

Expressão Medular Renal do Receptor Tipo A dos Peptídeos Natriuréticos num Modelo Animal de Hipertensão Arterial Induzida por Redução da Massa Renal [36]

CARLA SANTOS ARAÚJO, ROBERTO RONCON ALBUQUERQUE JR, MÓNICA MOREIRA RODRIGUES, BENEDITA SAMPAIO MAIA, ADELINO F. LEITE MOREIRA, MANUEL PESTANA

Unidade de Investigação e Desenvolvimento de Nefrologia, Faculdade de Medicina, Porto, Portugal
Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Porto, Portugal
Instituto de Farmacologia e Terapêutica, Faculdade de Medicina, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2006; 25 (4): 419-27

RESUMO

Introdução: A actividade biológica do sistema dos peptídeos natriuréticos (PN's) é dependente do balanço entre os seus níveis tecidulares e a expressão local dos seus receptores efectores. A nível renal, o principal receptor effector dos PN's é o receptor do tipo-A (RPN-A), predominantemente localizado a nível medular. Embora esteja bem documentado um aumento dos níveis circulantes dos PN's na insuficiência renal crónica (IRC), a expressão renal do RPN-A não foi ainda avaliada nesta situação.

Métodos: Ratos Wistar-Han machos foram submetidos a nefrectomia do rim direito e a ablação dos dois pólos do rim esquerdo - nefrectomia de 3/4 (3/4nx; n=27) - ou a cirurgia sham (Sham; n=22) e seguidos até às 26 semanas após a cirurgia com avaliação semanal da pressão arterial. No final das 2, 10 ou 26 semanas, o balanço de sódio e a excreção urinária de creatinina foram avaliados em gaiolas metabólicas. De seguida, os rins foram removidos para quantificação do ARNm do RPN-A por RT e Real-Time PCR na medula renal. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (UA), definidas como a média dos valores do grupo Sham (Sham = 1 UA), após normalização para o GAPDH, P<0,05.

Resultados: A nefrectomia de 3/4 resultou numa redução do clearance de creatinina (-80,6% às 26 semanas) e na elevação da

ABSTRACT

Medullar expression of type-A natriuretic peptide receptor in an animal model of hypertension induced by renal mass ablation

Introduction: The biological activity of the natriuretic peptide (NP) system is dependent on the balance between NP tissue levels and the local expression of their receptors. In the kidney, the natriuretic peptide receptor type A (NPR-A) is the principal receptor mediating NP activity and is mainly expressed in the renal medulla. An increase in circulating NP levels is well documented in chronic renal failure (CRF); however, the renal expression of NPR-A has not been evaluated in this condition.

Methods: Wistar-Han rats were submitted to right nephrectomy plus ablation of both poles of the left kidney (3/4nx; n=27) or were sham operated (Sham; n=22) and followed for up to 26 weeks post surgery. Blood pressure measurements were performed weekly. Two, 10 and 26 weeks after surgery, renal sodium and creatinine excretion were evaluated and the kidneys removed for NPR-A mRNA quantification by real-time PCR. The results of mRNA quantification are expressed in arbitrary units (AU) set as the mean value of the Sham group (Sham=1 AU), after normalization for GAPDH (p<0.05).

Results: The 3/4nx nephrectomy resulted in reduced creatinine clearance (-80.6%, 26

excreção fraccional de Na⁺ (+270% às 26 semanas). Embora o aporte de sódio tenha sido semelhante nos dois grupos durante o período do estudo, a pressão arterial sistólica e diastólica foi mais elevada e aumentou progressivamente no grupo 3/4nx. Paralelamente, verificou-se uma redução na expressão do RPN-A na medula renal dos animais 3/4nx, às 2, 10 e 26 semanas após a cirurgia.

Conclusões: Os animais 3/4nx evidenciam uma redução precoce e sustentada na expressão do RPN-A na medula renal, a qual poderá contribuir para a instalação da HTA e para a progressão das lesões renais observadas neste modelo de IRC.

Palavras-Chave

ARNm; Receptor do peptídeo natriurético tipo A; Insuficiência renal crónica; Hipertensão arterial

weeks after surgery) and in elevated fractional sodium excretion (+270%, 26 weeks after surgery). Although sodium intake was similar in 3/4nx and Sham rats, blood pressure was higher in 3/4nx rats and increased progressively throughout the study. This was accompanied by a marked decrease in NPR-A mRNA levels in the renal medulla from 3/4nx animals at 2, 10 and 26 weeks post surgery.

