.T.-Y.; GUO, H.-R.; SU, Y.-S.; LIN, H.-J.; HOU, C.-C.; CHEN, H.-M.; CHANG, M.-C.; WANG, Y.J. Protective effects of N-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells. **Toxicology**, v. 223, p.181-190, 2006.

YOSYPIV, I.V.; EL-DAHR, S.S. Role of the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. **Pediatric Nephrology**, v.20, p.1219-1229, 2005.

YU, G.; KAN, B.; JIAN, X.; WANG, J.; SUN, J.; SONG, C. A case report of acute severe paraquat poisoning and long-term follow-up. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.8, p.233-236, 2014.

ZHANG, J.; NOBLE, N.A.; BORDER, W.A.; HUANG, Y. Infusion of angiotensin-(1-7) reduces glomerulosclerosis through counteracting angiotensin II in experimental glomerulonephritis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.298, n.3, p.579-588, 2010.

ZHANG, K.; MENG, X.; LI, D.; YANG, J.; KONG, J.; HAO, P.; GUO, T.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, C. Angiotensin(1-7) attenuates the progression of streptozotocin-

induced diabetic renal injury better than angiotensin receptor blockade. **Kidney International**, 2014.

ZHAO, F.; SHI, D.; LI, T.; LI, L.; ZHAO, M. Silymarin attenuates paraquat-induced lung injury via Nrf2-mediated pathway in vivo and in vitro. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2015.

ZHENG, Y.; TANG, L.; HUANG, W.; YAN, R.; REN, F.; LUO, L.; ZHANG, L. Anti-inflammatory effects of Ang-(1-7) in ameliorating HFD-induced renal injury through LDLr-SREBP2-SCAP pathway. **Plos One**, v.10, n.8, 2015.

ZHONG, J.; CHEN, L.J.; ZHANG, Z.Z.; XU, Y.L.; XU, R.; SONG, B.; GAO, P.J.; ZHU, D.L.; OUDIT, G.Y. Effects of angiotensin-converting enzyme 2 on renal oxidative stress levels in apolipoprotein e-deficient mice. **Journal Hypertension**, v.33, 2015.

ZOCRATO, L.B.R.; CAPETTINI, L.S.; REZENDE, B.A.; SILVA, J.F.; RODRIGUES-MACHADO, M.G.; CORTES, S.F.; LEMOS, V.S. Increased expression of endothelial iNOS accounts for hyporesponsiveness of pulmonary artery to vasoconstrictors after paraquat poisoning. **Toxicology in Vitro**, v.24, p.1019-1025, 2010.

