



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANTONIO RAFAEL COELHO JORGE

INTERAÇÕES ENTRE A INGESTÃO ALTA DE SÓDIO E OS PEPTÍDEOS
URODILATINA E UROGUANILINA NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS.

FORTALEZA

2013

ANTONIO RAFAEL COELHO JORGE

INTERAÇÕES ENTRE A INGESTÃO ALTA DE SÓDIO E OS PEPTÍDEOS
URODILATINA E UROGUANILINA NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS.

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia do
Departamento de Fisiologia e
Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.

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

Co-orientador: Prof^o. Dr. Manassés
Claudino Fonteles

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

J71i Jorge, Antonio Rafael Coelho
Interações entre a ingestão alta de sódio e os peptídeos urodilatina e uroguanilina na
função renal de ratos / Antonio Rafael Coelho Jorge. – 2013.
117f. : enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde,
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Fisiologia e Farmacologia

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

1. Fisiologia. 2. Nefrologia. 3. Adaptação. I. Título.

CDD: 612

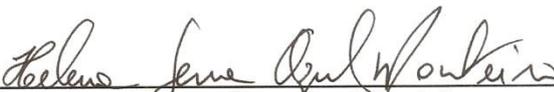
ANTONIO RAFAEL COELHO JORGE

**INTERAÇÕES ENTRE A INGESTÃO ALTA DE SÓDIO E OS
PEPTÍDEOS URODILATINA E UROGUANILINA NA FUNÇÃO
RENAL DE RATOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 26 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA



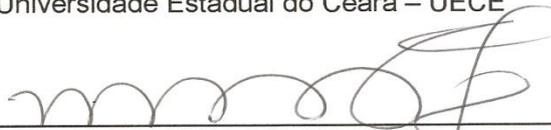
Prof. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Orientadora)



Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Coorientador)



Prof. Dr. Krishnamurti de Morais Carvalho
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Deus triúno, soberano, eterno, imutável, infinito, sábio, misericordioso, bom, justo, íntegro, fiel, criador dos céus e terra. Conforme as palavras do apóstolo Paulo: “pois nele vivemos, e nos movemos, e existimos” At. 17:28. A Ele somente toda a glória pelos séculos dos séculos.

Ao meu pai Milton, minha mãe Margarida e meu irmão Samuel; que sempre me ajudaram nessa difícil caminhada de graduação e pós-graduação. Sou muito grato a Deus pelos pais que vocês são, amo vocês!

Agradeço ao meu grande irmão, amigo e discipulador em Cristo, Vagner Lemos. Obrigado pelos momentos de comunhão em sua família, pelos seus conselhos, pelo seu ensino, pelas exortações e pelas palavras de vida que tem sempre me ajudado tão profundamente a compreender as verdades de nossa fé cristã. Tenho por você um profundo afeto, carinho e admiração; como um filho por seu pai.

Ao Dr. Manassés Claudino Fonteles, por ter idealizado esse trabalho tão fascinante e ter depositado em mim a confiança de realizá-lo. Agradeço a Deus pela oportunidade de tê-lo como orientador, no qual me ensinou muitas lições que certamente levarei por toda minha peregrinação.

A Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pela confiança de ter me aceito como orientando e pela dedicação oferecida, com sua imensa experiência.

Ao Dr. Alexandre Havt, pelos conselhos e sua dedicação em ensinar tudo pacientemente, um exemplo de pesquisador a ser seguido.

A meu amigo e irmão Ítalo Reuber por sua amizade, compartilhando sempre as lutas e alegrias.

Agradeço também ao amigo e irmão Edson Júnior que tão pacientemente me ensinou verdades preciosas; sempre compartilhando do seu tempo e conhecimento.

Agradeço a todos os irmãos e amigos da minha querida e amada Igreja Batista de Parquelândia, no qual tenho aprendido a “batalhar diligentemente pela fé que foi entregue aos santos”.

A minha prima Roberta Jorge por sua ajuda sempre tão presente em vários momentos no laboratório cuidando sempre de cada detalhe e não

deixando faltar nada. Sou muito grato por compartilhar muitas vezes as cargas pesadas da rotina diária.

A técnica Maria Silvia Helena Freire de França por ter me ensinado muita das técnicas laboratoriais, desde a lavagem do sistema de perfusão até a dosagem de inulina. Sua ajuda foi imprescindível para a realização do presente trabalho.

Agradeço a professora Renata de Sousa Alves que também tão pacientemente me ensinou diversas técnicas básicas necessárias para desenvolver esse trabalho.

Aos pós-graduandos, mestrandos e doutorandos, do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET) Daniel Freire, Rafael Ximenes, Terentia, Fabíola Carine, Marta, Paulo César, Isabel, Natacha, Aline, Pedro, Danya, Delvane, Socorro e Neto pela ajuda que me foram prestadas ao longo desses anos.

Aos funcionários do IBIMED José Amadeus, Domingos Barreto, Terezinha, Juciê e Bento que me ajudaram e me ensinaram muitas das técnicas e do funcionamento do laboratório.

Aos meus amigos e colegas que compartilharam comigo diversos momentos no Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

As secretárias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia Aura e Márcia, por sempre me atenderem com atenção e presteza.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento (CNPq) pela bolsa auxílio para execução deste trabalho.

A todos os meus amigos e familiares que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho, agradeço a todos!

“Enquanto assim falava, veio uma nuvem e os envolveu;
e encheram-se de medo ao entrarem na nuvem.
E dela veio uma voz, dizendo:
Este é o meu Filho, o meu eleito; a ele ouvi.”
Lucas 9.34-35

RESUMO

O elevado consumo de sódio na dieta tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, promovendo o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, como hipertensão arterial, acidente vascular cerebral e doenças coronarianas. Peptídeos como a urodilatina (UD) e uroguanilina (UGN) têm sido implicados na regulação da homeostase de sal e água. Porém, os mecanismos de regulação ainda não foram bem esclarecidos, assim como suas interações na função renal. O objetivo desse trabalho é estudar os principais efeitos dos peptídeos UD e UGN em rins de ratos submetidos a alta ingestão de NaCl. Os efeitos foram examinados usando ratos Wistar mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas. O grupo controle recebeu somente água destilada, enquanto que o grupo tratado recebeu 2% de solução de NaCl. A função renal foi avaliada através da perfusão de rim isolado de ratos. Os dados foram comparados através de teste *t* de Student e ANOVA, com significância de 5%. A UD promoveu redução da pressão de perfusão, resistência vascular renal e fluxo urinário, foi observado também aumento da excreção de sódio e cloreto, sendo as alterações mais proeminentes ao nível distal. Contudo, após tratamento com sal os efeitos da UD não foram vistos, observou-se um aumento transporte de sódio e cloreto mais pronunciado ao nível proximal. Os efeitos da UGN também foram avaliados na presença do sal, onde foram observados a elevação da pressão de perfusão, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular; seguido de aumento na excreção de sódio e cloreto, principalmente ao nível de túbulo proximal. Os resultados também demonstraram a expressão aumentada de mRNA do receptor GC-C e uma discreta redução na expressão de GC-A em ratos tratados com sal. Após uma ingestão aumentada de sal, são ativadas vias fisiológicas muito bem reguladas no objetivo de eliminar o excesso de sódio. A UGN parece ser o hormônio primordial envolvido nessa via, contudo a UD apresentam também participações nesse processo. O receptor GC-C está diretamente envolvido na regulação desses processos fisiológicos.

Plavras-chaves: urodilatina, uroguanilina, NaCl, rim, gaiolas metabólicas.

ABSTRACT

The high sodium intake in the diet has increased considerably in recent decades, promoting the development of several chronic diseases such as hypertension, stroke and coronary heart disease. Peptides such as urodilatin (UD) and uroguanylin (UGN) have been implicated in the regulation of salt and water homeostasis. However, the regulatory mechanisms are not well understood, as well as their interactions on renal function. The aim of this work is to study the main effects of the peptides UD and UGN in kidneys of rats subjected to high NaCl intake. The effects were examined using rats for 10 days kept in metabolic cages. The control group received distilled water only, whereas the treated group received 2% solution of NaCl. Kidney function was assessed by perfusion of the isolated rat kidney. Data were compared using Student's t test and ANOVA with significance level of 5%. The UD promoted reduction of perfusion pressure, renal vascular resistance and urine flow was also observed increased excretion of sodium and chloride, with changes most prominent at the distal level. However, after treatment with salt UD effects were not seen, there was an increase in transport of sodium and chloride to the proximal most pronounced. The effects of UGN were also evaluated in the presence of salt, which was observed to increase perfusion pressure, urine flow and glomerular filtration rate, followed by an increase in the excretion of sodium and chloride, especially at the proximal tubule. The results also showed increased expression of mRNA GC-C receptor and a slight reduction in the expression of GC-A in rats treated with salt. After an increased intake of salt, physiological pathways are activated well regulated in order to eliminate excess sodium. The UGN seems to be the primary hormone involved in this pathway, but the UD also have interests in this process. The GC-C receptor is directly involved in the regulation of these physiological processes.

Key-words: urodilatin, uroguanylin, NaCl, kidney, metabolic cages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1:	Estrutura primária dos peptídeos natriuréticos humanos (ANP, BNP e CNP).....	08
FIGURA 2:	Esquema da estrutura molecular e funções conhecidas dos receptores de peptídeos natriuréticos NPR-A, NPR-B e NPR-C.....	09
FIGURA 3:	Comparação das estruturas moleculares do peptídeo natriurético atrial (ANP) e urodilatina.....	11
FIGURA 4:	Comparação das estruturas moleculares dos peptídeos gunilina (GN) e uroguanilina (UGN) de humanos, e a toxina termoestável de <i>Escherichia coli</i> (STa).....	15
FIGURA 5:	Modelo para a resposta pós-prandial à ingestão de sal em ratos.....	17
FIGURA 6:	Foto do sistema de perfusão de rim isolado.....	24
FIGURA 7:	Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.....	25
FIGURA 8:	Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	26
FIGURA 9:	Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).....	27
FIGURA 10:	Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	27
FIGURA 11:	Técnica cirúrgica. A - veia femoral; B - ureter direito canulado; C - artéria mesentérica; D - cânula arterial.....	30
FIGURA 12:	Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	40
FIGURA 13:	Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	41

FIGURA 14:	Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	42
FIGURA 15:	Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	43
FIGURA 16:	Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	44
FIGURA 17:	Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	45
FIGURA 18:	Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	46
FIGURA 19:	Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	47
FIGURA 20:	Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	48
FIGURA 21:	Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	49
FIGURA 22:	Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	50
FIGURA 23:	Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	51
FIGURA 24:	Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	52

FIGURA 25:	<i>Clearance</i> osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	53
FIGURA 26:	Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	56
FIGURA 27:	Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	57
FIGURA 28:	Fluxo Urinário (FU) em em mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	58
FIGURA 29:	Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	59
FIGURA 30:	Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	60
FIGURA 31:	Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	61
FIGURA 32:	Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	62
FIGURA 33:	Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	63
FIGURA 34:	Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	64
FIGURA 35:	Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	65

FIGURA 36:	Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	66
FIGURA 37:	Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	67
FIGURA 38:	Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCl) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	68
FIGURA 39:	<i>Clearance</i> osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Pressão de Perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	40
Tabela 2:	Resistência Vascular Renal (RVR) em mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	41
Tabela 3:	Fluxo Urinário (FU) em mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	42
Tabela 4:	Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	43
Tabela 5:	Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	44
Tabela 6:	Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	45
Tabela 7:	Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	46
Tabela 8:	Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	47
Tabela 9:	Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	48
Tabela 10:	Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	49

Tabela 11:	Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	50
Tabela 12:	Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	51
Tabela 13:	Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	52
Tabela 14:	<i>Clearance</i> osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).....	56
Tabela 15:	Pressão de Perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	57
Tabela 16:	Resistência Vascular Renal (RVR) em mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	58
Tabela 17:	Fluxo Urinário (FU) em mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	59
Tabela 18:	Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em mL.g ⁻¹ .min ⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	60
Tabela 19:	Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	61
Tabela 20:	Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	62
Tabela 21:	Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	63

Tabela 22:	Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	64
Tabela 23:	Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	65
Tabela 24:	Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	66
Tabela 25:	Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa ⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	67
Tabela 26:	Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dT ⁺ K) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).	68
Tabela 27:	Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCl ⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	69
Tabela 28:	<i>Clearance</i> osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).....	70
Tabela 29:	Expressão gênica de receptores GC-A e GC-C após o tratamento por 10 dias em gaiolas metabólicas em ratos controle e tratados com 2% de NaCl por via oral.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP – Peptídeo natriurético atrial
ATP – Trifosfato de adenosina
ADH – Hormônio antidiurético
ACTH - Adrenocorticotropina
BNP – Peptídeo natriurético cerebral
cDNA – DNA complementar
CF – Fibrose cística
CFTR – Proteína reguladora da condução transmembrana da fibrose cística
cAMP – adenosina monofosfato cíclica
cGMP – guanidina monofosfato cíclica
C osm. - clearance osmótico
FU - fluxo urinário
GC – Guanilato ciclase
GN – guanilina
mRNA – RNA mensageiro
NO – óxido nítrico
OK-GC – Receptor guanilato ciclase encontrado em rim de gambá
PDE – Fosfodiesterase
PKA-II – Proteína quinase II, dependente de cAMP
PKG-II – Proteína quinase II, dependente de cGMP
PLA₂ – fosfolipase A₂
PP - pressão de perfusão
%TCI - percentual de cloro tubular total transportado
%pTCI - percentual de cloro tubular proximal transportado
TCI – transporte de cloreto
%TK - percentual de potássio tubular total transportado
%pTK - percentual de potássio tubular proximal transportado
TK – Transporte de potássio
%TNa – percentual de sódio tubular total transportado
%pTNa - percentual de sódio tubular proximal transportado
TNa – transporte de sódio

RFG - ritmo de filtração glomerular

RVR - resistência vascular renal

STa - enterotoxina termo-estável da *Escherichia coli*

UGN – uroguanilina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O papel fisiológico do sal (NaCl).....	01
1.2 O rim.....	02
1.2.1 Anatomia fisiológica dos rins.....	02
1.2.2 Mecanismo geral de transporte renal.....	04
1.2.3 Regulação da absorção de água e NaCl.....	05
1.3 Receptores de Guanilato Ciclase.....	06
1.4 Peptídeos Natriuréticos.....	08
1.5 Urodilatina.....	10
1.6 Peptídeos Guanilina e Uroguanilina.....	13
1.7 Efeitos Gerais das Guanilinas.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Animais de Experimentação.....	22
4.2. Grupos Experimentais.....	22

4.3 Perfusão de Rim Isolado.....	23
4.3.1 O Sistema de Perfusão.....	23
4.3.2 Calibração do Sistema.....	26
4.3.3 Solução Perfusora.....	28
4.3.4 Substâncias Utilizadas.....	28
4.3.5 Técnica Cirúrgica.....	29
4.3.6 Protocolo Experimental.....	31
4.3.7 Análises Bioquímicas	31
4.3.8 Cálculo dos parâmetros renais	31
4.4 Biologia Molecular.....	33
4.4.1 Isolamento de RNA.....	33
4.4.2 Síntese de cDNA pela reação de Transcriptase Reversa.....	33
4.4.3 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real.....	34
4.5 Análises Estatísticas.....	36
4.6 Comitê de Ética.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Função renal com Urodilatina.....	37
5.2 Função renal com Uroguanilina.....	54
5.3. Expressão gênica em rins tratados com sal.....	70
6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO	

1 Introdução

1.1 O papel fisiológico do sal (NaCl)

O sal é encontrado nos alimentos na forma de cloreto de sódio, constituindo um elemento essencial para manutenção de várias funções fisiológicas do organismo, tais como: transmissão nervosa, contração muscular, manutenção da pressão arterial e equilíbrio ácido-base. A regulação fisiológica da concentração de sódio no corpo é uma atividade determinante para a manutenção da saúde em seres humanos (Franco, 2006).

O uso do sal pelo homem foi primordialmente essencial para a preservação dos alimentos, permitindo o seu estoque por diversos dias sem que houvesse contaminação. Porém, a adição de sal no alimento promoveu conseqüentemente a elevação do consumo de sódio, que precisou ser precisamente regulado pelo organismo para não acumular-se e produzir danos celulares (Sarno, 2010).

O elevado consumo de sódio na dieta é fortemente associado a diversas doenças crônicas, como hipertensão arterial, acidente vascular cerebral e doenças coronarianas (Ayala *et. al.*, 2010). O consumo de sódio recomendado pela Organização Mundial de Saúde não deve ultrapassar 2 g por pessoa por dia. Contudo, o consumo de sódio no Brasil é estimado em cerca de 4,5 g por pessoa por dia, ultrapassando, portanto, o limite máximo recomendado para sua ingestão (Sarno *et. al.*, 2009). Porém, mecanismos fisiológicos permitem que esse excesso de sal ingerido na dieta não seja retido no organismo.

Os órgãos excretores possuem um papel primordial nas concentrações desejadas de água e solutos no organismo. Os rins são os órgãos excretores mais eficientes e constituem a principal via de excreção de cloreto de sódio do corpo. Assim, eles desempenham um papel importante na regulação do volume do fluido extracelular. Em condições normais, os rins mantêm o volume do fluido extracelular constante, por meio do ajuste da excreção de NaCl para igualar a quantidade excretada à quantidade ingerida na dieta (Berne *et al.*, 2004).

Os mecanismos renais que regulam a excreção de sódio são vários, dentre os principais podemos citar os hormônios como peptídeo natriurético atrial (Vander *et al.*, 2001), guanilina, uroguanilina e urodilatina (Berne *et al.*, 2009) que são os hormônios utilizados no presente estudo.

1.2 O rim

A principal função do rim é manter a constância do “meio interno”, eliminando produtos que não são mais úteis para o organismo e regulando o volume, o conteúdo de eletrólitos e o pH do líquido extracelular em face da ingestão variável na dieta e outras demandas ambientais (Rang *et al.*, 2011). As principais funções homeostáticas dos rins incluem as seguintes: excreção de produtos indesejáveis do metabolismo e de substâncias químicas estranhas, regulação do balanço de água e dos eletrólitos, regulação da osmolalidade dos líquidos corporais e das concentrações de eletrólitos, regulação da pressão arterial, regulação do balanço acidobásico, secreção, metabolismo e excreção de hormônios (Hall *et al.*, 2011).

A função regulatória do rim é de extrema importância para a manutenção da homeostasia do organismo, visto que os rins recebem cerca de um quarto do débito cardíaco (Rang *et al.*, 2011). O rim filtra o volume do fluido extracelular através dos glomérulos renais em uma média de 16 vezes ao dia e os néfrons renais regulam com precisão o volume de fluido do corpo e sua quantidade de eletrólitos através dos processos de secreção e reabsorção (Goodman & Gilman, 2012). Por isso é de grande importância a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no rim para a terapia de diversas patologias.

1.2.1 Anatomia fisiológica dos rins

Cada rim consiste em um córtex externo, uma medula interna e uma pelve oca, que desemboca no ureter. A unidade funcional do rim é o néfron, do qual há aproximadamente $1,4 \times 10^6$ em cada rim, com variação considerável entre indivíduos e com o declínio relacionado à idade (Rang *et al.*, 2011). Cada

néfron consiste em um aparato filtrante, o glomérulo, conectado a uma porção tubular longa que reabsorve e condiciona o ultrafiltrado glomerular (Goodman & Gilman, 2012).