Conclusion: In 3/4nx rats, the expression of NPR-A in the renal medulla of the remnant kidney is markedly reduced from 2 weeks up to 26 weeks post surgery. It is suggested that this may contribute to the progressive increase in blood pressure, as well as to the renal fibrosis observed in 3/4nx rats.

Key words

mRNA; Natriuretic peptide receptor type-A; Chronic renal failure; Hypertension

INTRODUÇÃO

Os Peptídeos Natriuréticos (PN) constituem uma família de hormonas polipeptídicas que exercem efeitos natriuréticos e vasodilatadores, contribuindo assim de forma importante para a regulação do volume extra-celular e da pressão arterial. Na insuficiência renal crónica (IRC) tem sido documentada uma elevação dos níveis plasmáticos dos PN's. Esta foi atribuída a um aumento da libertação cardíaca de PN's secundária à sobrecarga de volume que acompanha a redução da função renal, mas poderá resultar igualmente de uma redução da excreção renal destes peptídeos^(1, 2). Para além de contribuírem para aumentar a excreção de sódio pelos nefrónios residuais, os PN's poderão também modular negativamente as respostas fibrótica e mitogénica dos tecidos renais, que se observam caracteristicamente na sequência da redução da massa renal. A evidência recente de que o aumento dos níveis dos PN's se associa a uma atenuação das lesões de esclerose glomerular progressiva que se desenvolve nos modelos animais de redução da massa renal^(3, 4), veio reforçar esta hipótese.

A actividade do sistema dos PN's não depende apenas dos seus níveis circulantes, mas também da expressão dos seus receptores efectores, dos quais o mais importante é o receptor associado à guanilciclase tipo A (RPN-

INTRODUCTION

Natriuretic peptides (NPs) are a family of polypeptide hormones with natriuretic and vasodilatory effects that play an important role in the regulation of extracellular volume and blood pressure. Elevated plasma levels of NPs have been documented in chronic renal failure (CRF); this has been attributed to increased cardiac release of NPs secondary to the volume overload that accompanies impaired renal function, but it could also result from reduced excretion of these peptides by the kidneys^(1, 2). Besides increasing sodium excretion by the remaining nephrons, NPs may also have a negative effect on the fibrotic and mitogenic responses of renal tissue; this is usually seen following a reduction in renal mass. This hypothesis is supported by recent evidence that increased NP levels are associated with less damage from the progressive glomerulosclerosis that develops in animal models of reduced renal mass^(3, 4).

The activity of the NP system depends not only on circulating levels but also on the expression of its receptors, the most important of which is the guanylyl cyclase-linked type A (NPR-A), which in the kidneys is found mainly in the medulla⁽⁵⁾. Mice lacking NPR-A have significantly increased myocardial hypertrophy and fibrosis in the presence of hypertension⁽⁶⁾.

A), que a nível renal está sobretudo presente na zona medular⁽⁵⁾. De facto, ratinhos *knock-out* para o RPN-A apresentam um aumento significativo de hipertrofia e de fibrose do miocárdio na presença de hipertensão arterial⁽⁶⁾. Estes resultados poderão ter implicações na fisiopatologia da insuficiência cardíaca, tendo em conta o fenómeno de dessensibilização aos PN's que se observa caracteristicamente durante a progressão desta doença⁽⁷⁾.

Embora a expressão renal do RPN-A não tenha sido ainda avaliada na IRC é possível admitir que modificações na expressão renal deste receptor possam contribuir igualmente para o estabelecimento da hipertensão sensível ao sal e para a progressão da glomeruloesclerose e da fibrose tubulointersticial que acompanham a evolução da IRC. De acordo com esta possibilidade foi recentemente sugerido que o desenvolvimento de um fenómeno de tolerância à acção dos PN's pode explicar a progressão das lesões renais crónicas, designadamente em doentes com nefroangiosclerose hipertensiva⁽⁸⁾. No presente estudo procedemos à avaliação da função renal, da pressão arterial e da expressão do RPN-A na medula renal de ratos submetidos a nefrectomia de 3/4, um modelo animal de IRC, até às 26 semanas após a cirurgia.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho respeita a Directiva 86/609/CEE, do Conselho de 24 de Novembro de 1986, que estabelece as normas mínimas relativas à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, transposta para a ordem jurídica interna pelo DL 129/92 de 6 de Junho, regulamentado pela Portaria 1005/92 de 23 de Outubro. Está também de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (NIH Publication No. 85-23, revisto em 1996).