O suprimento sanguíneo no rim é realizado pela artéria renal que entra no rim pelo hilo e então se divide progressivamente para formar artérias interlobulares, artérias arqueadas, artérias radiais e arteríolas aferentes, que terminam nos capilares glomerulares. As extremidades distais dos capilares, de cada glomérulo, coalescem para formar a arteríola eferente, que forma segunda rede de capilares, os capilares peritubulares, que circundam os túbulos renais. Os capilares peritubulares por sua vez, se esvaziam nos vasos do sistema venoso que cursam paralelos aos vasos arteriolares. Os vasos sanguíneos do sistema venoso progressivamente formam a veia interlobular, veia arqueada, veia interlobular e veia renal, que deixa o rim pelo hilo, paralelo à artéria renal e ao ureter (Hall *et al.*, 2011).

O néfron é constituído por dois componentes: o corpúsculo renal e um túbulo renal. O corpúsculo renal é formado pela cápsula de Bowman, onde o líquido filtrado dos capilares glomerulares flui para o interior e daí para o túbulo renal. O túbulo renal é composto de várias regiões: túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal que desemboca no túbulo coletor (Kierszenbaum *et al.*, 2012).

O túbulo renal é responsável pela reabsorção e a secreção de substâncias químicas e água nos segmentos tubulares. O túbulo proximal possui abundante borda em escova e mitocôndrias e é responsável pela maior parte do transporte de fluido. O segmento delgado da alça de Henle apresenta epitélio plano com variada permeabilidade para água e sódio, sendo responsável pela concentração e diluição urinária. Enquanto que o segmento espesso é caracterizado pelo transporte ativo de sódio desacompanhado de água (segmento diluidor). O túbulo distal e o ducto coletor são revestidos por vários tipos peculiares de células. Essas células estão envolvidas na homeostasia ácido-base, equilíbrio do potássio, sódio, cálcio e reabsorção de magnésio, além da concentração urinária (Schmitz *et al.*, 2012).

Outra estrutura importante para a regulação renal corresponde no aparelho justaglomerular, formado pela junção de arteríola aferente, arteríola eferente e túbulo contorcido distal. Nesse aparelho há a presença de um

conjunto de células diferenciadas, denominadas células da mácula densa, que respondem a alterações no fluxo e na composição do fluido tubular e controlam a liberação de renina das células granulares especializadas contendo renina na arteríola aferente (Rang *et al.*, 2011). A principal função do aparelho justaglomerular está envolvido na regulação do ritmo de filtração, do volume plasmático e da pressão arterial por meio da renina (Schmitz *et al.*, 2012).

1.2.2 Mecanismo geral de transporte renal

Como visto anteriormente a reabsorção e secreção de substância e água ocorrem ao longo do néfron. Por isso é importante compreender os mecanismos envolvidos nesse processo de transporte renal. A superfície luminal de cada célula tubular é cercado por uma junção oclusiva, como em todos os epitélios. Esta é uma região especializada da membrana que separa o espaço intercelular da célula. O movimento de íons e água que passam pelo epitélio pode ocorrer através das células (via transcelular) e entre as células através das junções oclusivas (via paracelular) (Rang *et al.*, 2011).

O movimento de íons através da célula por via transcelular deve ser mediado por proteínas integrais incrustadas na membrana celular. Contudo, a maioria desses solutos é movidos contra o gradiente eletroquímico, sendo necessário um transporte ativo primário ou secundário para manter o gradiente transepitelial. Com frequência, o transporte mediado pelo ATP é usado para criar um gradiente eletroquímico para um dado soluto e a energia livre do gradiente do soluto é então liberada para acionar o transporte de outros solutos (Goodman & Gilman, 2012).

A Na^+ , K^+ -ATPase (bomba de sódio) na membrana basolateral hidrolisa o ATP, que leva o transporte de sódio para os espaços intercelulares e intersticiais, o movimento do potássio para a célula e o estabelecimento e manutenção de um gradiente eletroquímico para sódio através da membrana celular direcionada internamente. Além da bomba de sódio, existem outras ATPases nas células epiteliais renais que participam também do transporte de solutos, tais como Na^+ -ATPase, Ca^+ -ATPases e H^+ -ATPase. Contudo, grande parte de todo o transporte de rim ocorre graças ao abundante fornecimento da

Na^+ , K^+ -ATPase nas membranas basolaterais das células epiteliais renais (Goodman & Gilman, 2012).

Dessa forma, a reabsorção dos íons sódio, do lúmen tubular de volta para o sangue, envolve pelo menos três etapas: 1) O sódio se difunde através da membrana luminal para dentro da célula a favor do gradiente eletroquímico estabelecido pela bomba sódio-potássio ATPase, na porção basolateral da membrana; 2) O sódio é transportado, através da membrana basolateral, contra o gradiente eletroquímico pela bomba sódio-potássio ATPase; 3) Sódio, água e outras substâncias são reabsorvidas do líquido intersticial para os capilares peritubulares por ultrafiltração, processo passivo movido pelos gradientes de pressão hidrostática e coloidosmótica (Hall *et al.*, 2011).

1.2.3 Regulação da absorção de água e NaCl

Após um breve panorama dos processos envolvidos na reabsorção de água e solutos podemos chegar a uma conclusão errônea de que esses processos ocorrem de forma simples como descrita. Contudo, o rim apresenta diversos mecanismos de regulação minuciosa para que a homeostasia seja sempre assegurada.

Diversos hormônios e fatores regulam a absorção de água e do NaCl. Quando ocorre uma queda no volume do líquido extracelular, esses sinais são percebidos e ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona e aumenta a concentração plasmática de angiotensina II. A angiotensina II estimula a reabsorção de NaCl e água no túbulo contorcido proximal (Kierszenbaum *et al.*, 2012).

O aumento da concentração plasmática de angiotensina II por sua vez, estimula a secreção de aldosterona. A aldosterona é sintetizada pelas células da zona glomerulosa do córtex supra-renal, e sua função consiste em aumentar a reabsorção de sódio, especialmente nos túbulos coletores corticais (Hall *et al.*, 2011).

O peptídeo natriurético atrial (ANP) e a urodilatina são codificados pelo mesmo gene e têm sequências de aminoácidos semelhantes. O ANP tem duas funções principais: aumentar a excreção urinária de NaCl e água e inibir a

liberação do hormônio antidiurético (ADH) pela neuro-hipófise. Enquanto isso, a urodilatina é secretada pelas células epiteliais do túbulo contorcido distal e do túbulo coletor e inibe a reabsorção de NaCl e água pela porção do túbulo coletor. A urodilatina é um hormônio natriurético e diurético mais potente que o ANP (Kierszenbaum *et al.*, 2012). Ambos serão abordados com mais detalhes mais adiante, visto sua importância no presente estudo.

Por fim, podemos citar o hormônio antidiurético (ADH), ou vasopressina. Quando o volume do líquido extracelular diminui, nos casos de hipovolemia, o ADH aumenta a permeabilidade à água da membrana luminal dos ductos coletores corticais e medulares, permitindo o equilíbrio osmótico com o interstício circundante (Schmitz, 2012).

1.3 Receptores de Guanilato Ciclase

A guanilato ciclase (GC) está diretamente envolvida na síntese de cGMP em resposta a diversos sinais, tais como óxido nítrico (NO) e peptídeos ligantes. A concentração intracelular de cGMP regula a fisiologia celular por ativar proteínas quinases ou alterar a concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos através da regulação de fosfodiesterases (PDEs) (Lucas *et al.*, 2000).

A enzima guanilato ciclase é encontrada em duas formas principais: a solúvel e a particulada. A ativação da forma solúvel ocorre em resposta ao óxido nítrico (NO). A particulada está presente na membrana plasmática e é ativada em resposta a peptídeos endógenos. Os principais ligantes que atuam como agonistas para os receptores de GCs são os peptídeos natriuréticos e o da família das guanilinas (Kuhn, 2004).

Foram encontrados sete isoformas para o receptor de membrana guanilato ciclase. Os receptores dos peptídeos natriuréticos, guanilato ciclase A (GC-A) e B (GC-B), foram os primeiros GCs clonados de tecidos de mamíferos (Chang *et al.*, 1989), posteriormente foi determinado que GC-A (ou NPR-A) é o receptor para ANP e BNP, enquanto GC-B (ou NPR-B) tem CNP como agonista (Sindic *et al.*, 2006). Guanilato ciclase C (GC-C) é o receptor para a enterotoxina termo-estável da *E. coli* (STa) (Schulz *et al.*, 1990), e para os peptídeos endógenos guanilina e uroguanilina (Hamra *et al.*, 1993). Os receptores GCs remanescentes são denominados de receptores órfãos, pois

os ligantes extracelulares ainda não são conhecidos. Guanilato ciclase D (GC-D) é expressa principalmente em célula olfatórias. As duas outras isoformas de GC apresentam a sua predominância em células oculares, sendo elas guanilato ciclase E (GC-E) e F (GC-F) expressas na retina. A mais recente das GCs descritas foi a guanilato ciclase G (GC-G), apresentando uma semelhança com os receptores de peptídeos natriuréticos, embora não seja ativado por esses peptídeos (Sindic et al., 2006). Estudos com *Caenorhabditis elegans* mostraram a existência de aproximadamente 30 genes codificantes para a GC, demonstrando ainda o pouco conhecimento atual de estudos com mamíferos (Yu et al., 1997).

Guanilato ciclase C é o principal receptor para a guanilina no intestino. Estudos de mRNA para a GC-C demonstraram sua expressão nas glândulas adrenais, no fígado embrionário ou em estados regenerativos, placenta, testículos, vias aéreas, timo e linfonodos. GC-C de humanos e ratos apresentam 71% de homologia no domínio extracelular e 91% no domínio intracelular (Fan et al., 1997).

A existência de um receptor adicional para a guanilina, passou a ser discutido após estudos dos efeitos renais e intestinais desse peptídeo em camundongos “knockout” para o gene de GC-C. O tratamento desses animais in vivo com o peptídeo guanilina e uroguanilina induzem o aumento da excreção urinária de sódio, cloreto, potássio e água de maneira quantitativamente similar as respostas renais apresentadas em camundongos que apresentam o gene para GC-C (Carrithers et al., 1999, 2004).

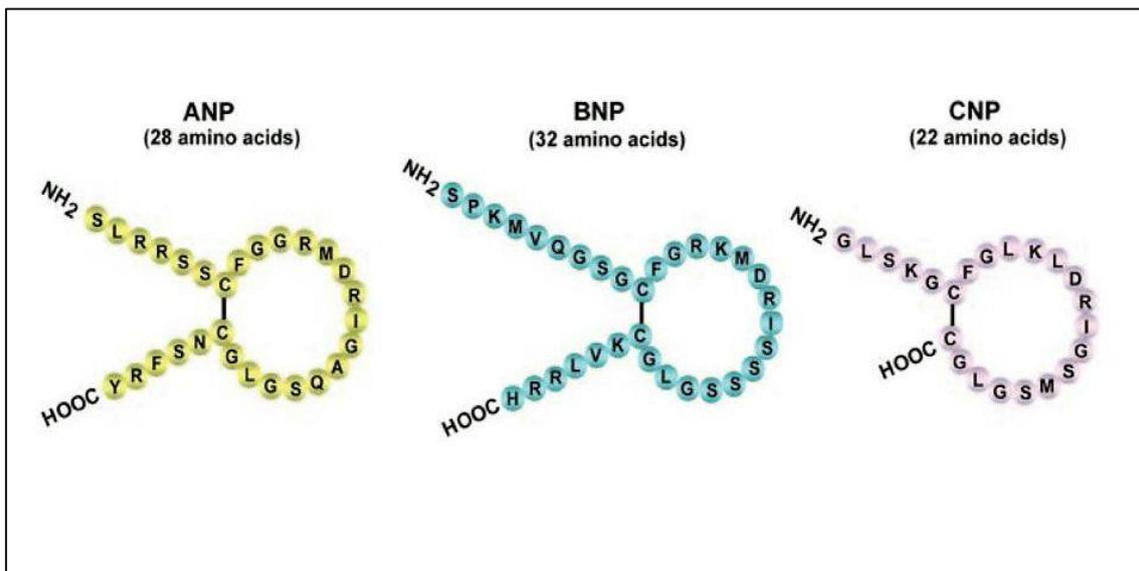
Os receptores de GC são amplamente distribuídos em diferentes células, tecidos e órgãos do corpo, sugerindo sua importância na regulação de diversos mecanismos celulares ainda não elucidados. O envolvimento do cGMP na via de sinalização renal sugere um possível envolvimento de outro receptor GC além do GC-C, pois o tratamento de camundongos “knockout” para GC-C com o peptídeos GN também demonstrou o aumento da excreção urinária de cGMP (Carrithers et al., 2004). Estudo realizado com peixes teleósteos tem sugerido a existência de duas diferentes formas do gene para GC-C, fortalecendo a tese da existência em mamíferos superiores de mais de uma isoforma para o receptor de GC-C (Comrie et al., 2001).

1.4 Peptídeos Natriuréticos

Os peptídeos natriuréticos apresentam diversas funções na regulação da fisiologia renal e cardiovascular. A esta família incluem o peptídeo natriurético atrial (ANP), o peptídeo natriurético cerebral (BNP) e o peptídeo natriurético tipo-C (CNP). ANP e BNP são peptídeos natriuréticos que são expressos principalmente nos átrios e ventrículos, respectivamente, e são referidos como peptídeos natriuréticos cardíacos. Enquanto que o CNP é expresso no sistema nervoso central e vascular (células endoteliais, monócitos/macrófagos), onde está envolvido na regulação neuronal e no controle vascular, sua ação ainda não é bem conhecida (Suzuki *et al.*, 2001).

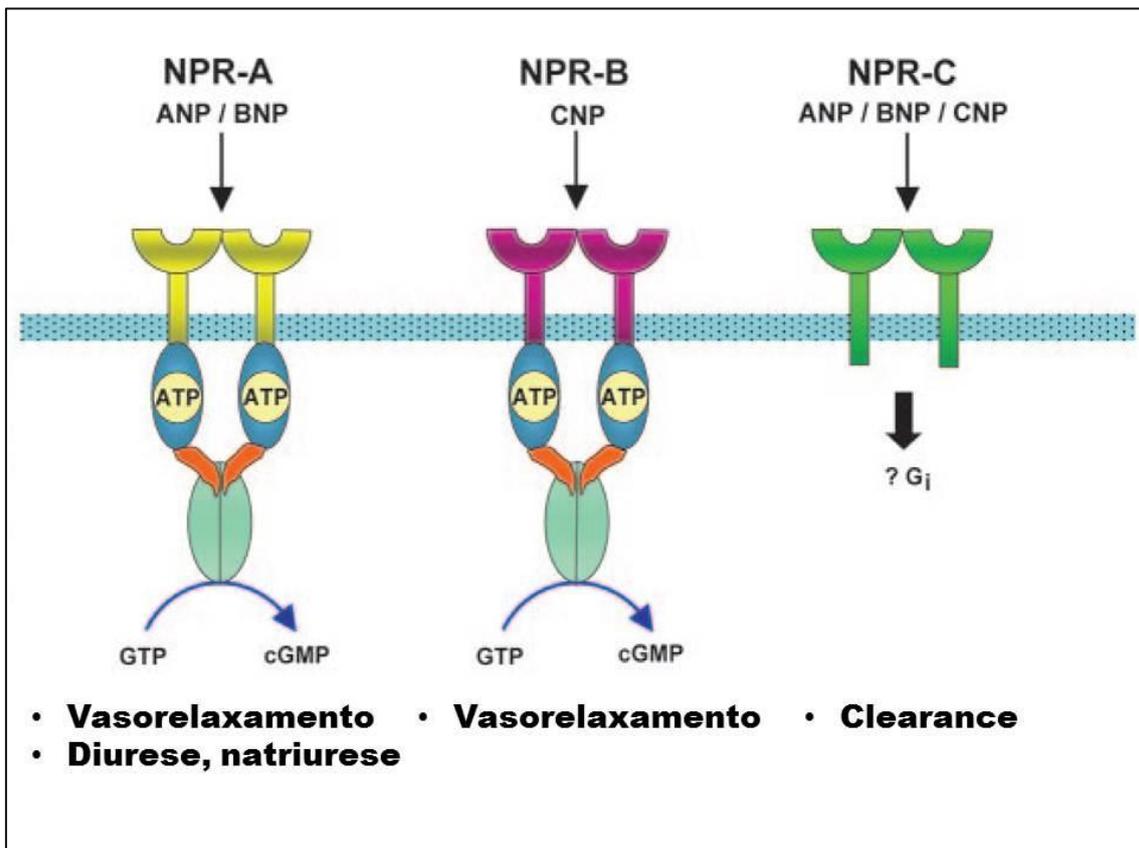
A estrutura bioquímica destes três peptídeos é bastante semelhante (ver Figura 01), sendo produzidos como pró-hormônio ou proteína precursora que precisa ser clivada para produzir sua forma ativa. Uma propriedade bioquímica comum dos peptídeos natriuréticos é a presença de uma ponte dissulfeto que resulta em uma estrutura em forma de anel. Os aminoácidos presentes na estrutura de anel são amplamente conservados, pois essa estrutura é necessária para a ligação ao receptor (Boomsma *et al.*, 2001).

Figura 01 – Estrutura primária dos peptídeos natriuréticos humanos (ANP, BNP e CNP). (Gardner *et al.*, 2007).



As ações biológicas dos peptídeos natriuréticos são produzidos através de sua ligação a receptores específicos. Esses receptores são denominados como ANP-A (NPR-A, GC-A), ANP-B (NPR-B, GC-B) e ANP-C (NPR-C) (Suzuki *et al.*, 2001). Os receptores ANP-A e ANP-B apresentam como domínio catalítico a enzima guanilato ciclase, estando envolvidos na cascata de sinalização dependente de cGMP. Os principais ligantes do receptor ANP-A são o ANP e o BNP, enquanto que o receptor ANP-B apresenta como ligante primário o CNP. O receptor ANP-C não possui um domínio intracelular e não se encontra acoplado à guanilato ciclase como os demais receptores, sua função está relacionada ao *clearance* dos peptídeos natriuréticos e regulação celular através do acoplamento à proteína-G e adenilato ciclase (Figura 02) (Murthy *et al.*, 2000).

Figura 02 – Esquema da estrutura molecular e funções conhecidas dos receptores de peptídeos natriuréticos NPR-A, NPR-B e NPR-C (Modificado de Gardner *et al.*, 2007).



Os principais efeitos dos peptídeos natriuréticos estão relacionados a ações periféricas e centrais. O ANP é liberado pelo coração quando ocorre expansão de volume e o BNP apresenta propriedades semelhantes ao ANP, enquanto que o CNP exibe pouca atividade natriurética e diurética. Os principais efeitos periféricos incluem natriurese, vasodilatação e inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Efeitos centrais incluem inibição do centro da sede, efeito antipressor, inibição do apetite ao sal e dos hormônios ADH e ACTH (Suzuki *et al.*, 2001).

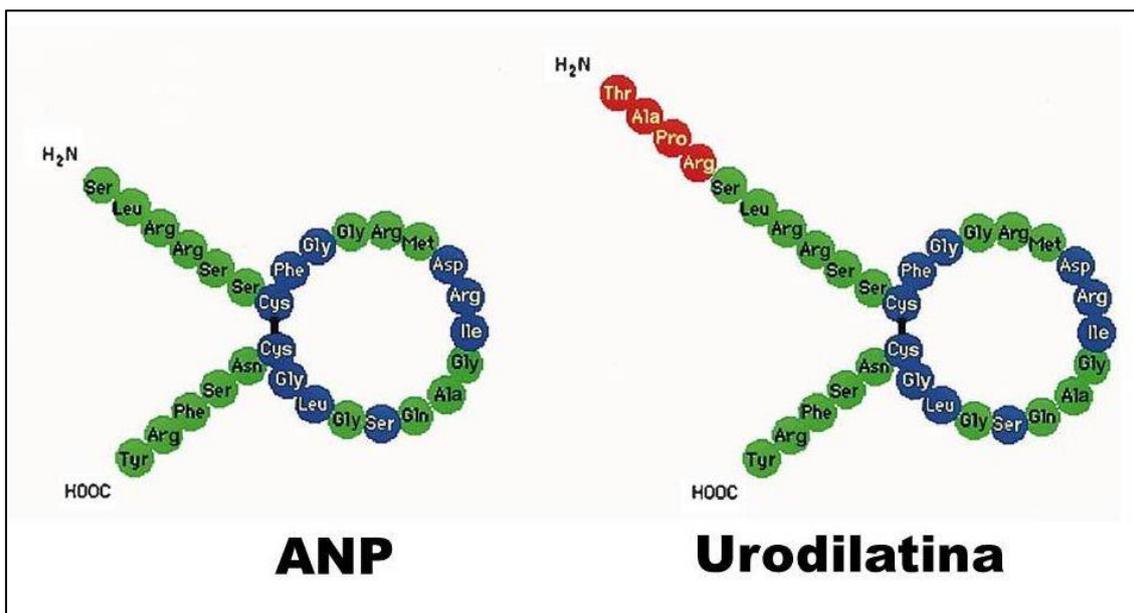
A expansão de volume promove ação diurética pelo ANP através da vasodilatação da arteríola aferente e vasoconstrição da arteríola eferente dos glomérulos, aumentando a taxa de filtração glomerular e a carga filtrada de sódio (Melo *et al.*, 2000). O ANP também inibe a reabsorção tubular de NaCl e água nos túbulos distais e coletores do rim. O ANP ainda inibe a secreção de renina pelo aparelho justaglomerular, inibe a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal e inibe a secreção de ADH pela pituitária posterior (Berne *et al.*, 2004).

1.5 Urodilatina

A urodilatina e o ANP são codificados pelo mesmo gene e têm sequência de aminoácidos similares. A forma circulante do ANP consiste em um peptídeo de 28 aminoácidos, muito similar a urodilatina que apresenta uma extensão de 4 aminoácidos adicionais na terminação amina (Figura 03). A estrutura da proteína é muito similar entre os peptídeos, sendo a ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteínas essencial para a atividade do peptídeo (Hirsch *et al.*, 2006).

A urodilatina é sintetizada e secretada pelo túbulo distal e ducto coletor e não se encontra presente na circulação sistêmica (Berne *et al.*, 2009). Os estudos com urodilatina demonstraram que sua ação natriurética e diurética ser mais potente que o ANP, ação atribuída a urodilatina ser inativada pela endopeptidase neutra a uma taxa muito mais lenta do que o ANP (Kirchhoff *et al.*, 1994).

Figura 03 – Comparação das estruturas moleculares do peptídeo natriurético atrial (ANP) e urodilatina (Modificado de Forssmann *et al.*, 1998).



Estudos com voluntários sadios que receberam uma dieta rica em sódio demonstraram uma significativa correlação entre natriurese e excreção de urodilatina (Forssmann *et al.*, 2001). Foi descrito que a urodilatina é liberada pelos rins durante uma expansão de volume do fluido extracelular, que devido ao aumento do volume ocorre a ativação dos sensores vasculares de volume de alta e de baixa pressão que enviam sinais para os rins que resultam na excreção aumentada de NaCl e de água (Berne *et al.*, 2009).

A administração sistêmica de urodilatina demonstrou suas diversas funções em outros órgãos além do rim. Os principais efeitos observados foram aumento da diurese, natriurese e redução da pressão arterial. Esses efeitos observáveis ocorrem principalmente devido as alterações vasculares promovidas pelas urodilatina nos mais diversos órgãos (Forssmann *et al.*, 2001).

Os efeitos vasculares da urodilatina no sistema renal apresentam bastante similaridades com o do ANP. Demonstrou-se que ambos os peptídeos induzem vasodilatação pré-glomerular (artérias arqueadas) e constrição da arteríola eferente do néfron (Endlich *et al.*, 1995). A vasodilatação pré-glomerular, promovida principalmente pela ativação dos receptores de guanilato ciclase presentes nas células do músculo liso, que produzem o

segundo mensageiro cGMP que ativam proteinocinase G (Forssmann *et al.*, 2001), reduzindo a concentração intracelular de cálcio, produzindo vasodilatação. Enquanto isso, os mecanismos que promovem a constrição da arteríola eferentes podem ser resultado da liberação secundária de endotelina (Endlich *et al.*, 1995).

A redução da pressão arterial induzida pela administração sistêmica de urodilatina pode ser explicada pelo seu efeito vasodilatador em artérias. Além disso, foi demonstrado que a urodilatina promove ação nas vias aéreas através de efeitos broncodilatores, o qual tem sugerido o seu uso terapêutico similar ao agoista β_2 albuterol na asma (Fluge *et al.*, 1999). Podemos perceber que a Urodilatina exerce uma importante função na dilatação do músculo liso, no controle de líquidos corporais e no equilíbrio de eletrólitos, especialmente o sódio. Porém muitas outras funções da urodilatina já foram demonstradas nas vias aéreas e no sistema imune, por isso que é importante compreendermos a multifuncionalidade da urodilatina como um candidato de fármaco em potencial para a terapia de diversas patologias (Forssmann *et al.*, 2001).

Urodilatina exerce suas funções no rim principalmente pela estimulação do receptor de guanilato-ciclase A (GC-A) (Forssmann *et al.*, 2001). A secreção de urodilatina é estimulada pelo aumento da pressão arterial e por aumento da função dos rins (Berne *et al.*, 2009). A ativação do receptor de GC-A pela urodilatina promove a formação do segundo mensageiro cGMP, que ativa diversas vias intracelulares ainda não bem estabelecidas, que levam a natriurese e diurese promovida por esse hormônio (Vives *et al.*, 2010).

A reabsorção de sódio no túbulo proximal é principalmente dirigida pelo gradiente de sódio gerado via Na^+ , K^+ -ATPase e Na^+ -ATPase (Wang *et al.*, 2009). Evidências tem demonstrado que ANP e urodilatina inibem a Na^+ -ATPase e parece não exercer qualquer alteração na Na^+ , K^+ -ATPase em células de túbulo proximal isolado (Vives *et al.*, 2010). Contudo, outros estudos sugerem que urodilatina também exerce efeito inibidor na Na^+ , K^+ -ATPase em células do túbulo proximal do néfron (Citarella *et al.*, 2009). Esses achados se tornam importantes para a compreensão dos mecanismos de ação da urodilatina, que parecem não serem restritos ao receptor GC-A, demonstrado que muito de seus efeitos precisam ser mais bem elucidados.

Existe uma linha de evidência que apoia a hipótese que urodilatina, em vez de ANP, é o membro da família dos peptídeos natriuréticos primariamente envolvidos na regulação da excreção de sódio renal. No entanto, muitas evidências sugerem que urodilatina e ANP apresentam funções distintas na regulação do sódio. O efeito parácrino da urodilatina é muito importante para promover uma regulação mais precisa do transporte de sódio e água (Hirsch *et al.*, 2006).

A urodilatina além de seus efeitos específicos em receptores promove também interação com alguns hormônios importantes na regulação do sódio. Observou-se a interação da urodilatina com a aldosterona em estudos com voluntários sadios. Foi demonstrado que aldosterona diminui significativamente de forma dose-dependente após a administração de urodilatina (Forssmann *et al.*, 2001).

Estudos tem demonstrado que urodilatina também apresenta uma interação com dopamina, resultando em efeitos diuréticos e natriuréticos. A urodilatina estimula a captação de dopamina em células tubulares do rim, efeito esse mediado pelo receptor GC-A. O acúmulo de dopamina nas células renais resulta na inibição da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase promovida pela própria dopamina, promovendo consequentemente diurese e natriurese (Choi *et al.*, 2011).

A partir dessa breve descrição dos efeitos da urodilatina, podemos perceber a complexidade envolvida na elucidação do seu mecanismo de ação na promoção de diurese e natriurese após uma ingestão aumentada de sódio. A interação com outros mediadores e sua ação em receptores parece está relacionada com sua potência em promover seus efeitos renais. Observa-se que na literatura não há estudos que relacionem urodilatina e uroguanilina, por isso é importante se investigar seus efeitos através dessa interação.

1.6 Peptídeos Guanilina e Uroguanilina

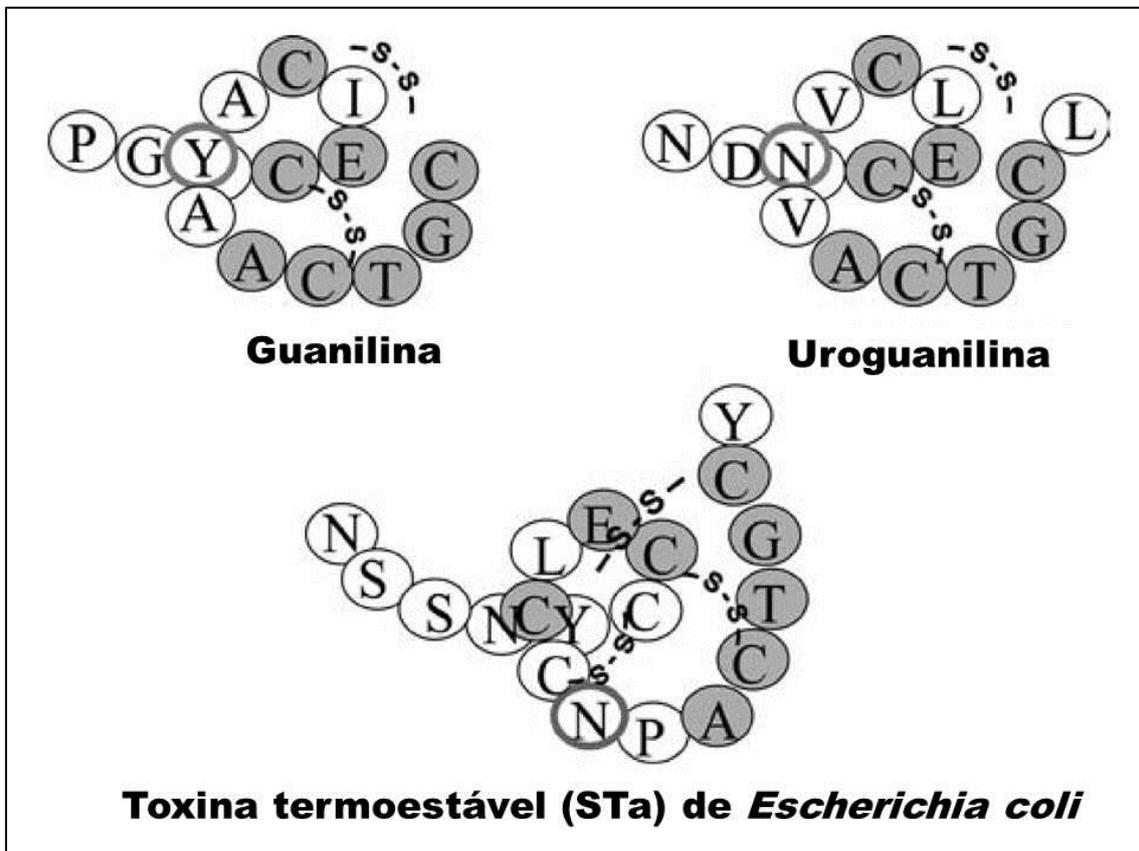
Os peptídeos guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) são moléculas pequenas, termos-estáveis com 15 a 19 aminoácidos compondo sua estrutura (Forte, 2004). Uroguanilina é similar em sua estrutura a enterotoxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa), responsável pela diarreia secretória,

produzindo assim efeitos natriuréticos similares como primeiramente descrito por Lima e Fonteles, em 1983 (Figura 04). Estudos posteriores demonstraram que a natriurese e a caliurese da enterotoxina ST de *E. coli* e do 8-bromo monofosfato cíclico de guanósina (GMPc) em rins perfundidos de ratos são produzidos de forma dose-dependente. Esses achados sugerem a existência de um peptídeo endógeno, similar à enterotoxina ST, que regula a função do transporte tubular de sódio renal (Fonteles *et al.*, 1991). O peptídeo da família das guanilinas apresentou muito de suas funções na homeostase do organismo ainda não bem esclarecidas (Currie *et al.*, 1992).

O primeiro peptídeo endógeno “STa-like” identificado foi isolado da mucosa intestinal de ratos como um ativador endógeno da guanilato ciclase C intestinal, denominado de guanilina. Guanilina é um peptídeo composto por 15 aminoácidos em sua estrutura que foi purificado do intestino utilizando como bioensaio de cGMP, as células tumorais intestinais T84 nas quais detectou a atividade do peptídeo extraído de extratos de jejuno (Currie *et al.*, 1992). O bioensaio baseia-se no fato de que células T84 de carcinoma de cólon humano apresentam grande produção de cGMP em resposta ao peptídeo STa de *E. coli* e que essas células apresentam pouca ou nenhuma resposta na produção de cGMP ao peptídeo natriurético atrial (ANP) e ao óxido nítrico (NO), sugerindo a presença no intestino de substância com atividade farmacológica similar para a ativação desses receptores (Forte *et al.*, 2000).

Peptídeo similar a guanilina foi encontrado abundantemente na urina do gambá. Ele foi isolado, seqüenciado e reconhecido como um novo peptídeo denominado de uroguanilina (UGN). A UGN foi posteriormente isolada da urina de humanos e ratos, mucosa intestinal de gambás e ratos, e do plasma obtido de humanos e gambá, sendo o principal peptídeo da família das guanilinas encontrado na urina, são geralmente observadas a ausência ou muito baixas concentrações de guanilina na urina (Hamra *et al.*, 1993).

Figura 04 - Comparação das estruturas moleculares dos peptídeos guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) de humanos, e a toxina termoestável de *Escherichia coli* (STa). (Modificado de Sindic *et al.*, 2005).



O terceiro peptídeo da família das guanilinas foi identificado através da clonagem molecular de cDNA, codificando um peptídeo similar a guanilina que foi denominado de linfoguanilina (Forte *et al.*, 1999).

1.7 Efeitos Gerais das Guanilinas

O peptídeo guanilina é produzido no intestino após alta ingestão oral de sal e secretado no lúmen intestinal. No intestino GN e UGN ativam enterócitos via guanilato ciclase C (GC-C), com a produção de cGMP como segundo mensageiro. A ativação dessa via promove a secreção de Cl^- e HCO_3^- e inibição da absorção de Na^+ (Fonteles *et al.*, 1998). Além disso, este hormônio induz o aumento da excreção de sal e água no rim. O decréscimo da absorção de sal no intestino, associado ao aumento da excreção de sal no rim, previne o

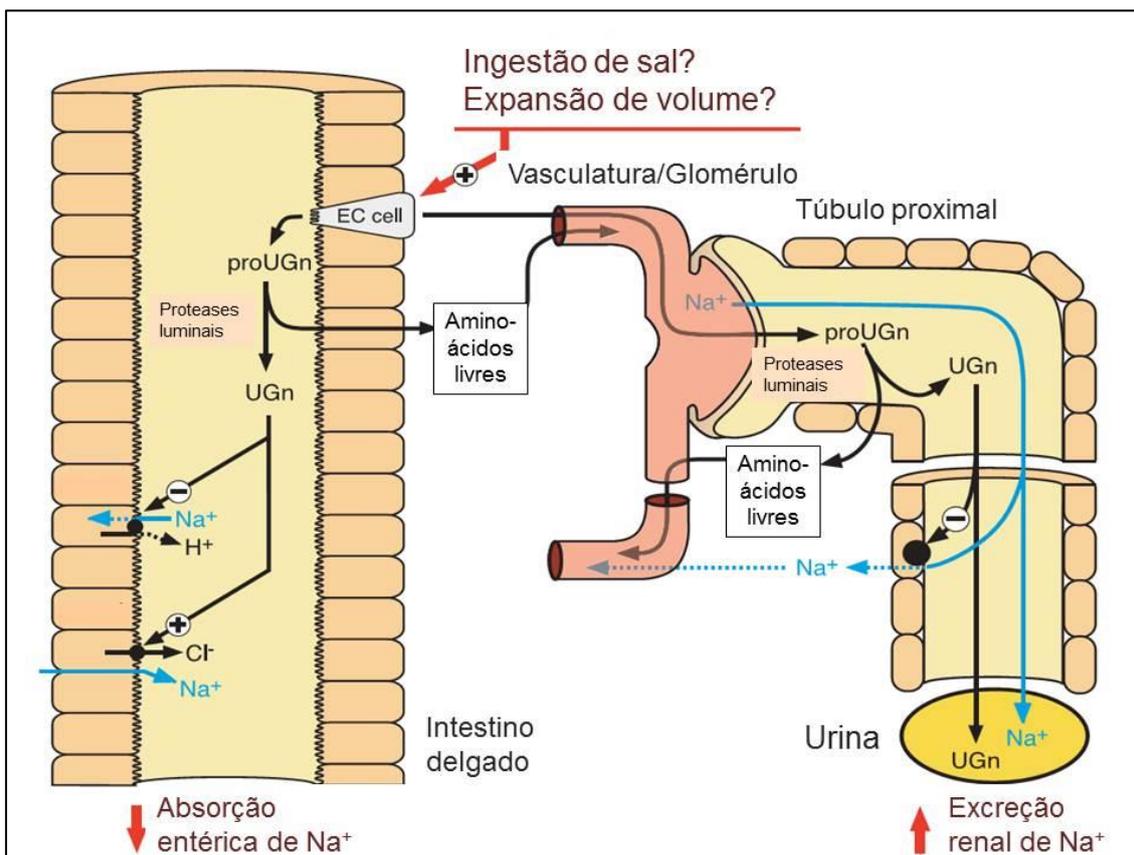
desenvolvimento de hipernatremia após a ingestão de altas quantidades de sal na dieta (Kita et al., 1999).

Em intestino de rato, o principal local de expressão de uroguanilina são as células enterocromafins (EC). A uroguanilina secretada no lúmen intestinal em resposta a alta ingestão oral de sal, liga-se a GC-C localizado na membrana luminal de enterócitos e induz a excreção de água e eletrólitos por uma complexa cascata de sinalização: 1) Aumento da concentração intracelular de cGMP; 2) Inibição do transportador Na^+/H^+ , com conseqüente decréscimo na reabsorção de Na^+ ; 3) Ativação da PKG II; 4) Inibição da fosfodiesterase III (PDE III), levando um aumento do cAMP intracelular e ativação da PKA; 5) PKG II e PKA ativam a proteína reguladora da condução transmembrana da fibrose cística (CFTR) na membrana luminal, resultando na secreção de Cl^- no lúmen intestinal; 6) CFTR ativa o transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, promovendo a secreção de bicarbonato no lúmen intestinal (representado de forma resumida na figura 05) (Sindic & Schlatter, 2006).

Guanilina e uroguanilina aumentam a secreção de Na^+ , K^+ e água em rim isolado de rato com mudanças em parâmetros renais, tais como aumento da taxa de filtração glomerular (GFR) e do fluxo urinário (FU) (Fonteles et al., 1998). A UGN atua nos segmentos do néfron regulando o transporte tubular de eletrólitos, promovendo a diminuição da reabsorção de sal pelos túbulos proximais, por inibição do permutador NHE3 (Figura 05). Além disso, aumenta a secreção de potássio em túbulo distal final e coletor cortical, via canais MAXIK (Lessa & Fonteles, 2012).

A uroguanilina então passou a ser determinada como um peptídeo natriurético intestinal, tendo seu efeito natriurético principalmente após uma alta ingestão oral de sal. Porém, a ação da UGN no rim pode ser endócrina (produzida no intestino tendo sua ação no rim), parácrina (produzida pelo rim), ou ambas. Indivíduos submetidos a uma alta dieta de sal foram comparados aos que tinham uma alimentação com baixa quantidade de sal, mostrando uma concentração plasmática de UGN bem maior no primeiro grupo, sugerindo a predominância da via endócrina de ação da UGN (Kinoshita et al, 1997).