Modelo experimental de nefrectomia de 3/4

Ratos Wistar-Han machos normotensos (Harlan, Barcelona, Espanha; 190-220g) foram aleatoriamente seleccionados após um período de sete dias de estabilização. Os animais foram agrupados em grupos de 5 por gaiola em ambiente controlado com ciclos de luz-penumbra de 12h, à temperatura ambiente de 22°C, sem restrição de água e alimentados *ad*

These findings may have implications for the pathophysiology of heart failure, given the desensitization to NPs that is typically found in this disorder⁽⁷⁾.

Although renal expression of NPR-A has not been investigated in CRF, it is possible that changes in expression of this receptor could also contribute to the development of salt-sensitive hypertension and worsening of the glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis that accompanies the evolution of CRF. Given this possibility, it has recently been suggested that the development of tolerance to the action of NPs may explain the progression of chronic renal damage, particularly in patients with hypertensive nephroangiosclerosis⁽⁸⁾. In the present study we assessed renal function, blood pressure and expression of NPR-A in the renal medulla of rats submitted to 3/4 nephrectomy, an animal model of CRF, up to 26 weeks post surgery.

METHODS

This work complies with European Community Directive 86/609/EEC, which lays down minimum standards for protection of animals used for experimental and other scientific purposes, incorporated into Portuguese law by Decree-law 129/92 of 6 June 1992 and implemented by Order in Council 1005/92 of 23 October 1992. It also complies with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Experimental model of 3/4 nephrectomy

Male normotensive Wistar-Han rats (Harlan, Barcelona, Spain; 190-220g) were randomly selected after a seven-day stabilization period. They were then placed in groups of five in cages in a controlled environment with 12-hour cycles of light and dark, ambient temperature of 22°C, and unrestricted access to water and food (containing 1.9 g.kg⁻¹ NaCl).

The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg.kg⁻¹, ip) and subjected to right nephrectomy (nx) and removal of both poles of the left kidney, the percentage of remaining renal mass being 27±2% (3/4nx; n=27). These animals were compared to a group that underwent laparotomy without manipulation of the renal area (Sham; n=22).

libitum com razão (1.9 g.Kg⁻¹ de NaCl).

Os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg.Kg⁻¹, i.p.) e submetidos a nefrectomia (nx) direita e à remoção de ambos os pólos do rim esquerdo, com uma percentagem de massa renal remanescente de 27±2% (3/4nx; n=27). Estes animais foram comparados com um grupo submetido a laparotomia mas sem manipulação da área renal (*Sham*; n=22).

Duas (2sem; n=13), 10 (10sem; n=14) e 26 (26sem; n=22) semanas após a cirurgia procedeu-se à pesagem dos animais, à avaliação da frequência cardíaca e da pressão arterial (PA), e aos estudos morfométricos, metabólicos e moleculares.

Avaliação da pressão arterial

A avaliação da PA sistólica e diastólica foi efectuada com os animais conscientes através de um detector de cauda fotoeléctrico (LE 5000, *Letica*; Barcelona; Espanha). A média de 4 medições foi utilizada para análise posterior.

Estudos metabólicos

Duas, 10 e 26 semanas após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (*Tecniplast, Buguggiate-VA*; Itália) para colheita de urina (amostra de 24h) e sangue (5ml) para determinação da excreção fraccional de sódio (EF-Na⁺) e do *clearance* da creatinina (C_{creat}).

Quantificação do ARNm por Real-Time PCR

O ARNm total (ARNm_{total}) foi extraído pelo método de guanídio-tiocianato e ligação a membrana de sílica-gel, de acordo com as instruções do fabricante (*Qiagen 74124*). A pureza e a concentração do ARNm_{total} foram determinadas por espectrofotometria (Eppendorf 613000.012).

A quantificação relativa do ARNm específico foi efectuada por *two-step real time RT-PCR*. A transcrição reversa (10 min a 22°C, 50 min a 50°C e 10 min a 95°C; volume final 20µl) foi efectuada num termociclador convencional (*Whatman Biometra 050-901*): 40 U/reacção de transcriptase reversa (*Invitrogen 18064-014*), 20 U/reacção de inibidor da RNase (*Promega N2515*), 30 ng/ml de *random primers* (*Invitrogen 481990-011*), 0,5 nM de nucleótidos (*MBI Fermentas R0192*), 1,9 mM

Two (n=13), 10 (n=14) and 26 (n=22) weeks post surgery the animals were weighed, heart rate and blood pressure (BP) were measured, and morphometric, metabolic and molecular studies were undertaken.

Blood pressure measurement

Systolic and diastolic BP were measured with the animals conscious using a photoelectric tail-cuff pulse detector (LE 5000, *Letica*; Barcelona, Spain). The mean of four measurements was used for analysis.

Metabolic studies

Two, 10 and 26 weeks post surgery, the animals were placed in metabolic cages (*Tecniplast, Buguggiate-VA, Italy*) to collect urine (24 h samples) and blood (5 ml) to determine fractional sodium excretion (FE-Na⁺) and creatinine clearance (C_{creat}).

Quantification of mRNA by real-time PCR

Total mRNA (mRNA_{total}) was extracted using the guanidine-thiocyanate method and loaded onto a silica gel membrane in accordance with the manufacturer's instructions (*Qiagen 74124*). The purity and concentration of the mRNA_{total} were determined spectrophotometrically (Eppendorf 613000.012).

The relative quantification of specific mRNA was carried out by two-step real-time PCR. Reverse transcription (10 minutes at 22°C, 50 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C; total volume: 20 µl) was performed in a standard thermocycler (*Whatman Biometra 050-901*): 40 U reverse transcriptase (*Invitrogen 18064-014*); 20 U ribonuclease inhibitor (*Promega N2515*); 30 ng/ml random primers (*Invitrogen 481990-011*); 0.5 nM nucleotides (*MBI Fermentas R0192*); 1.9 mM MgCl₂ and 10 mM DTT. Ten percent of the product of reverse transcription was used in the PCR (*LightCycler, Roche*), using the fluorochrome SYBR Green (*Qiagen 204143*) in accordance with the manufacturer's instructions. The primer pairs used were as follows: NPR-A - fw 5'-ACA CAT GCC CAG TCC CAC CCT TAC-3' and rev 5'-AAC CGG CAG CTT CTC TTC TCC TCA-3'; GAPDH - fw 5'-CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3' and rev 5'-TGG CCT TCC GTG TTC CTA CCC-3'. The formation of primer dimers and the purity of the amplification product were tested by melting curve analysis of the real-time PCR

MgCl₂ e 10 mM de DTT. Dez por cento do produto da transcrição reversa foi utilizado na reacção de PCR (*LightCycler, Roche*), utilizando o fluorocromo *SYBR Green (Qiagen 204143)* de acordo com as instruções do fabricante. Os pares de sondas específicas utilizados foram: RPN-A - *fw* 5'-ACA CAT GCC CAG TCC CAC CCT TAC-3' e *rev* 5'-AAC CGG CAG CTT CTC TTC TCC TCA-3'; GAPDH - *fw* 5'-CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3' e *rev* 5'-TGG CCT TCC GTG TTC CTA CCC-3'. A formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto de amplificação foram avaliadas através da análise das *melting curves* dos PCR em tempo real e dos géis de agarose-2% (brometo de etídeo, 0,5µg/ml). Para cada molécula de ARNm estudada, foram elaboradas curvas padrão a partir da correlação entre a quantidade inicial de ARNm_{total} e ciclo PCR limiar (método da segunda derivada) de diluições crescentes de uma amostra aleatória de medula renal ($r>0,97$). A quantificação relativa dos ARNm específicos foi obtida através da regressão do ciclo PCR limiar do produto da transcrição reversa da amostra (50 ng de ARNm_{total}). A expressão de GAPDH não variou significativamente entre os grupos experimentais, tendo este gene sido utilizado como controlo interno. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (UA), definidas como a média dos valores do grupo Sham (Sham = 1 UA), após normalização para o GAPDH.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias±erro padrão. As diferenças entre grupos experimentais foram analisadas pelo t-teste (para dados com distribuição normal) ou pelo teste não paramétrico correspondente (teste *Mann-Whitney Rank Sum*). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P<0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros hemodinâmicos, morfométricos e metabólicos (Tabela 1)

O grupo ³/₄NX apresentou valores aumentados de PA sistólica e diastólica às 2, 10 e 26 semanas após a cirurgia. Nestes animais, a redução da frequência cardíaca ao longo das 26 semanas do estudo foi menor que no grupo

product and of 2% agarose gel (0.5 µg/ml ethidium bromide). For each mRNA molecule studied, standard curves were drawn based on the correlation between the initial quantity of mRNA_{total} and the threshold PCR cycle (second derivative method) from successive dilutions of a random sample of renal medulla ($r>0,97$). The relative quantification of specific mRNA was obtained by regression of the threshold PCR cycle of the reverse transcription product of the sample (50 ng of mRNA_{total}). GAPDH expression did not vary significantly between the experimental groups and so this gene was used as an internal control. The results are expressed in arbitrary units (AU), defined as the mean value in the Sham group (Sham = 1 AU), after normalization for GAPDH.

Statistical analysis

The results are presented as means ± standard error. Differences between the experimental groups were analyzed using the Student's t test for data with normal distribution or the corresponding non-parametric test (the Mann-Whitney rank-sum test). Differences were considered statistically significant when $p<0.05$.