Figura 05 – Modelo para a resposta pós-prandial à ingestão de sal em ratos (Modificado de Qian *et al.*, 2008).



A ação da linfoguanilina em rim isolado de rato também foi testada, demonstrando também seu papel na excreção aumentada de Na⁺, K⁺ e água (Fonteles *et al.*, 1999). Esses achados demonstram que os peptídeos da família das guanilinas produzem respostas renais por ação direta no rim, como elucidado principalmente pelo modelo de rim isolado de rato.

Dessa maneira, as evidências presentes na literatura demonstram a participação da uroguanilina na regulação da homeostase hidrossalina, particularmente na ingestão aumentada de sal. A ingestão de sal estimula o efluxo apical e basolateral de prouroguanilina das células enterocromafins encontradas no intestino delgado. A prouroguanilina é convertida em guanilina por proteases presentes no lúmen intestinal (Lessa & Fonteles, 2012). A guanilina atua no rim e nos rins, através dos mecanismos já citados anteriormente, aumentando principalmente a eliminação de sal.

Os mecanismos de regulação de água e eletrólitos do corpo são complexos e ainda não completamente esclarecidos, principalmente suas

interações com outros peptídeos endógenos que atuam ou inibindo ou estimulando mecanismos renais que promoveriam a excreção acentuada do sal ingerido em altas concentrações na dieta. Precisamos de mais dados na literatura para uma melhor compreensão de tais mecanismos e os seus envolvimento nas diversas patologias.

2. Justificativa

O aumento da absorção de sal pelo trato gastrointestinal pode produzir uma expansão no volume do líquido corporal. Em condições normais, os rins mantêm o volume do fluido extracelular constante, por meio do ajuste da excreção de NaCl para igualar a quantidade excretada à quantidade ingerida na dieta. Os mecanismos de transporte de água e eletrólitos são fundamentais para a manutenção da vida (Volmer *et al.*, 2001). Peptídeos como o natriurético atrial (ANP), urodilatina, guanilina e uroguanilina têm sido implicados na regulação da homeostase de sal e água, principalmente na regulação da homeostase hidrossalina (Lessa & Fonteles, 2012). Esses peptídeos têm afinidade por receptores de membrana, cujas mensagens são traduzidas em segundos mensageiros, alterando as concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Michell *et al.*, 2008).

Estudos com a toxina termoestável da *Escherichia coli* mostraram suas ações intestinais através do aumento da excreção de fluídos e eletrólitos. Guanilina e uroguanilina estimulam a secreção de cloreto pelas células intestinais, e são responsáveis pelo mecanismo de secreção de sal e água (Hamra *et al.*, 1993). Desde então, diversas pesquisas mostraram a existência de uma integração direta entre o intestino e o rim na regulação de sal ingerido na dieta (Fonteles *et al.*, 2009). Os processos envolvidos são complexos e ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que as guanilinas ligam-se a receptores presentes tanto na mucosa intestinal quanto nos túbulos renais, fazendo assim, uma ponte entre esses dois sistemas.

Uma deficiência do intestino de sensoriar a ingestão de sódio ou uma sinalização deficiente para o rim excretar sódio irá levar à sua retenção e, portanto, contribuir para mecanismos que desencadeiam a hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva ou edema (Fonteles *et al.*, 2007). Em vista disso, podemos perceber que a origem de diversas doenças pandêmicas podem estar diretamente relacionadas à regulação da excreção de sódio em função da dieta.

Os mecanismos de regulação do sódio envolvem diversos hormônios que promovem mudanças renais no processo de excreção. O mecanismo de atuação da urodilatina ainda não foi completamente elucidado, apesar de

muitos avanços já terem sido realizados (Vives *et al.*, 2010). A participação dos peptídeos guanilina/uroguanilina no eixo de comunicação entérico-renal está evidente em todos os estudos já realizados anteriormente, porém alguns de seus mecanismos de ação precisam ser mais bem compreendidos, como a sua relação com os receptores e os demais hormônios reguladores da homeostase hidrossalina.

A compreensão deste importante mecanismo endócrino irá ampliar nosso conhecimento de condições fisiopatológicas tão prevalentes em nossos dias como a hipertensão arterial e levará a uma compreensão mais detalhada na regulação hidro-eletrolítica em seres humanos. Esses dados serão de grande importância para a medicina contemporânea, visto que a modernização da sociedade trouxe mudanças nos hábitos alimentares que está diretamente relacionada ao aumento do consumo de alimentos conservados e necessariamente com uma maior quantidade de sal (Sarno, 2009).

Em vista de tudo que foi visto anteriormente, pesquisas relacionadas aos distúrbios hidrossalino em humanos e animais, se tornam importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ingestão aumentada de sal na formação de patologias como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva ou edema. Os resultados desse trabalho juntamente com os dados presentes na literatura poderão contribuir num futuro próximo para a caracterização fisiopatológica e terapêutica em humanos afetados por distúrbios na regulação entérico-renal.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar a função renal *in vitro* de ratos submetidos a uma alta ingestão de NaCl e os principais efeitos dos peptídeos urodilatina e uroguanilina em rins de ratos submetidos a essa alta ingestão de NaCl, no intuito de melhor compreender suas interações na regulação da homeostase hidrossalina após uma dieta rica em sal.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar a função renal de ratos submetidos a uma ingestão de 2% de NaCl por via oral;
- Estudar a função renal de ratos submetidos a ingestão de 2% de NaCl na presença do peptídeo urodilatina;
- Estudar a função renal de ratos na presença do peptídeo urodilatina;
- Investigar a transcrição dos genes GC-A e GC-C em ratos submetidos ao tratamento crônico de NaCl.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Ratos Wistar adultos, machos, pesando entre 250 e 300g, pertencentes ao biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o início do tratamento, os animais (n=6) foram previamente pesados e colocados por grupo em gaiolas metabólicas. Após um período de 24 horas de adaptação às novas condições, os ratos foram novamente pesados e iniciou-se o tratamento com sal (NaCl) na água de beber nas concentração de 2% de NaCl. A água era fornecida em bebedouros de plásticos com o volume que variava de 150 a 200mL/dia/gaiola. A quantidade de ração oferecida era pesada diariamente e variava de 50 a 200g/dia/gaiola (Jorge, 2009).

A avaliação dos mecanismos renais foi realizada através do sistema de perfusão de rim isolado de rato, onde os animais após 10 dias em gaiolas metabólicas foram submetidos a uma cirurgia para a retirada do rim. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma:

Grupo Controle: Ratos (n=6) mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas com ingestão de água destilada.

Grupo Tratado: Ratos (n=6) mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas com ingestão de solução de 2% de NaCl.

Grupo Urodilatina Controle: Ratos (n=6) mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas com ingestão de água destilada, submetidos a perfusão renal com urodilatina (UD) na concentração de 0,1 µg/mL.

Grupo Urodilatina Tratado: Ratos (n=6) mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas com ingestão de solução de 2% de NaCl, submetidos a perfusão renal com urodilatina (UD) na concentração de 0,1 µg/mL.

Grupo Uroguanilina Tratado: Ratos (n=6) mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas com ingestão de solução de 2% de NaCl, submetidos a perfusão renal com 0,1 mg de uroguanilina (UGN).

4.3 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

4.3.1 O Sistema de Perfusão

A perfusão de rim isolado consiste em um método desenvolvido para o estudo da função renal, onde o rim é mantido fora do organismo em condições similares as observados desse órgão no organismo vivo. O nosso sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Figura 06 e 07). Este sistema foi inicialmente baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman e Mack (1974) e Ross (1978), com modificações feitas por Fonteles (1980; 1983), através da adaptação de um pulmão artificial do tipo silástico, baseado no modelo de Hamilton (1974). O sistema de perfusão consiste de dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de 37°C. Neste sistema o perfusato recircula no rim com uma quantidade de 100 mL de solução Krebs-Hanseleit modificada com 6g% de albumina sérica bovina e oxigenação adaptada ao sistema (Monteiro, 1990).

O sistema de perfusão é constituído pelos seguintes equipamentos (Figura 07):

- 1) Condensador: Mantém aquecido o cilindro reto que comporta a solução do experimento;
- 2) Coletor de urina: Frasco que recebe a urina do rim montado no sistema, trocados em intervalos de 10 minutos;
- 3) Seringa coletora de perfusão: Coletor da solução de perfusão no sistema feita em intervalos de 10 minutos;
- 4) Bomba de perfusão (Watson): Bombeia a solução de perfusão no sistema com cinco velocidades;
- 5) Filtro de millipore (5µm): Filtra a solução perfusora;

- 6) Banho Maria: aquece o oxigenador ou o pulmão artificial mantendo a temperatura constante entre 37°C;
- 7) Fluxômetro: Mede o fluxo da solução;
- 8) Manômetro de mercúrio: Mede a pressão do perfusato;
- 9) Catabolhas: Capta as bolhas formadas evitando assim embolia no rim;
- 10) Oxigenador ou pulmão artificial: Promove as trocas gasosas (95% de O₂ e 5% de CO₂)
- 11) Bomba aquecedora com termostato: mantém o perfusato na temperatura de 37°C.

Figura 06 - Foto do sistema de perfusão de rim isolado (LFAVET-UFC)

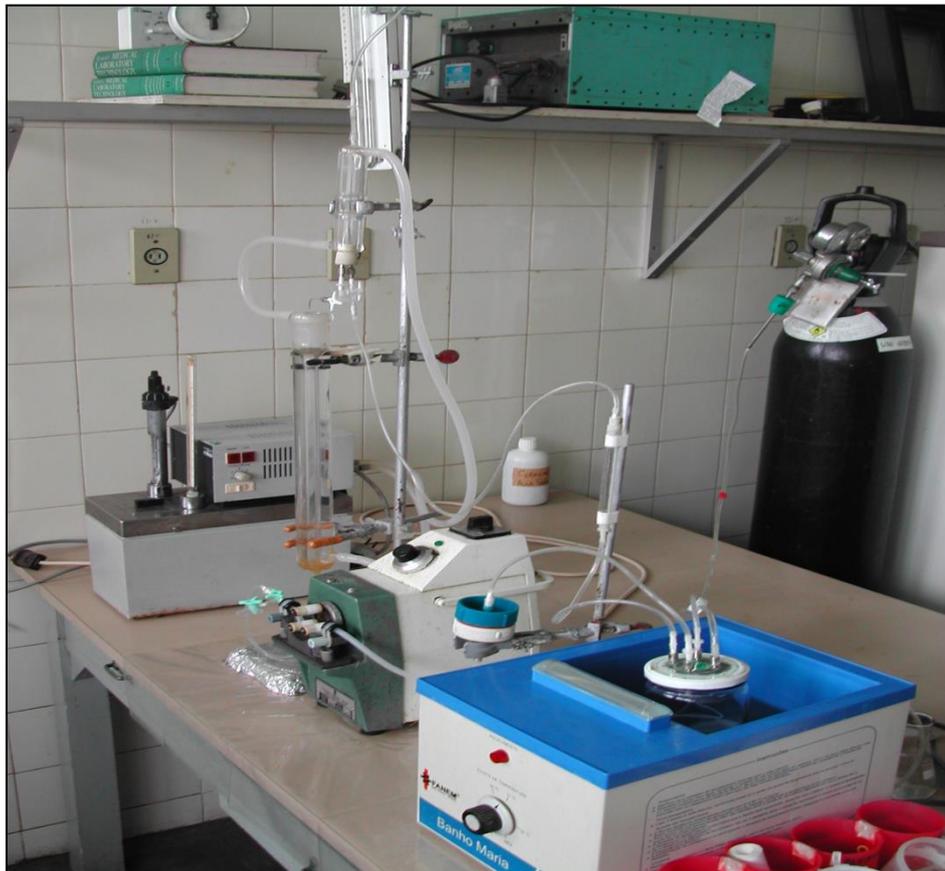
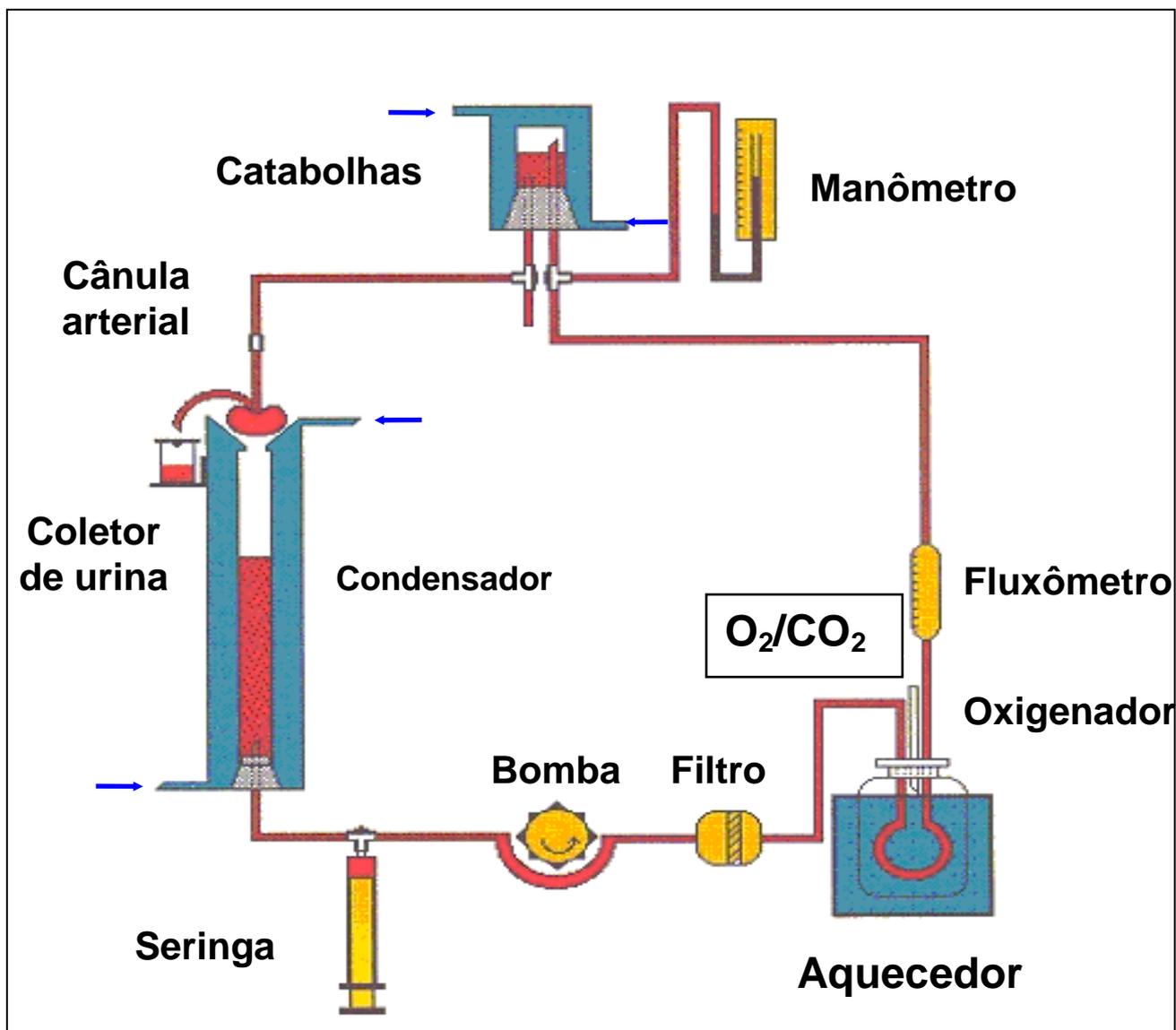


Figura 07 – Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.



4.3.2 Calibração do Sistema

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos. A calibração foi realizada com solução salina a 0,9%, onde foi avaliada em cada unidade da bomba a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário(L/h) e o volume de salina coletado em um minuto em proveta milimetrada (mL/min). A calibração é feita com o objetivo de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula. Para tanto, os resultados da calibração obtidos serão compilados em curvas, onde se representa a velocidade da bomba nos eixos das abscissas (X) contra a pressão de perfusão, o valor obtido no fluxômetro e volume de salina coletado (fluxo) no eixo das ordenadas (Y) (Figura 08; 09 e 10).

Figura 08 – Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).

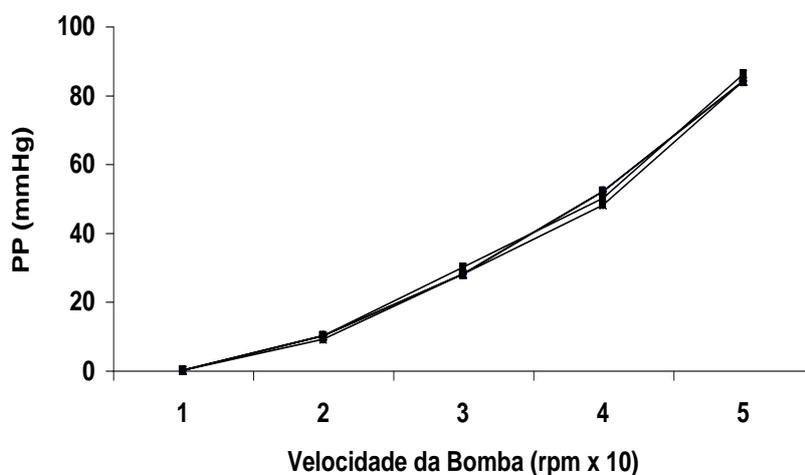


Figura 09 – Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).

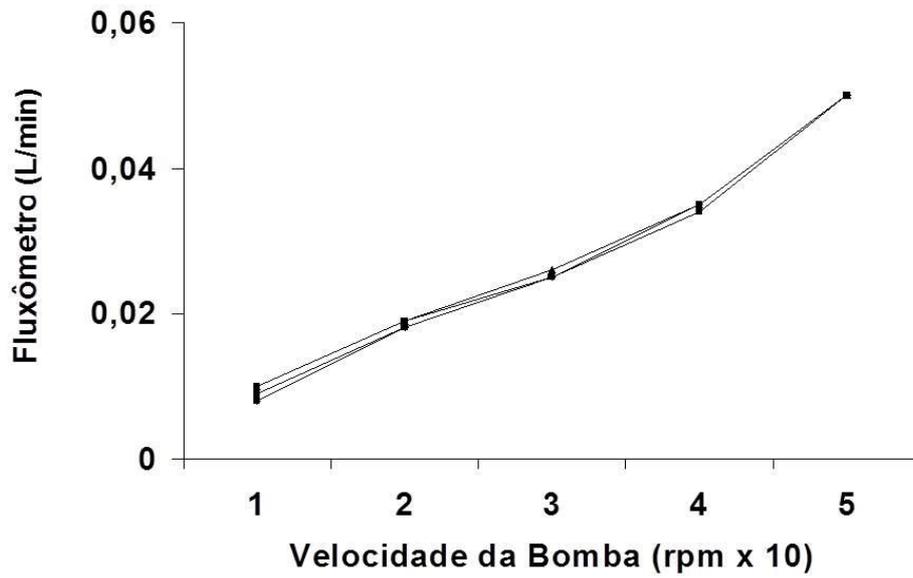
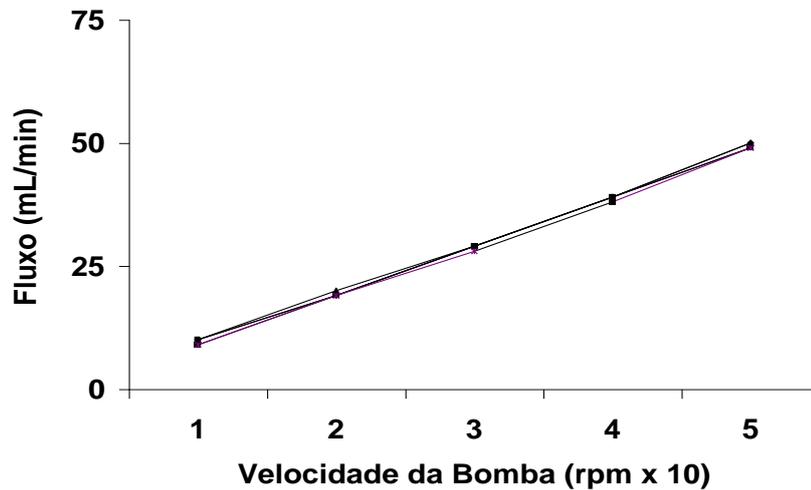


Figura 10 – Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n=6).