RESULTS

Hemodynamic, morphometric and metabolic parameters (Table I)

The ³/₄NX group presented increased systolic and diastolic BP 2, 10 and 26 weeks after surgery. In these animals, the reduction in heart rate over the 26 weeks was less than in the Sham group.

Reduction in renal mass was accompanied by a fall in C_{creat} over the course of the study, reaching its lowest value 26 weeks post surgery. In the Sham group, a fall in the glomerular filtration rate was seen only after 26 weeks, and even then was less than in the ³/₄NX group. In the latter group, FE-Na⁺ was also elevated throughout the study.

Quantification of mRNA by real-time PCR (Figure 1)

Levels of GAPDH expression were similar in the different experimental groups, and so this gene could be used as a control. For the gene of interest (NPR-A), levels of expression in the ³/₄NX group were reduced in the renal medulla 2, 10 and 26 weeks post surgery.

Tabela 1

Peso corporal, função renal e pressão arterial nos animais sham (Sham) e submetidos a nefrectomia de $3/4$ ($3/4$ nx) 2, 10 e 26 semanas após a cirurgia

	Duas semanas		Dez semanas		Vinte-seis semanas	
	Sham	$3/4$ nx	Sham	$3/4$ nx	Sham	$3/4$ nx
Peso corp., g	254±5	243±6	408±9†	400±15†	475±22‡‡	463±17‡‡
Massa renal, %		99±10		198±17†		250±15‡‡
P_{Creat} , mg.dl ⁻¹	0.35±0.02	0.75±0.05*	0.31±0.03	0.67±0.07*	0.61±0.03‡‡	1.44±0.23*†‡‡
C_{Creat} , ml.min ⁻¹ .kg Peso corp. ⁻¹	9.3±1.0	3.5±0.3*	10.6±1.0	4.8±0.7*	3.9±0.3‡‡	1.8±0.3*†‡‡
FE_{Na+} , %	0.37±0.04	0.96±0.07*	0.21±0.05	0.55±0.20*	0.34±0.03	1.00±0.30*
PA sistólica, mmHg	121±3	138±3*	133±4	210±8*†	141±4†	223±10*†
PA diastólica, mmHg	81±2	104±5*	94±3†	161±9*†	103±3‡‡	166±7*†
Freq. cardíaca, bat.min ⁻¹	420±15	460±30	349±10†	386±9*†	326±7†	405±10*†

Valores em média±DP. P_{Creat} , creatinina; C_{Creat} , clearance creatinina; FE_{Na+} , excreção fraccional de sódio; PA, pressão arterial; Peso corp., peso corporal. * $P<0,05$ vs. Sham; † $P<0,05$ vs. 2 semanas; ‡ $P<0,05$ vs. 10 semanas.

Table 1

Body weight, renal function and blood pressure in sham-operated and $3/4$ nx animals 2, 10 and 26 weeks post surgery

	2 weeks		10 weeks		26 weeks	
	Sham	$3/4$ nx	Sham	$3/4$ nx	Sham	$3/4$ nx
Body weight, g	254±5	243±6	408±9†	400±15†	475±22‡‡	463±17‡‡
Renal mass, %		99±10		198±17†		250±15‡‡
P_{Creat} , mg.dl ⁻¹	0.35±0.02	0.75±0.05*	0.31±0.03	0.67±0.07*	0.61±0.03‡‡	1.44±0.23*†‡‡
C_{Creat} , ml.min ⁻¹ .kg body weight ⁻¹	9.3±1.0	3.5±0.3*	10.6±1.0	4.8±0.7*	3.9±0.3‡‡	1.8±0.3*†‡‡
EF_{Na+} , %	0.37±0.04	0.96±0.07*	0.21±0.05	0.55±0.20*	0.34±0.03	1.00±0.30*
Systolic BP, mmHg	121±3	138±3*	133±4	210±8*†	141±4†	223±10*†
Diastolic BP, mmHg	81±2	104±5*	94±3†	161±9*†	103±3‡‡	166±7*†
Heart rate, beats/min ⁻¹	420±15	460±30	349±10†	386±9*†	326±7†	405±10*†

Values in means±SD. P_{Creat} , plasma creatinine; C_{Creat} , creatinine clearance; EF_{Na+} , fractional sodium excretion; BP, blood pressure. * $p<0.05$ vs. Sham; † $p<0.05$ vs. 2 weeks; ‡ $p<0.05$ vs. 10 weeks.

Sham.