4.3.3 Solução Perfusora

A solução empregada nesse sistema é a de Krebs-Henseleit modificada, associada à albumina bovina fração V, 6g% (Monteiro, 1990; Lima *et al.*, 1992), Inicialmente foi preparada uma solução de Krebs-Henseleit concentrada a 20%, contendo 138g de NaCl, 7g de KCl, 3,2g de NaH₂PO₄.H₂O, 5,8g de MgSO₄. 7 H₂O e 10g de Uréia. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100mL desta solução foi separada e acrescida de 4,2 g de NaHCO₃, 0,74g de CaCl₂ . 2 H₂O, 2,0g de glicose e 0,05g penicilina G potássica cristalina. Em seguida, o volume foi completado para 2L com água bidestilada. Foram retirados 300 mL desta solução, aos qual se adicionou albumina bovina (6g%). Em seguida, a solução foi dializada, com auxílio de um homogeneizador. A diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes como piruvatos, citratos e lactatos (Hanson; Ballard, 1968; Cohen; Kook; Little,1977; Ross, 1978).

A solução de Krebs-Henseleit para a diálise foi trocada com 24 horas. No final, após 48 horas de diálise, a solução perfusora foi acrescida de 0,15g de inulina. O pH da solução perfusora foi ainda ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

4.3.4 Substâncias utilizadas

NaHCO₃ (Synth)

NaH₂PO₄.H₂O (Synth)

NaCl (Synth)

MgSO₄ . 7H₂O (Reagen)

CaCl₂ . 2H₂O (Reagen)

Manitol (Reagen)

Uréia (Reagen)

KCl (Merck)

Glicose (Squibb)

Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)

Heparina (hipolabor)

Inulina (Sigma)

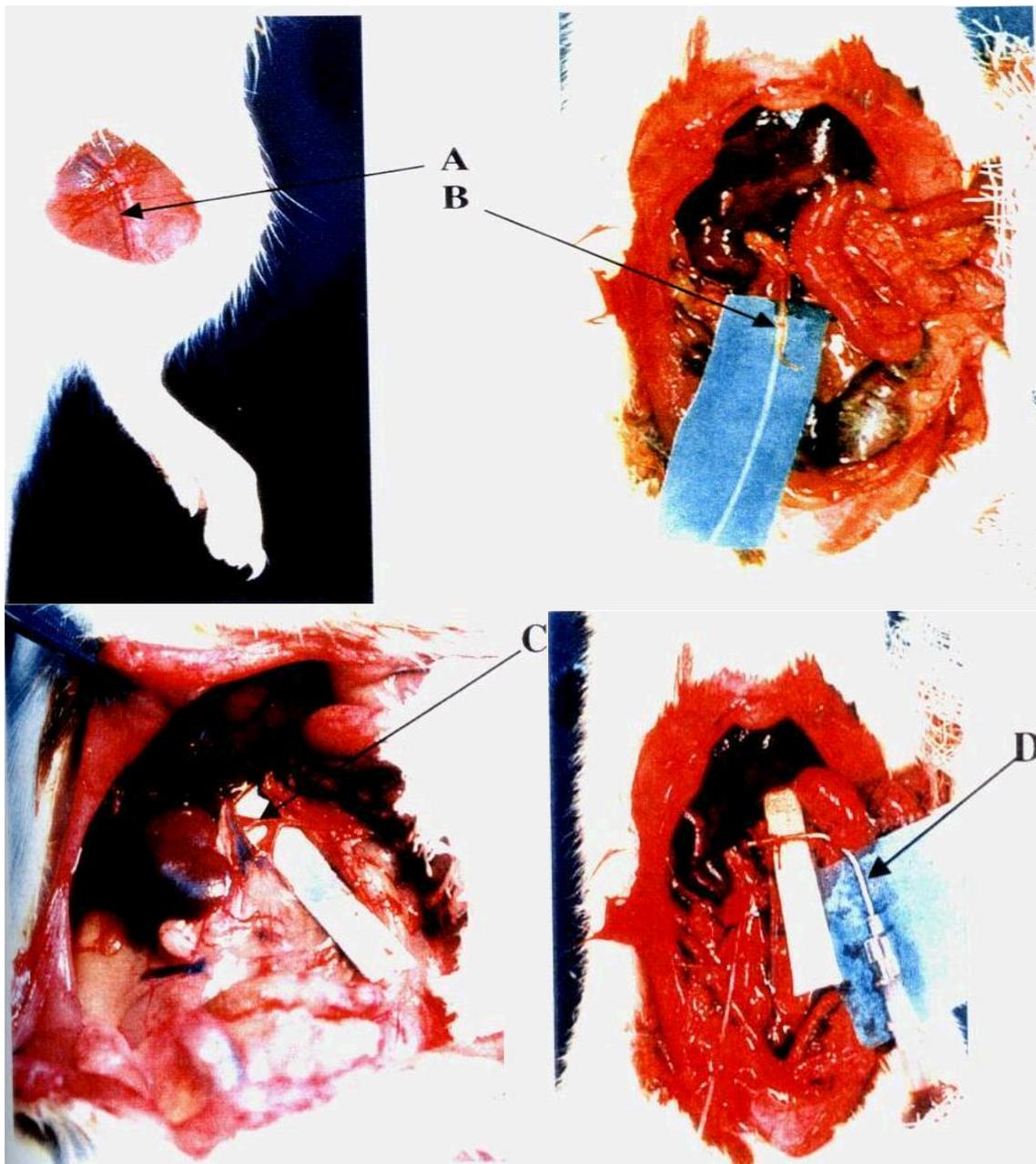
Pentobarbital Sódico (Cristália)

4.3.5 Técnica Cirúrgica

Após 10 dias em gaiolas metabólicas os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico na dose de 50 mg/Kg de peso corporal, por via intraperitoneal (IP). A veia femoral devidamente isolada, onde foi administrado 3,0mL de manitol a 20 %, com intuito de melhorar o acesso cirúrgico ao ureter.

Após assepsia do abdome, foi realizada uma incisão da parede abdominal com base na linha alba e duas incisões perpendiculares à primeira, para facilitar a manipulação. Rebatidas às vísceras para o lado esquerdo para visualização do rim direito e conseqüente limpeza dos tecidos presentes na área. Em seguida, o ureter foi isolado e canulado com tubo de polietileno (PE₅₀). A glândula adrenal direita foi identificada, isolada e seccionada, e a seguir, procedemos a descapsulação do rim. Posteriormente, a artéria renal foi canulada a partir da artéria mesentérica superior, sem a interrupção do fluxo sanguíneo para o rim (Figura 11). Logo a seguir, o órgão foi retirado, limpo e acoplado ao sistema. Esperava-se um período de 20 a 30 minutos para a adaptação renal às novas condições.

Figura 11 - Técnica cirúrgica. A - veia femoral; B - ureter direito canulado; C - artéria mesentérica; D - cânula arterial.



4.3.6 Protocolo experimental

Os rins passavam por um período de adaptação de aproximadamente 20 minutos. Depois de decorrido esse tempo, os experimentos foram iniciados. O tempo total de perfusão do órgão foi de 120 minutos. Durante esse período, foram coletados a cada 5 minutos as medida do fluxômetro e a pressão de perfusão. Em intervalos de 10 minutos, de maneira intercalada, foram coletados a urina e o perfusato. Estes frascos com urina foram pesados e, juntamente com os frascos de perfusato, mantidos em temperatura de -20°C para posteriores dosagens de potássio, sódio, cloro, inulina e medida da osmolaridade. O rim esquerdo foi pesado e, após o fim do experimento, foi realizado o mesmo procedimento com o rim direito perfundido.

4.3.7 Análises bioquímicas

Nas amostras de perfusatos e urinas foram realizados testes bioquímicos. O clearance foi mensurado de acordo com Pitts (1971), e Martinez-Maldonado e Opava-Stitzer (1978). A dosagem de sódio, potássio e cloreto foi realizada pelo aparelho eletrodo íon-seletivo Electrolyte Analyzer (Roche). A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta, como descrito por Walser e colaboradores (1955), e modificada por Fonteles e Leibach (1982). Finalmente foi medida a osmolaridade das amostras com um osmômetro (vapor pressure osmometer - modelo 5520 WESCOR). Todas as análises bioquímicas foram realizadas na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

4.3.8 Cálculos dos parâmetros renais

A seguir estão representadas as fórmulas para determinação de parâmetros funcionais renais (Martinez-Maldonado *et al.*, 1978; Fonteles *et al.*, 1993).

1. PP (mmHg) = Pressão de perfusão. Leitura em manômetro
2. RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistência vascular renal = PP (mmHg) / FPR
3. FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo de perfusão renal (registrado a cada 10 min/ intervalo de tempo x peso do rim x)
4. FU (mL.g⁻¹. min⁻¹) = Fluxo urinário = Peso do volume urinário / Peso do rim esquerdo x 10 (admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água)
5. RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹)= Ritmo de filtração glomerular RFG = DOU in / DOP in x FU sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato
6. %TNa⁺ = Percentual de sódio transportado= TNa ⁺ x 100 / FNa ⁺
7. TNa⁺ = (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Sódio transportado = FNa ⁺ - ENa ⁺
8. FNa⁺ = (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Sódio filtrado = RFG x PNa ⁺ (PNa ⁺ = Concentração de sódio no perfusato)
9. ENa⁺ = (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Sódio excretado= FU x UNa ⁺ (UNa ⁺ = Concentração de sódio na urina)
10. CH₂O - Clearance de água livre (mL.g⁻¹.min⁻¹) = FU - C. osm
11.Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Clearance osmótico = [Uosm / Posm] x FU (onde Uosm = Osmolaridade urinária e Posm = Osmolaridade do perfusato)
12. %TK⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Percentual de potássio transportado = TK ⁺ x 100 / FK
13. TK⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹)= Potássio transportado = TK ⁺ = FK ⁺ x EK ⁺
14. % TCl⁻ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Percentual de cloreto transportado = TCl ⁻ x 100 / F TCl ⁻
15. TCl⁻ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Cloreto transportado = TCl ⁻ = FCl ⁻ x ECl ⁻

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

4.4 Biologia Molecular

4.4.1 Isolamento de RNA

Rins de ratos *Wistar* perfundidos como descrito anteriormente foram submetidos ao isolamento de RNA pelo método descrito para o *Trizol Reagent* (Invitrogen). As amostras foram obtidas do grupo controle (ratos com ingestão de água destilada) e grupos tratados (1% e 2% de NaCl). O método *Trizol Reagent* (Invitrogen) utiliza uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que provê, durante a homogeneização dos tecidos, a lise das membranas celulares com a preservação da integridade do RNA. Após homogeneização dos tecidos renais, adicionamos 0,2 mL de clorofórmio seguido de breve mistura por vórtex de 15 segundos. Em seguida esta mistura foi centrifugada por 15 minutos na temperatura de 2 a 8°C e velocidade de 12.000 x g, promovendo assim a separação da mistura em duas fases, uma orgânica e outra aquosa. A porção aquosa contendo RNA foi transportada a um novo tubo eppendorf de 1,5 mL e a este acrescentamos 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de reagente *Trizol* inicialmente empregado. Após nova centrifugação por 15 minutos na temperatura de 2 a 8°C e velocidade de 12.000 x g, o precipitado de RNA foi lavado com 1mL de etanol a 75% por 3 vezes. A cada lavagem o etanol era retirado e novamente acrescentado seguido de centrifugações na temperatura de 2 a 8°C e velocidade de 7.500 x g por 5 minutos. Após a última lavagem o etanol foi completamente retirado e o RNA devidamente solubilizado em água Mili Q autoclavada.

A quantidade e qualidade do RNA isolado foram analisadas espectrofotometricamente através de leituras da absorbância em 260 nm e da razão das absorbâncias de 260/280nm, respectivamente.

4.4.2 Síntese de cDNA pela reação de Transcriptase Reversa

Uma quantidade de 2 µg de RNA total seguiram para a síntese de cDNA. Foi utilizado o kit *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen). Resumidamente, o RNA das amostras foi misturado a 1 µL de oligo d(T), 2 µL de uma mistura de

DNTP's e água miliQ autoclavada perfazendo um volume final de 12 μ L denominado master mix 1. Essa mistura total foi aquecida a 65°C por 5 minutos. Durante o aquecimento foi preparado um master mix 2 contendo 4 μ L de tampão de síntese de cDNA, 1 μ L de DTT, 1 μ L de *RNAse out*, 1 μ L de água e 1 μ L da enzima ThermoScript. Um volume de 8 μ L deste master mix 2 foi adicionado a cada tubo das amostras de master mix 1 e as duas misturas foram levadas ao termociclador por 1 hora a 55°C e 5 minutos a 85 °C. Finalmente, foi aplicado 1 μ L de inibidor de RNA H a cada amostra e incubado por 20 minutos a 37°C. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20°C até a amplificação do mesmo pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

4.4.3 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real

Para analisarmos a expressão dos genes codificadores dos receptores de guanilato ciclase de membrana A e C renais (GC-A e GC-C) utilizamos o equipamento iQ5 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). Esta tecnologia é baseada na detecção em tempo real da amplificação de uma amostra de DNA ou cDNA pela técnica de PCR. Através dessa tecnologia é possível a quantificação das amostras de DNA na fase exponencial da cinética de amplificação, período no qual a PCR pode ser realmente quantificado. Isto é possível com a utilização da detecção da quantidade de fluorescência de SYBR Green, corante específico que se liga a um produto de dupla fita de DNA. Os iniciadores de DNA (*primers*) aqui utilizados foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro dos receptores investigados (GC-A e GC-C) e para o gene de referência da cadeia 18S do RNA ribossômico (rRNA) obtidas no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Juntamente com os testes das amostras em estudo dos grupos controle (ingestão de água) e grupos tratados (solução de 2% NaCl) foram realizados, para cada um dos genes investigados, uma reação de PCR em Tempo Real para a obtenção da eficiência dos respectivos iniciadores. Nessas reações de PCR em Tempo Real para a detecção da eficiência dos iniciadores, executamos curvas padrões de amplificação com amostra de cDNA proveniente de tecido controle positivo para cada um dos

genes investigados. Por exemplo, para a eficiência do iniciador de GC-A utilizamos cDNA de aorta de ratos. Para o gene de GC-C, no entanto, utilizamos amostra de cDNA sintetizada a partir de intestino de rato. Como nossos tecidos em teste eram amostras renais, a eficiência dos iniciadores para o gene de referência da cadeia 18S do rRNA foi feita com um pool de cDNA de 4 rins controles submetidos à gaiola metabólica. As curvas padrões foram executadas através das diluições do cDNA sintetizado com fator 10 para os genes de GC-A e 18S RNA e com fator de 5 para o gene de GC-C. As eficiências dessas reações são necessárias para a realização das medidas de quantificação relativa através do método matemático descrito por Pfaffl (2001).

Todas as reações de PCR em tempo Real foram realizadas num volume total de 25 μ L contendo 12,5 μ L de iQ Supermix (solução padrão de amplificação contendo tampão salino, uma mistura de deoxinucleotídeos, enzima amplificadora e corante SYBR Green onde todas as concentrações foram otimizadas pelo fabricante), 200 nM dos iniciadores e 1 μ L de cDNA das amostras ou diluições padrões. Amostras negativas foram também testadas onde o cDNA era substituído por água miliQ, para que tivéssemos a certeza da ausência de contaminantes nas reações. As condições da PCR foram empregadas da seguinte forma. Um período de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguidos de 25 ciclos, para as reações de amplificação do gene de referência da cadeia 18S do rRNA, ou 40 ciclos para as reações de amplificação dos genes testes de GC-A e GC-C. Cada ciclo destes continham uma fase de desnaturação a 95°C por 30 segundos, uma fase de anelamento dos iniciadores a 58°C (GC-A), 60°C (18S rRNA) ou 63°C (GC-C) por 30 segundos, e uma fase de extensão da cadeia de DNA a 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos submetemos as amostras a uma extensão final na temperatura de 72°C por 3 minutos. Por fim, as reações foram mantidas na temperatura de 4°C até que fossem retiradas do termociclador.

Com o intuito de analisarmos a especificidade de nossas amplificações, ou seja, saber se os produtos formados eram específicos para o gene testado, executamos a cada reação uma curva de fusão (*Melting Curve*) onde a temperatura da reação era acrescida em 1° a cada 30 segundos, iniciando a partir das temperaturas de anelamento de cada iniciador e terminando a 95°C. Essa curva foi realizada em todas as reações. Os dados obtidos pelo iQ5

Optical System Software (Version 2.0) são baseados no valor do ciclo limiar (C_T – Threshold cycle), ou ciclo de amplificação, onde a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. Quanto maior a expressão do gene testado menor o número de ciclos para que a fluorescência atinja o patamar de 10 x maior que a fluorescência basal.

4.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de seis experimentos em cada grupo. Diferenças entre os grupos foram comparados utilizando teste *t* de Student ou Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni com significância de 5%.

4.6 Comitê de Ética

Os protocolos desenvolvidos no presente trabalho foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará, sob o número 107/07.

5. Resultados

5.1 Função renal com Urodilatina

Os resultados mostram que o tratamento com 2% de NaCl promovem alterações na pressão de perfusão, observando-se uma redução significativa aos 30, 60, 90 e 120 minutos em relação ao controle. Enquanto isso foi observado que o grupo urodilatina apresentou uma redução da pressão de perfusão somente aos 60 minutos em relação ao controle. Porém esse grupo ao ser comparado ao grupo 2% NaCl foi demonstrado uma redução significativa aos 60 minutos, seguido de um aumento aos 90 e 120 minutos. Por fim, quando os rins de animais tratados com 2% de NaCl são perfundidos com urodilatina (2% NaCl + UD), observa-se um aumento significativa da pressão de perfusão aos 30, 60, 90 e 120 minutos quando comparado ao rim que recebeu apenas o tratamento salino (Tabela 01/Figura 12).

A resistência vascular renal (RVR) apresentou uma redução significativa no grupo de 2% de NaCl em relação ao controle, mantendo essa redução ao longo de todo o experimento. Em relação ao grupo perfundido somente com urodilatina (UD) observou-se um mesmo padrão do grupo 2% NaCl, ou seja uma RVR reduzida em todos os tempos em relação ao grupo controle, sendo aos 60 minutos significativa também em relação ao grupo salino. No grupo tratado com sal e perfundido com UD (2% NaCl + UD) observou-se um efeito inverso, ou seja, a RVR mostrou um aumento significativo em relação ao grupo salino ao longo de todo o experimento (Tabela 02/Figura 13).

O fluxo urinário (FU) do grupo tratado com 2% de NaCl não apresentou alteração significativa em relação ao controle. Contudo, observa-se uma redução significativa do FU no grupo urodilatina (UD) em relação ao controle, durante os tempos 30, 60 e 90 minutos. Quanto aos rins tratados com sal e perfundidos com urodilatina (2% NaCl + UD), foi relatado uma redução significativa do FU em todos os tempos quando comparado ao grupo controle e redução aos 30, 60 e 90 minutos do experimento em relação ao grupo tratado com sal (2% NaCl) (Tabela 03/Figura 14).