A redução da massa renal acompanhou-se de uma diminuição do C_{Creat} , ao longo do estudo, atingindo um valor mínimo 26 semanas após a cirurgia. No grupo *Sham*, a redução da taxa de filtração glomerular observou-se apenas às 26 semanas, sendo mesmo assim inferior ao grupo $3/4$ nx. Neste último grupo, verificou-se igualmente a elevação da EF_{Na+} ao longo do estudo.

Quantificação do ARNm por Real-Time PCR (Figura 1)

Os níveis de expressão do GAPDH foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais, o que permitiu a sua utilização como gene normalizador. Relativamente ao gene de interesse (RPN-A), observou-se no

DISCUSSION

The present study, in a rat model of CRF by $3/4$ nephrectomy, demonstrated certain known consequences of reduced renal reserve: i) compensatory increase in residual renal mass; ii) significant azotemia; iii) persistent elevation of sodium excretion by the remaining nephrons; and iv) progressive increase in systolic and diastolic blood pressure up to 26 weeks post surgery. At the same time, it was interesting to observe an early decrease in mRNA expression of the principal receptor mediating the activity of natriuretic peptides (NPR-A) in the renal medulla of the $3/4$ nx animals, an effect that persisted up to 26 weeks. Given that NPR-A expression is inversely related to local NP activity⁽⁹⁾, the results of the present study suggest early activation of the NP system in the renal medulla of the $3/4$ nx animals, which may

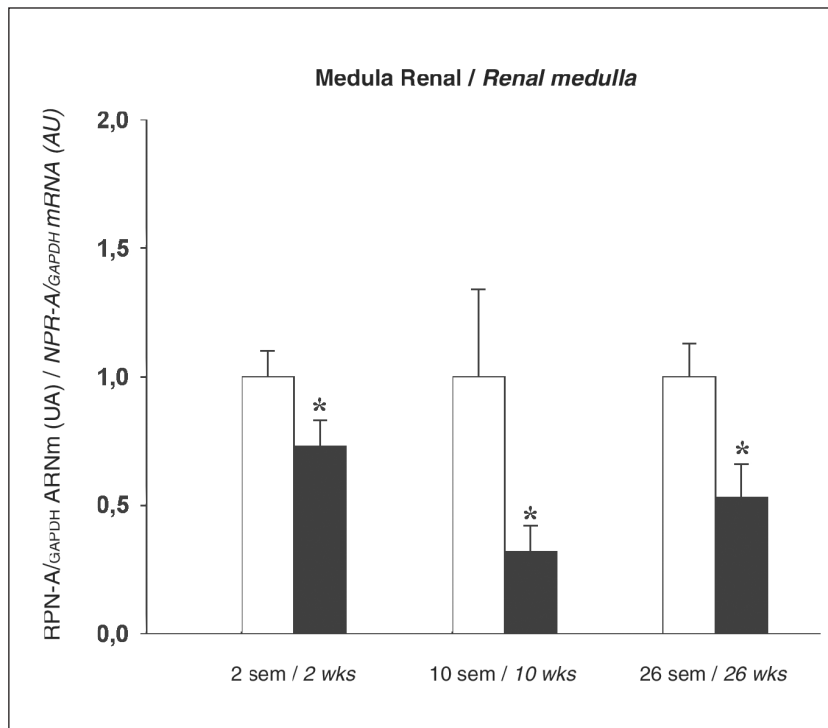


Fig. 1 Quantificação de RNAm, por RT- Real time PCR, do RPN-A da medula renal nos dois grupos experimentais: Sham e $3/4$ nx, submetido a nefrectomia de $3/4$, 2, 10 e 26 semanas após a cirurgia. No grupo submetido a nefrectomia de $3/4$ verificou-se uma diminuição sustentada dos níveis de ARNm do RPN-A, às 2, 10 e 26 semanas após a cirurgia (Sham=1 UA), $P < 0,05$ vs. Sham.

Fig. 1 Quantification by real-time PCR of NPR-A mRNA in the renal medulla of the two experimental groups, Sham and $3/4$ nx ($3/4$ nephrectomy) 2, 10 and 26 weeks post surgery. In the $3/4$ nx group a sustained reduction in NPR-A mRNA levels can be seen (Sham=1 AU), $p < 0.05$ vs. Sham.

grupo $3/4$ nx uma redução dos níveis de expressão na medula renal às 2, 10 e 26 semanas após a cirurgia.

DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou, no modelo de IRC por nefrectomia de $3/4$ no rato, algumas consequências conhecidas da redução da reserva renal, designadamente: i) aumento compensatório da massa renal residual; ii) azotemia significativa; iii) aumento persistente da excreção de sódio por nefrónio residual, e iv) aumento progressivo da pressão arterial sistólica e diastólica, até às 26 semanas após a cirurgia. Paralelamente, foi interessante verificar uma redução precoce na expressão do ARNm do receptor efector dos peptídeos natriuréticos (RPN-A) na medula renal dos animais submetidos a $3/4$ nx, a qual persistiu até às 26 semanas. Na medida em que a expressão do RPN-A se correlaciona inversamente com a actividade local do sistema dos PN's⁽⁹⁾, os resultados do presente estudo sugerem uma activação precoce do sistema dos PN's na medula renal dos animais $3/4$ nx, a qual poderá contribuir para controlar a homeostasia do sódio, mas não impede a subida progressiva da pressão arterial.

help to control sodium homeostasis but does not prevent a progressive rise in blood pressure.

The reduction in NPR-A expression in renal medulla observed in the $3/4$ nx animals can be interpreted as a consequence of increased systemic NP activity. It has been shown that CRF is accompanied by raised plasma NP levels⁽¹⁰⁾ and that chronic treatment of cultured cells with natriuretic peptide type A is followed by reduced expression of NPR-A mRNA⁽¹¹⁾. Further evidence of the relationship between increased systemic NP activity and reduced expression of the receptors is the fact that downregulation of NPR-A expression has been demonstrated in models of severe heart failure, in association with chronic NP stimulation⁽⁷⁾. However, it should be emphasized that regulation of molecular expression of NPR-A is complex and may depend on factors other than plasma concentrations of its ligands. In particular, TGF- β , angiotensin II and endothelin, all of which have shown increased activity in models of CRF, have been reported to reduce NPR-A mRNA levels in cultured cells⁽¹²⁾, and thus may also contribute to the reduced NPR-A expression seen in the present study on animals subjected to $3/4$ nephrectomy.

The early and persistent reduction in NPR-A expression in the renal medulla of $3/4$ nx

A redução observada na expressão do RPN-A na medula renal dos animais submetidos a $3/4$ nx poderá ser interpretada como sendo consequência de um aumento da actividade sistémica dos PN's. De facto, está bem documentado, por um lado, que a IRC se acompanha do aumento dos níveis plasmáticos dos PN's⁽¹⁰⁾ e, por outro, que o tratamento crónico de células de cultura com ANP se acompanha de uma redução na expressão do ARNm do RPN-A⁽¹¹⁾. Em reforço da relação entre um aumento da actividade sistémica dos PN's e a redução concomitante da expressão do receptor efector, foi documentada uma regulação negativa na expressão do RPN-A em modelos de insuficiência cardíaca grave, associada a uma estimulação crónica dos PN's⁽⁷⁾. Deve salientar-se, no entanto, que a regulação da expressão molecular do RPN-A é complexa, podendo depender de outros factores, para além da concentração plasmática dos ligandos. Designadamente, o TGF- β , a angiotensina II e a endotelina, cujo aumento de actividade tem sido descrito em modelos de IRC, mostraram reduzir os níveis de ARNm do RPN-A em células de cultura⁽¹²⁾, podendo por isso contribuir igualmente para a redução na expressão do RPN-A, observada no presente estudo em animais submetidos a nefrectomia de $3/4$.

A redução precoce e persistente observada na expressão do RPN-A na medula renal dos animais $3/4$ nx coloca a questão óbvia relacionada com a interpretação das implicações funcionais deste achado. De facto, foi repetidamente documentado que a redução da expressão do RPN-A em diversos tecidos e órgãos, designadamente no coração e no rim, se acompanha de um agravamento das lesões orgânicas e/ou da hemodinâmica sistémica, nos modelos estudados⁽¹³⁾. Animais *knock-out* para o RPN-A apresentam pressão arterial mais elevada e agravamento da hipertrofia cardíaca, independentemente do balanço de sódio. Em modelos de deleção cardíaca selectiva do RPN-A, por sua vez, a resposta hipertrófica cardíaca mantém-se, independentemente da preservação da função endócrina e da regulação do balanço de sódio pelos PN's⁽¹⁴⁾. Assim, é legítimo especular que a redução da expressão do RPN-A na medula renal dos animais $3/4$ nx possa contribuir para o agravamento das lesões renais associadas e para a subida da pressão arterial

animals obviously raises the question of the functional implications of this finding. It has consistently been found that reduced NPR-A expression in various tissues and organs, particularly the heart and kidneys, is accompanied by more severe damage to organs and/or the hemodynamic system in the models studied⁽¹³⁾. NPR-A knockout animals have higher blood pressure and worse cardiac hypertrophy irrespective of sodium balance. In models of selective cardiac NPR-A deletion, a cardiac hypertrophic response is also found, independently of preserved endocrine function or regulation of sodium balance by NPs⁽¹⁴⁾. It is thus reasonable to speculate that reduced NPR-A expression in the renal medulla of $3/4$ nx animals could exacerbate associated renal damage and increased blood pressure.

Besides raising certain questions, our results suggest that it would be worthwhile to perform complementary studies in $3/4$ nephrectomy CRF models to obtain serial assessments of NPR-A expression in other locations, particularly the renal cortex and myocardium, systemic activity of NPs and other mediators that may be involved in modulating the NP system, and possible correlations with the development of associated renal damage.

In conclusion, the present study shows for the first time an early and sustained reduction in NPR-A expression in the renal medulla of animals subjected to $3/4$ nephrectomy. Clarification of the functional significance of this finding may improve our understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of HT and the progression of renal damage in CRF, as well as having therapeutic implications.

que se observou.

Para além de colocarem algumas interrogações, os nossos resultados sugerem o interesse da realização de estudos complementares que avaliem seriadamente, no modelo de IRC por nefrectomia de $3/4$, a expressão do RPN-A noutras localizações, designadamente no córtex renal e no miocárdio, a actividade sistémica dos PN's e de outros mediadores com envolvimento potencial na modulação da actividade deste sistema e a sua correlação eventual com o estabelecimento das lesões renais associadas.

Em conclusão, o presente estudo evidencia pela primeira vez uma redução precoce e

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

MANUEL PESTANA

Unidade de Investigação e Desenvolvimento
em Nefrologia

Av. Prof. Hernâni Monteiro
4200 PORTO – PORTUGAL

e-mail: mvasconcelos@hsjoao.min-saude.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Totsune K, Mackenzie HS, Totsune H, Troy JL, Lytton J, Brenner BM. Upregulation of natriuretic peptide gene expression in remnant kidney of rats with reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9(9):1613-9.
2. Smith S, Anderson S, Ballermann B, Brenner BM. Role of atrial natriuretic peptide in adaptation of sodium excretion with reduced renal mass. *J Clin Invest.* 1986; 77: 1395-1398.
3. Kasahara M, Mukoyama M, Sugawara A, Makino H, Suganami T, Ogawa Y, Nakagawa M, Yahata K, Goto M, Goto R, Ishibashi R, Tamura N, Tanaka I, Nakao K. Ameliorated Glomerular Injury in Mice Overexpressing Brain Natriuretic Peptide with Renal Ablation. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 1691-1701.
4. Suganami T, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Kshahara M, Yahata K, Makino H, Fujinaga Y, Ogawa Y, Tanaka I, Nakao K. Overexpression of Brain Natriuretic Peptide in Mice Ameliorates Immune-Mediated Renal Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2652-2663.
5. Pandey K. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 2005; 26:901-932.
6. Oliver P, Fox J, Kim R, Rockman H, Kim H, Reddick R, Pandey K, Milgram S, Smithies O, Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:14730-14735.
7. Tsutamoto T, Kanamori T, Morigami N, Sugimoto Y, Yamaoka O, Kinoshita M. Possibility of downregulation of natriuretic peptide receptor coupled to guanylate cyclase in peripheral vascular beds of patients with chronic severe heart failure. *Circulation* 1993 Aug; 88(2):811-3.
8. Samplicini A, Ceolotto G, Sartori M, Maresca A, Baritono E, de Toni R, Paparella I, Caló L. Regulation of glomerular filtration in essential hypertension: role of abnormal transport and atrial natriuretic peptide. *J. Nephrol.* 2002; 15:489-496.
9. Pandey K. Internalization and trafficking of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A. *Peptides* 2005; 26:985-1000.
10. Horl W. Natriuretic Peptides in Acute and Chronic Kidney Disease and during Renal Replacement Therapy. *J Investig Med.* 2005; 53(7):366-70.
11. Cao L, Wu J, Gardner D. Atrial natriuretic peptide suppresses the transcription of its guanylyl cyclase-linked receptor. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:24891-24897.
12. Fujio N, Gossard F, Bayard F, Tremblay J. Regulation of natriuretic peptide receptor A and B expression by transforming growth factor-beta 1 in cultured aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 1994; 23:908-913.
13. Pandey K, Nguyen H, Li M, Boyle J. Natriuretic peptide receptor-A negatively regulates mitogen-activated protein kinase and proliferation of mesangial cells: role of cGMP-dependent protein-kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 271:374-379.
14. Kuhn M. Cardiac and intestinal natriuretic peptides: Insights from genetically modified mice. *Peptides* 2005; 26:1078-1085.