Os resultados do ritmo de filtração glomerular (RFG) não apresentou qualquer alteração significativa entre os grupos (Tabela 04/Figura 15).

O percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) foi alterado aos 30, 60, 90 e 120 minutos de perfusão no tratamento salino (2% NaCl), sofrendo uma redução significativa em relação ao controle. Observou-se que o %TNa⁺ no grupo perfundido somente com UD apresentou uma redução significativa aos 60, 90 e 120 minutos em relação ao grupo controle. Enquanto que, o grupo tratado com sal e perfundido com urodilatina (2% NaCl + UD) apresentou um aumento significativo no %TNa⁺ aos 90 minutos em relação ao controle e um aumento também aos 90 e 120 minutos em relação ao grupo salino (2% NaCl) (Tabela 05/Figura 16).

O percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) apresentou alterações somente para o grupo perfundido com urodilatina (UD). Foi observado um aumento significativo aos 30 minutos em relação ao grupo controle. Enquanto que ao comparar-se ao grupo salino (2% NaCl) esse aumento foi encontrado aos 30 e 60 minutos (Tabela 06/Figura 17).

A avaliação do percentual de transporte de cloreto (%TCl⁻) para o grupo 2% NaCl mostrou uma redução significativa aos 30, 60, 90 e 120 minutos de perfusão em relação ao grupo controle. No grupo perfundido somente com UD, o %TCl⁻ foi significativamente reduzido aos 60, 90 e 120 minutos em relação ao controle. Observou-se que o grupo tratado com sal e perfundido com UD (2% NaCl + UD) não apresenta alteração em relação ao controle, porém ao ser feita a comparação relacionada ao grupo tratado com 2% de NaCl, observou-se um aumento aos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 07/Figura 18).

Além do transporte tubular total foi também avaliado o transporte nos principais segmentos do néfron. O percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) foi reduzido no grupo tratado com sal (2% NaCl) aos 60, 90 e 120 minutos em relação ao controle. Contudo, o grupo perfundido somente com UD e o grupo tratado com sal e perfundido com UD (2% NaCl + UD) apresentaram o mesmo padrão de mudança em relação ao grupo salino (2% NaCl), ou seja aumentaram significativamente o %pTNa⁺ aos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 08/Figura 19).

O percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) foi alterado principalmente no grupo perfundido somente com urodilatina. Observou-se um aumento no %pTK⁺ no grupo UD em relação ao controle aos 30, 60 e 90 minutos. O grupo UD também demonstrou significância ao

aumentar %pTK⁺ aos 60 minutos em relação grupo 2% NaCl. Foi apresentado também um discreto aumento no %pTK⁺ no grupo 2% NaCl com urodilatina em relação ao controle aos 90 minutos (Tabela 09/Figura 20).

Em relação ao percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻) foi encontrado um redução significativa no grupo salino (2% NaC) em relação ao grupo controle aos 60, 90 e 120 minutos. O grupo UD e o grupo 2% NaCl com UD apresentaram o mesmo padrão de alteração, ou seja, um aumento significativo no %pTCl⁻ em relação ao grupo salino (2% NaCl) aos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 10/Figura 21).

O transporte de sódio, potássio e cloreto também foram avaliados ao nível de segmento distal do néfron. O percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa⁺) foi significativamente aumentado no grupo salino (2% NaCl) em relação ao controle aos 60 e 90 minutos. Observou-se também que o grupo perfundido com urodilatina (UD) apresentou um aumento significativo em relação ao controle aos 90 e 120 minutos. Contudo, o grupo submetido ao tratamento salino e perfundido com salina (2% NaCl + UD) apresentou um aumento significativo em relação ao controle ao longo de todo o experimento (Tabela 11/Figura 22).

O percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK⁺) foi alterado somente no grupo tratado com sal e perfundido com urodilatina (2% NaC + UD). Foi apresentado um aumento no %dTK⁺ em relação ao controle aos 30, 60, 90 e 120 minutos (Tabela 12/Figura 23).

Em relação ao percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCl⁻) foi demonstrado um aumento no grupo 2% NaCl em relação ao controle aos 60 e 90 minutos. Em relação ao grupo urodilatina (UD), observou-se um aumento significativo no %dTCl⁻ em relação ao controle somente aos 120 minutos. Contudo, o grupo tratado com sal e perfundido com urodilatina (2% NaCl + UD) apresentou um aumento significativo no %dTCl⁻ em relação ao controle aos 30, 60, 90 e 120 minutos (Tabela 13/Figura 24).

O *clearance osmolar* (Cosm) também apresentou alterações significativas. Observou-se que nos animais tratados com 2% de NaCl, o Cosm foi significativamente reduzido aos 90 e 120 minutos em relação ao grupo controle. O grupo UD e o grupo tratado com sal e perfundido com UD (2% NaCl + UD) apresentaram o mesmo padrão de mudança, ou seja, um redução

significativa tanto em relação ao controle quanto ao tratado com 2% de NaCl aos 30, 60, 90 e 120 minutos (Tabela 14/Figura 25).

Tabela 01 – Pressão de Perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

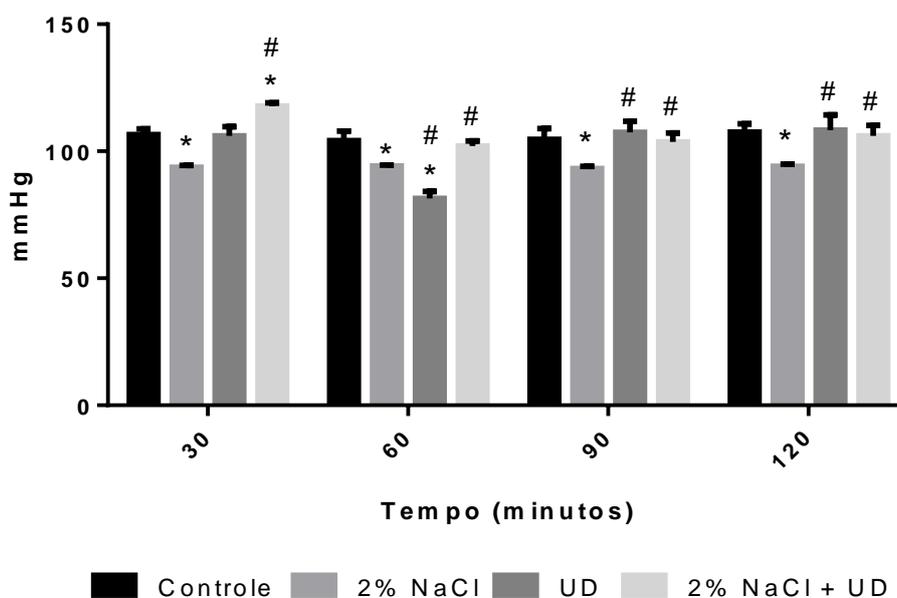
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	106,6 ± 2,22	104,2 ± 3,72	104,7 ± 4,23	107,6 ± 3,15
2% NaCl	93,7 ± 0,80*	94,1 ± 0,40*	93,2 ± 0,85*	94,0 ± 0,98*
UD	106,0 ± 3,68	81,5 ± 2,67*#	107,4 ± 4,42#	108,3 ± 6,1#
2% NaCl + UD	117,8 ± 1,26*#	102,0 ± 2,05#	103,7 ± 3,43#	106,0 ± 4,14#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 12 – Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 02 – Resistência Vascular Renal (RVR) em $\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

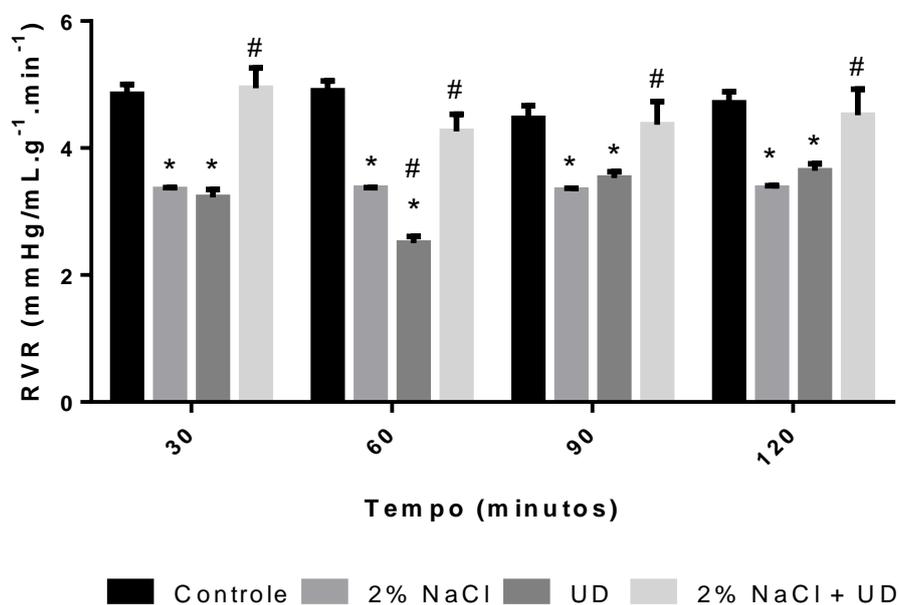
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	4,85 ± 0,15	4,90 ± 0,15	4,47 ± 0,20	4,71 ± 0,18
2% NaCl	3,35 ± 0,03*	3,37 ± 0,01*	3,34 ± 0,03*	3,37 ± 0,04*
UD	3,22 ± 0,13*	2,50 ± 0,11*#	3,53 ± 0,10*	3,64 ± 0,11*
2% NaCl + UD	4,94 ± 0,32#	4,26 ± 0,27#	4,37 ± 0,36#	4,52 ± 0,41#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 13 - Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 03 – Fluxo Urinário (FU) em em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

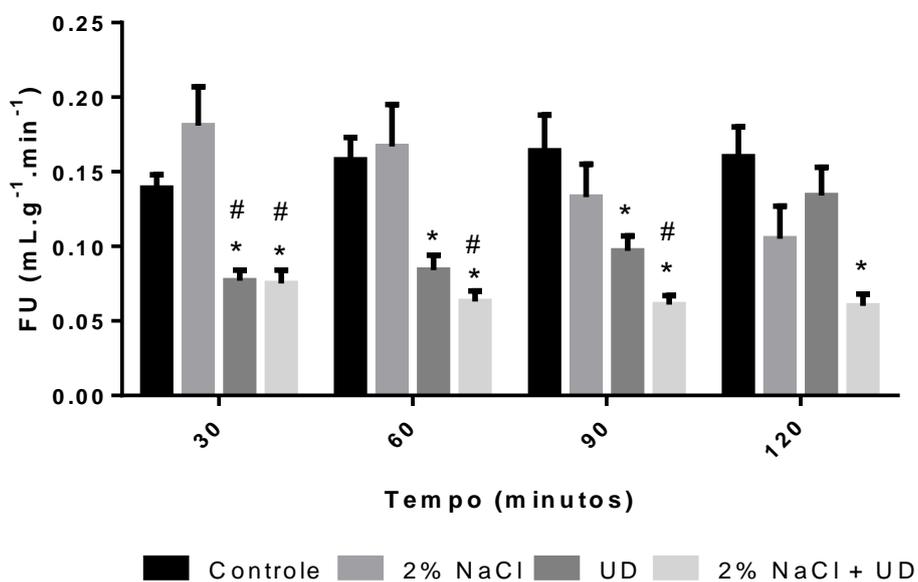
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02
2% NaCl	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,02
UD	0,08 ± 0,01 ^{*#}	0,08 ± 0,01 [*]	0,10 ± 0,01 [*]	0,13 ± 0,02
2% NaCl + UD	0,08 ± 0,01 ^{*#}	0,06 ± 0,01 ^{*#}	0,06 ± 0,01 ^{*#}	0,06 ± 0,01 [*]

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 14 - Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 04 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

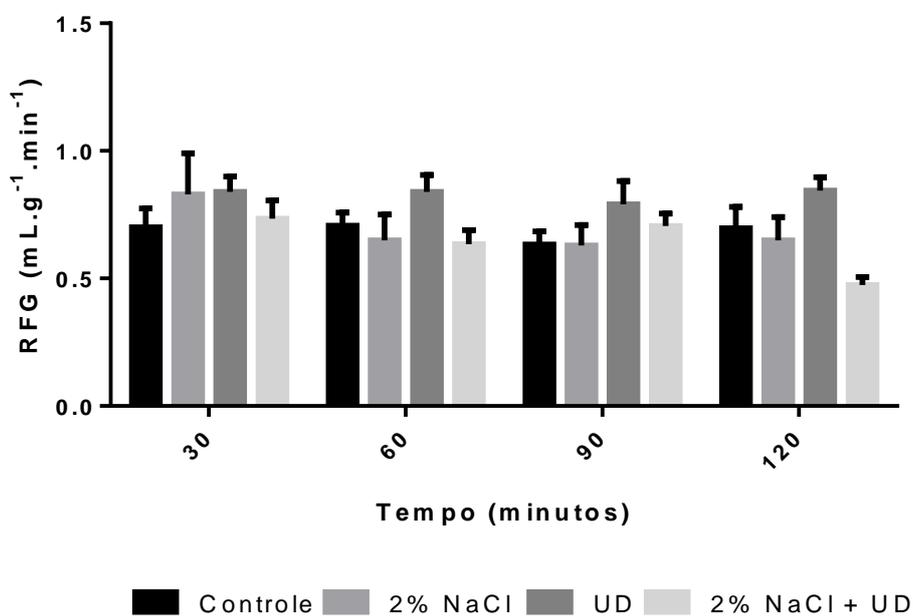
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	0,70 ± 0,07	0,71 ± 0,05	0,63 ± 0,05	0,70 ± 0,08
2% NaCl	0,83 ± 0,16	0,65 ± 0,10	0,63 ± 0,08	0,65 ± 0,09
UD	0,84 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,79 ± 0,09	0,84 ± 0,05
2% NaCl + UD	0,73 ± 0,07	0,63 ± 0,06	0,71 ± 0,05	0,47 ± 0,03

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 15 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 05 - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

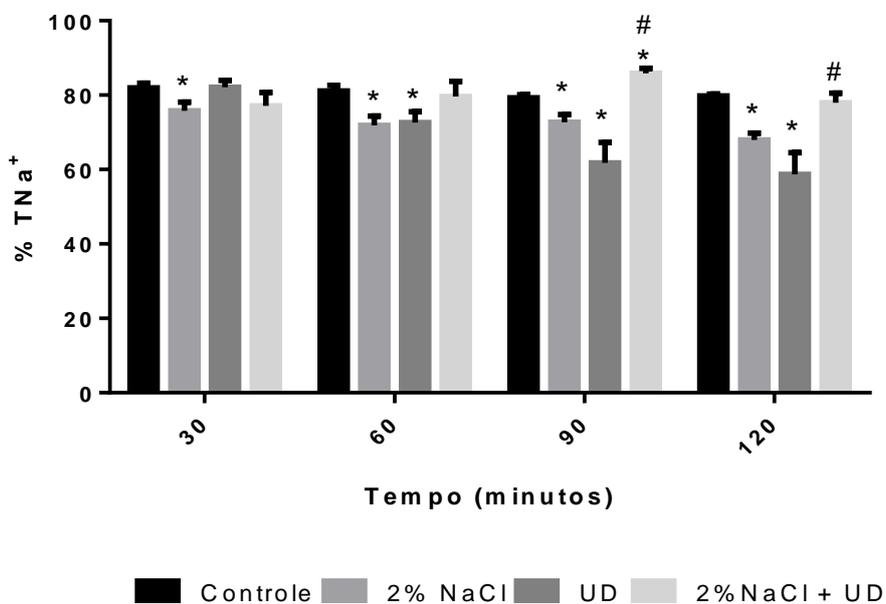
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	81,9 ± 1,2	81,1 ± 1,5	79,3 ± 0,9	79,8 ± 0,6
2% NaCl	75,8 ± 2,3*	71,9 ± 2,5*	72,7 ± 2,0*	67,9 ± 1,8*
UD	82,1 ± 1,9	72,6 ± 2,9*	61,8 ± 5,6*	58,7 ± 5,9*
2% NaCl + UD	77,1 ± 3,6	79,7 ± 4,0	85,9 ± 1,3*#	77,9 ± 2,6#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 16 - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 06 - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

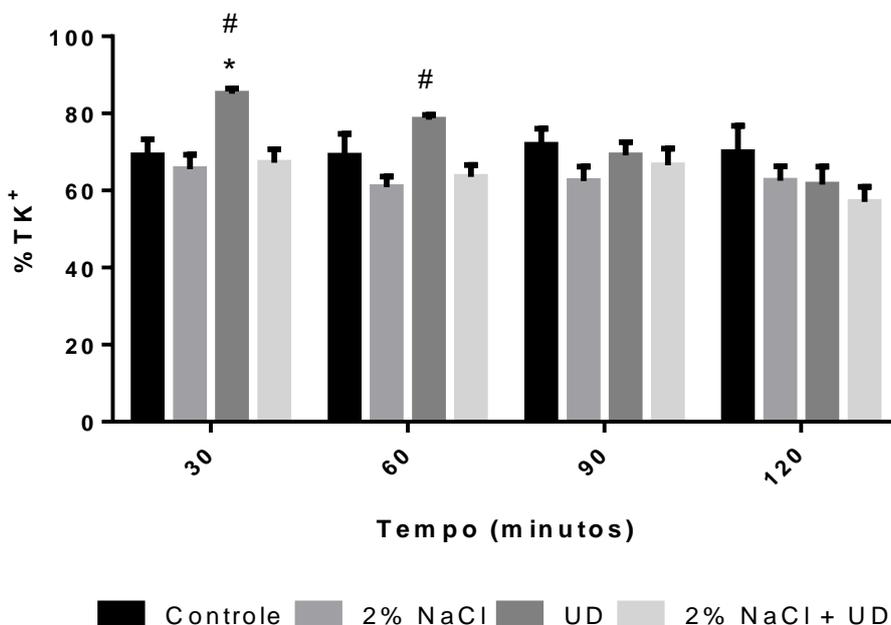
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	69,1 ± 4,1	69,0 ± 5,7	71,8 ± 4,2	69,9 ± 6,9
2% NaCl	65,5 ± 3,8	60,8 ± 2,8	62,5 ± 3,7	62,6 ± 3,7
UD	85,1 ± 1,3 ^{*#}	78,3 ± 1,3 [#]	69,2 ± 3,4	61,6 ± 4,6
2% NaCl + UD	67,2 ± 3,5	63,5 ± 3,1	66,6 ± 4,4	57,0 ± 3,9

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 17 - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 07 - Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

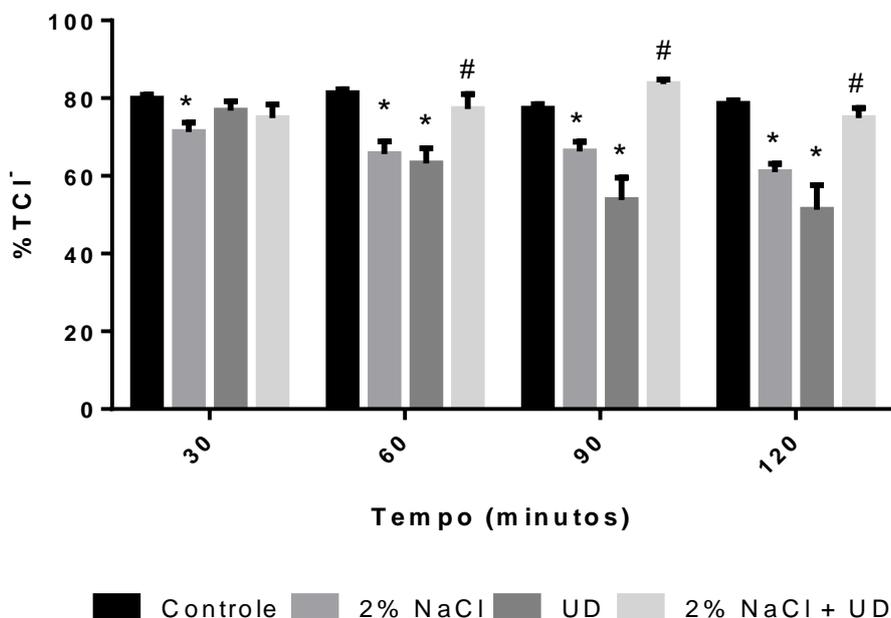
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	79,9 ± 1,0	81,2 ± 1,1	77,3 ± 1,1	78,5 ± 0,9
2% NaCl	71,2 ± 2,5*	65,7 ± 3,2*	66,2 ± 2,6*	60,9 ± 2,2*
UD	76,8 ± 2,4	63,2 ± 3,9*	53,8 ± 5,8*	51,3 ± 6,3*
2% NaCl + UD	78,8 ± 3,5	77,2 ± 3,9 [#]	83,6 ± 1,1 [#]	74,9 ± 2,6 [#]

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 18 - Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 08 – Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

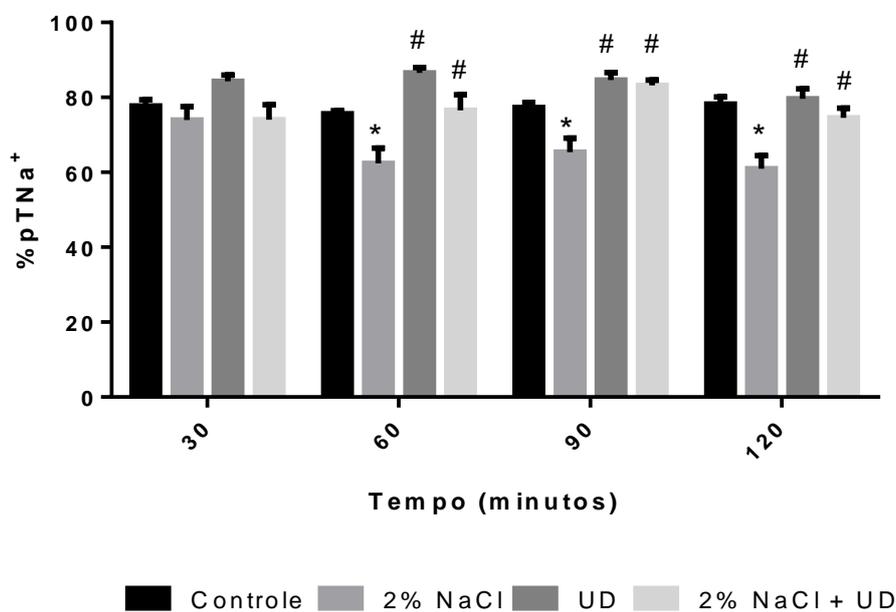
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	77,7 ± 1,7	75,6 ± 0,9	77,3 ± 1,3	78,2 ± 1,9
2% NaCl	73,9 ± 3,6	62,4 ± 4,1 [*]	65,4 ± 3,7 [*]	60,9 ± 3,5 [*]
UD	84,3 ± 1,7	86,5 ± 1,42 [#]	84,6 ± 2,0 [#]	79,6 ± 2,6 [#]
2% NaCl + UD	74,0 ± 4,0	76,6 ± 4,2 [#]	83,2 ± 1,5 [#]	74,6 ± 2,6 [#]

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 19 – Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 09 – Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

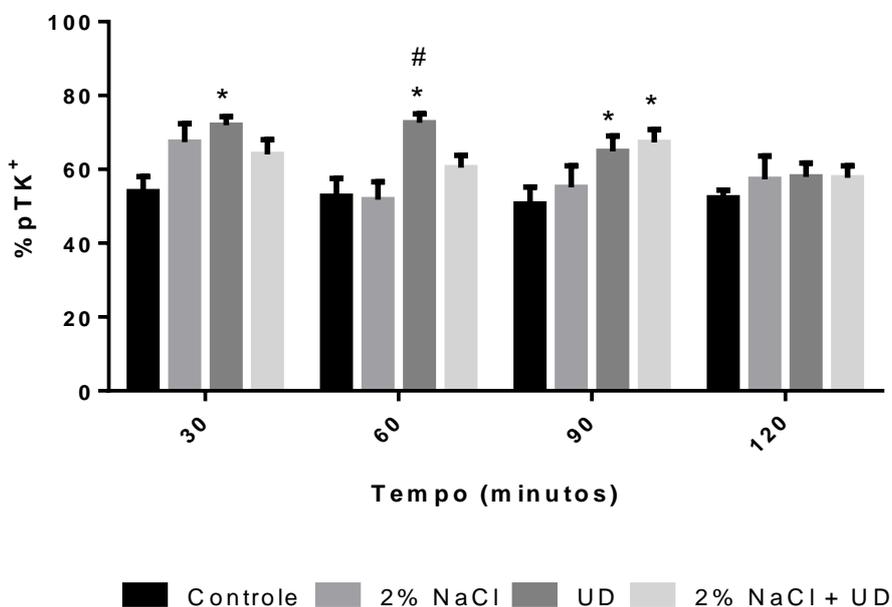
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	53,9 ± 4,1	52,7 ± 4,9	50,7 ± 4,6	52,3 ± 2,1
2% NaCl	67,4 ± 5,0	51,8 ± 4,9	55,1 ± 5,9	57,3 ± 6,4
UD	71,9 ± 2,4*	72,6 ± 2,5*#	64,9 ± 4,2*	57,9 ± 3,8
2% NaCl + UD	64,1 ± 3,9	60,5 ± 3,4	67,3 ± 3,5*	57,7 ± 3,2

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 20 – Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 10 – Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

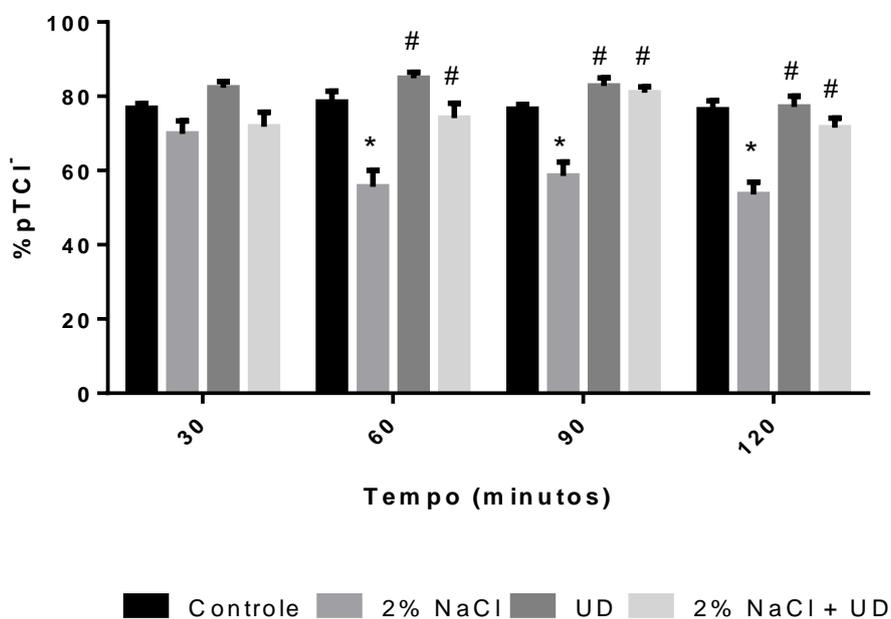
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	76,8 ± 1,2	78,5 ± 2,9	76,6 ± 1,2	76,4 ± 2,5
2% NaCl	69,8 ± 3,5	55,6 ± 4,4 [*]	58,5 ± 3,8 [*]	53,5 ± 3,3 [*]
UD	82,3 ± 1,7	84,9 ± 1,5 [#]	82,8 ± 2,1 [#]	77,2 ± 2,9 [#]
2% NaCl + UD	71,8 ± 3,9	74,1 ± 3,9 [#]	80,9 ± 1,6 [#]	71,5 ± 2,6 [#]

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 21 – Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 11 – Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

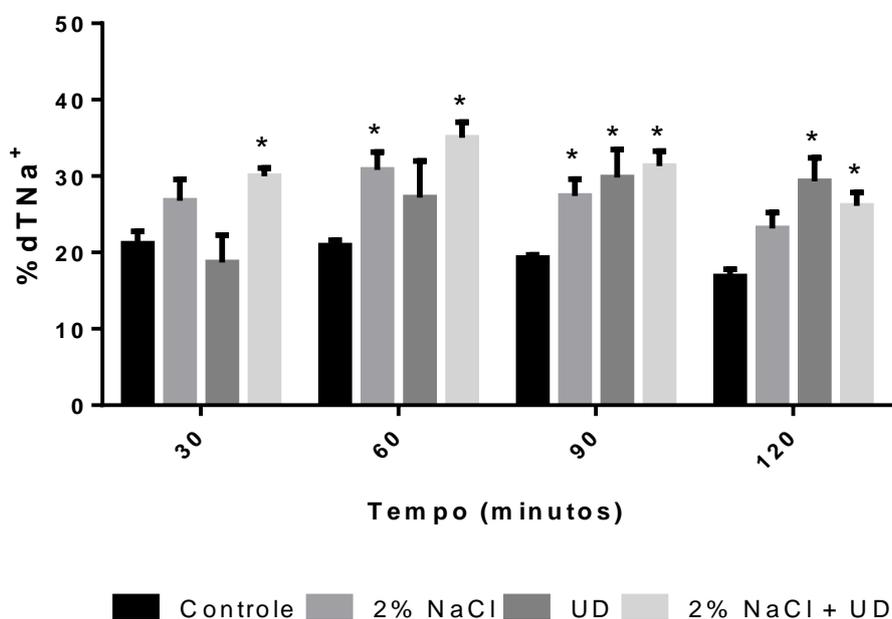
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	21,1 ± 1,7	20,9 ± 0,7	19,2 ± 0,4	16,9 ± 1,0
2% NaCl	26,8 ± 2,8	30,8 ± 2,3*	27,4 ± 2,1*	23,2 ± 2,1
UD	18,7 ± 3,6	27,2 ± 4,8	29,8 ± 3,6*	29,3 ± 3,1*
2% NaCl + UD	26,9 ± 1,1*	35,0 ± 2,1*	31,3 ± 1,9*	26,1 ± 1,8*

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 22 – Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 12 – Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

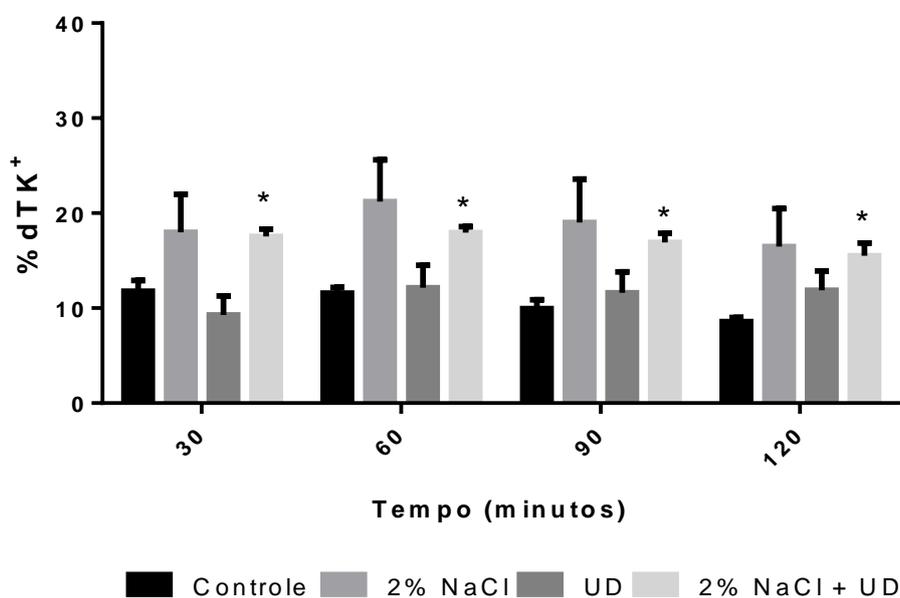
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	11,8 ± 1,2	11,6 ± 0,6	9,9 ± 0,9	8,6 ± 0,4
2% NaCl	17,9 ± 3,9	21,2 ± 4,4	19,0 ± 4,5	16,5 ± 4,0
UD	9,3 ± 1,9	12,5 ± 2,4	11,6 ± 2,1	11,9 ± 2,0
2% NaCl + UD	17,5 ± 0,8*	17,9 ± 0,6*	16,9 ± 0,9*	15,5 ± 1,3*

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 23 – Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 13 – Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCI⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

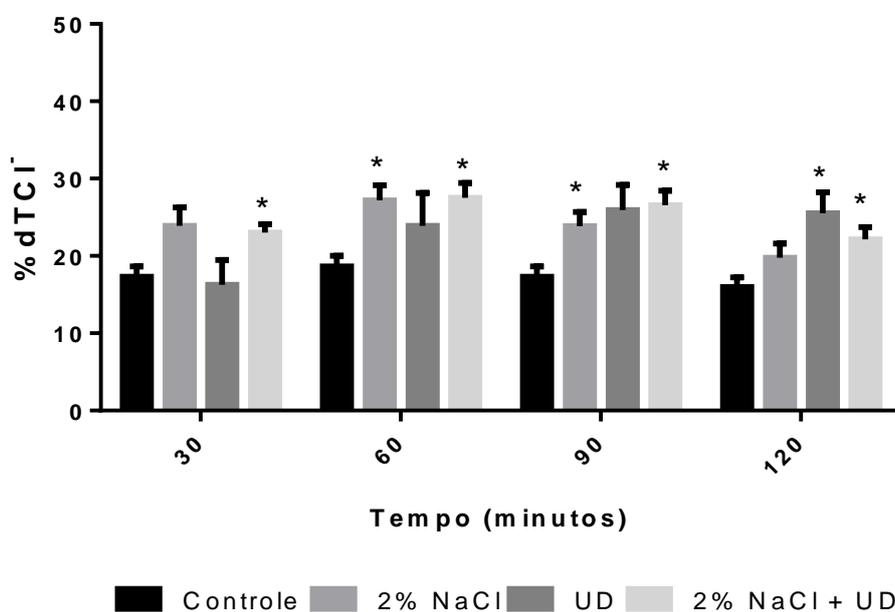
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	17,3 ± 1,3	18,6 ± 1,4	17,3 ± 1,3	15,9 ± 1,3
2% NaCl	23,9 ± 2,4	27,2 ± 1,9*	23,8 ± 1,8*	19,8 ± 1,9
UD	16,3 ± 3,2	23,9 ± 4,3	25,9 ± 3,3	25,6 ± 2,7*
2% NaCl + UD	23,0 ± 1,1*	27,5 ± 1,9*	26,6 ± 1,9*	22,2 ± 1,6*

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 24 – Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCI⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 14 - Clearance osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).

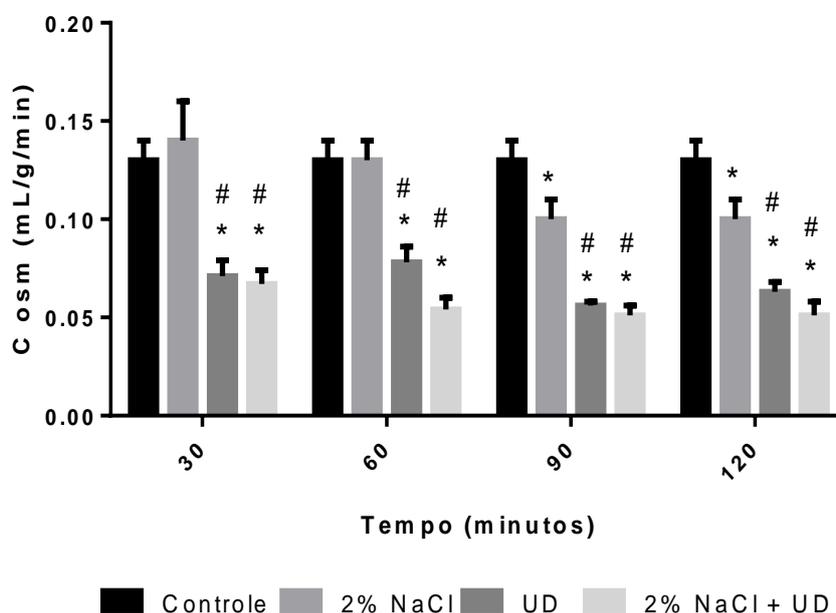
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
2% NaCl	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01*	0,10 ± 0,01*
UD	0,07 ± 0,01*#	0,08 ± 0,01*#	0,06 ± 0,01*#	0,06 ± 0,01*#
2% NaCl + UD	0,07 ± 0,01*#	0,05 ± 0,01*#	0,05 ± 0,01*#	0,05 ± 0,01*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 25 - Clearance osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6), Urodilatina (n=6) e 2%NaCl com Urodilatina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

5.2 Função renal com Uroguanilina

Os animais foram submetidos ao tratamento com 2% NaCl por 10 dias com posterior retirada do rim para o procedimento experimental, seus rins foram perfundidos com 0,1 mg de uroguanilina acrescentada aos 30 minutos conforme o protocolo experimental descrito anteriormente. Os resultados demonstram a participação da uroguanilina em diversas alterações renais.

A análise da pressão de perfusão demonstrou que o tratamento com sal e a posterior perfusão com uroguanilina (2% NaCl + UGN) apresentou um discreto aumento significativo em relação ao controle somente aos 120 minutos. Contudo, em relação ao grupo salino (2% NaCl) o aumento da pressão de perfusão se mostrou presente aos 30, 60, 90 e 120 minutos (Tabela 12/Figura 26).

A resistência vascular renal (RVR) apresentou um aumento significativo do grupo 2% NaCl com uroguanilina em relação ao grupo salino (2% NaCl) em todos os tempos do experimento. Contudo, não foi demonstrada qualquer alteração do grupo da UGN em relação ao controle (Tabela 13/Figura 27).

Os resultados do fluxo urinário (FU) demonstraram poucas alterações na presença da UGN. Observou-se um aumento significativo no FU para o grupo tratado com sal perfundido com UGN (2% NaCl + UGN) em relação ao grupo 2% NaCl somente aos 120 minutos (Tabela 14/Figura 28).

Enquanto isso, o ritmo de filtração glomerular (RFG) foi alterado no grupo 2% NaCl com uroguanilina. Foi observado um aumento significativo do RFG na presença da UGN tanto em relação ao grupo controle, quanto ao grupo salino (2% NaCl) aos 90 e 120 minutos de experimentação (Tabela 15/Figura 29).

Em relação ao transporte de eletrólitos, foi demonstrado diversas alterações da UGN após o tratamento salino (2% NaCl). Primeiramente foi evidenciado uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) no grupo salino com UGN em relação ao controle aos 30, 60, 90 e 120 minutos. Essa redução do %TNa⁺ também foi encontrada em relação ao grupo 2% NaCl nos tempos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 16/Figura 30). Contudo, nenhuma alteração significativa foi demonstrada para percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺), conforme pode ser visualizado na

Tabela 17 e Figura 31. O percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) seguiu o mesmo padrão do %TNa⁺, ou seja, apresentou uma redução significativa no grupo da UGN em relação ao controle aos 30, 60, 90 e 120 minutos; sendo essa redução em relação ao grupo 2% NaCl significativa somente aos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 18/Figura 32).

Assim como na urodilatina, também foram analisados para a uroguanilina o transporte no diversos segmentos do néfron. Os resultados do percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) demonstram uma redução significativa da UGN tanto em relação ao controle, quanto ao 2% de NaCl aos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 19/Figura 33). O percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) apresentou uma discreta redução no grupo da UGN em relação somente aos 120 minutos (Tabela 20/Figura 34). Por fim, percebemos que o percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCl⁻) foi reduzido no grupo da UGN em relação ao controle aos 60, 90 e 120 minutos, sendo essa redução também significativa em comparação ao grupo 2% NaCl nos tempos 90 e 120 minutos (Tabela 21/Figura 35).

O percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa⁺) foi aumentado no grupo salino com UGN (2% NaCl + UGN) em comparação ao controle aos 60, 90 e 120 minutos; porém em relação ao grupo 2% NaCl esse aumento foi significativo somente aos 90 e 120 minutos (Tabela 22/Figura 36). As alterações no percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK⁺), onde foram encontradas um aumento no %dTK⁺ para o grupo da 2% NaCl com UGN em relação ao controle aos 60, 90 e 120 minutos (Tabela 23/Figura 37). Finalmente, observou-se que o percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCl⁻) foi aumentado no grupo salino com UGN em comparação ao controle aos 60, 90 e 120 minutos, sendo o aumento significativo também em relação ao grupo 2% NaCl aos 90 e 120 minutos (Tabela 24/Figura 38).

O *clearance osmolar* (Cosm) também apresentou alterações significativas. Os resultados demonstram que o grupo submetidos ao tratamento salino e posterior perfusão com UGN (2% NaCl + UGN) apresentaram um aumento significativo em relação ao controle aos 90 e 120 minutos. Contudo, quando comparado ao grupo salino (2% NaCl), observou-se que a UGN aumentou o Cosm somente aos 120 minutos (Tabela 25/Figura 39).

Tabela 15 – Pressão de Perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

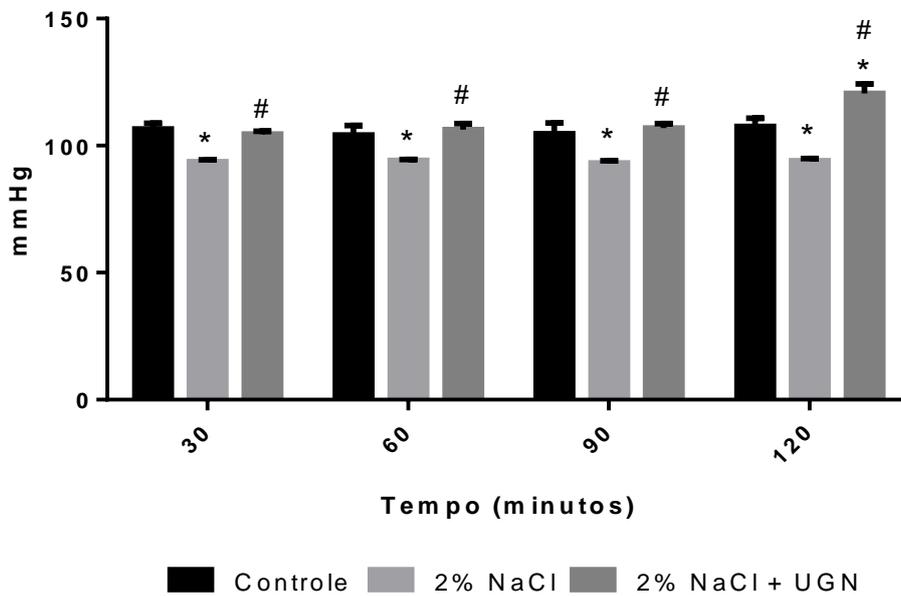
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	106,6 ± 2,22	104,2 ± 3,72	104,7 ± 4,23	107,6 ± 3,15
2% NaCl	93,7 ± 0,80*	94,1 ± 0,40*	93,2 ± 0,85*	94,0 ± 0,98*
2% NaCl + UGN	104,5 ± 1,23#	106,3 ± 2,39#	106,9 ± 1,73#	120,6 ± 3,71*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 26 – Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 16 – Resistência Vascular Renal (RVR) em mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

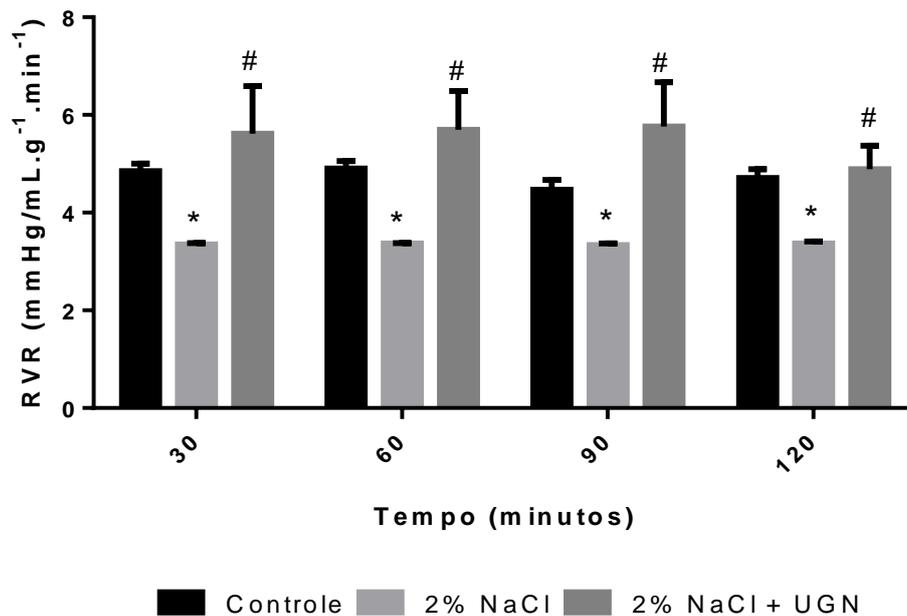
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	4,85 ± 0,15	4,90 ± 0,15	4,47 ± 0,20	4,71 ± 0,18
2% NaCl	3,35 ± 0,03*	3,37 ± 0,01*	3,34 ± 0,03*	3,37 ± 0,04*
2% NaCl + UGN	5,62 ± 0,97#	5,70 ± 0,79#	5,76 ± 0,91#	4,89 ± 0,48#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 27 – Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 17 – Fluxo Urinário (FU) em em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

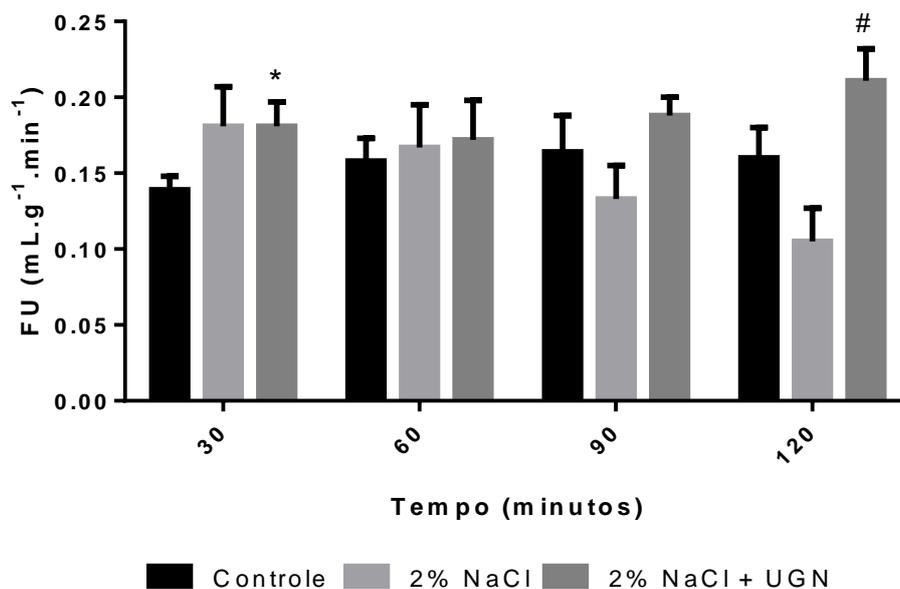
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02
2% NaCl	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,02
2% NaCl + UGN	0,18 ± 0,02*	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,02 [#]

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 28 – Fluxo Urinário (FU) em em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 18 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

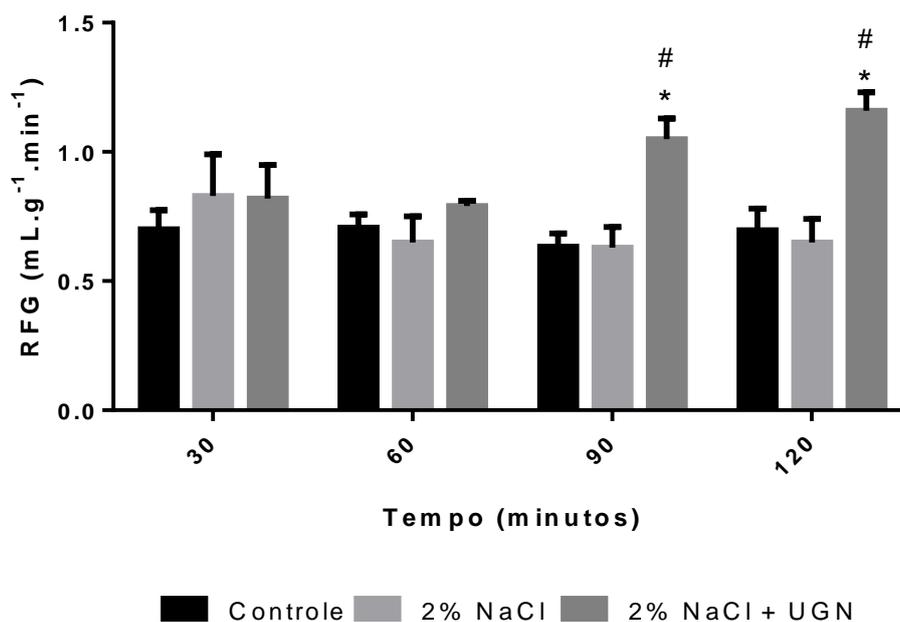
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	0,70 ± 0,07	0,71 ± 0,05	0,63 ± 0,05	0,70 ± 0,08
2% NaCl	0,83 ± 0,16	0,65 ± 0,10	0,63 ± 0,08	0,65 ± 0,09
2% NaCl + UGN	0,82 ± 0,13	0,79 ± 0,02	1,05 ± 0,08 ^{*#}	1,16 ± 0,07 ^{*#}

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 29 - Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 19 - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

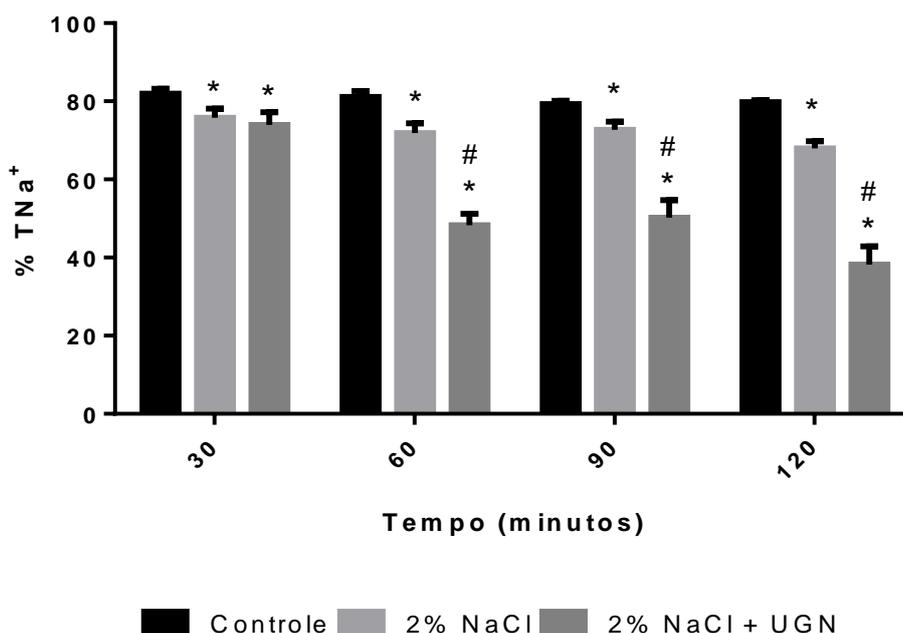
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	81,9 ± 1,2	81,1 ± 1,5	79,3 ± 0,9	79,8 ± 0,6
2% NaCl	75,8 ± 2,3*	71,9 ± 2,5*	72,7 ± 2,0*	67,9 ± 1,8*
2% NaCl + UGN	73,9 ± 3,2*	48,3 ± 2,9*#	50,2 ± 4,4*#	38,2 ± 4,7*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 30 - Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 20 - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

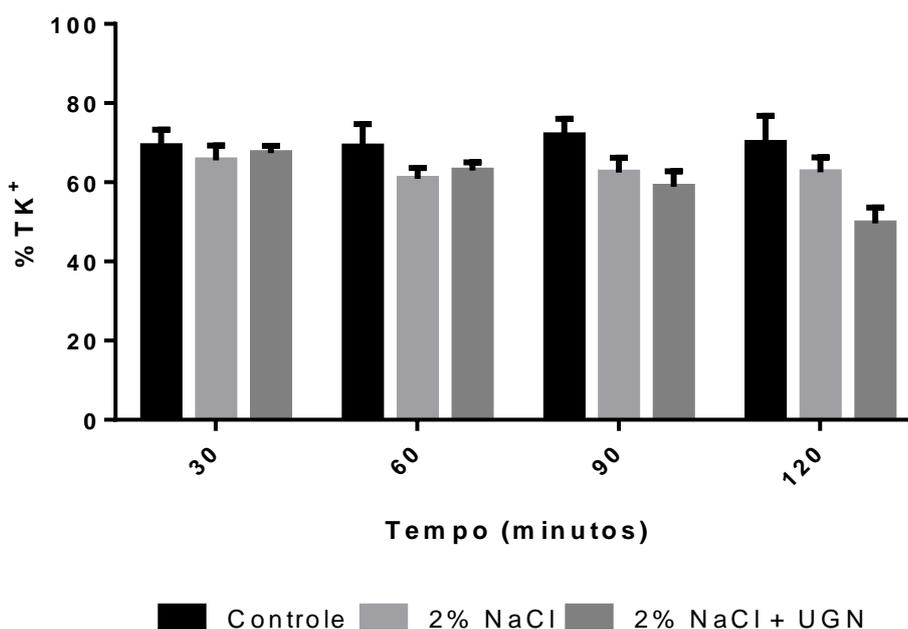
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	69,1 ± 4,1	69,0 ± 5,7	71,8 ± 4,2	69,9 ± 6,9
2% NaCl	65,5 ± 3,8	60,8 ± 2,8	62,5 ± 3,7	62,6 ± 3,7
2% NaCl + UGN	67,3 ± 1,8	62,9 ± 1,8	58,9 ± 3,9	49,7 ± 3,9

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 31 - Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 21 - Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

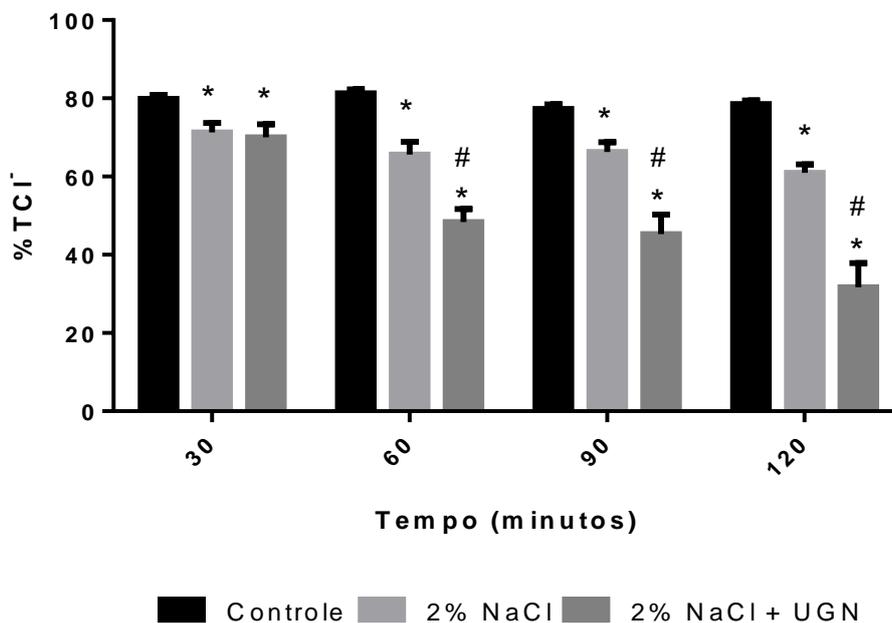
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	79,9 ± 1,0	81,2 ± 1,1	77,3 ± 1,1	78,5 ± 0,9
2% NaCl	71,2 ± 2,5*	65,7 ± 3,2*	66,2 ± 2,6*	60,9 ± 2,2*
2% NaCl + UGN	70,1 ± 3,3*	48,4 ± 3,3*#	45,3 ± 4,9*#	31,7 ± 6,2*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 32 - Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 22 – Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

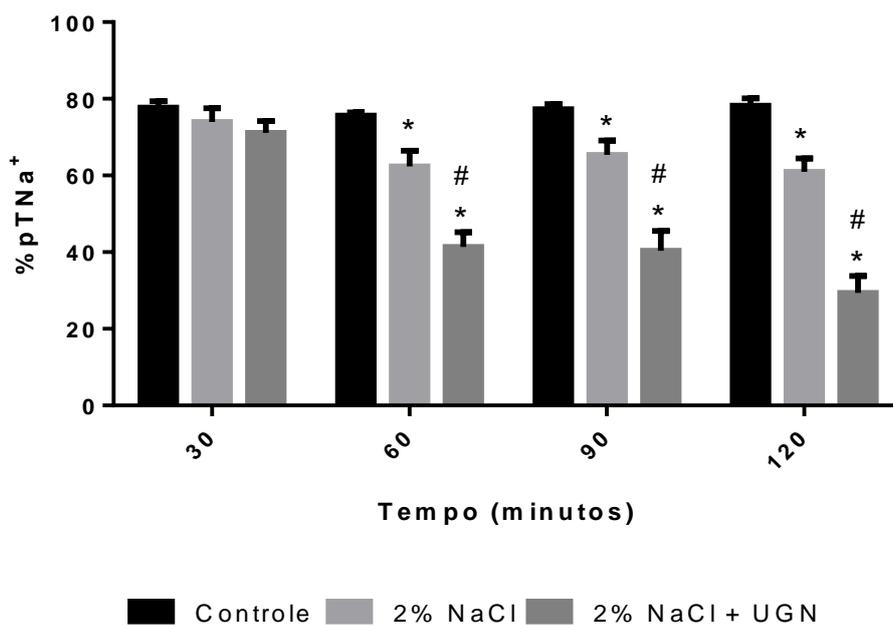
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	77,7 ± 1,7	75,6 ± 0,9	77,3 ± 1,3	78,2 ± 1,9
2% NaCl	73,9 ± 3,6	62,4 ± 4,1*	65,4 ± 3,7*	60,9 ± 3,5*
2% NaCl + UGN	71,1 ± 3,1	41,4 ± 3,8*#	40,4 ± 5,2*#	29,4 ± 4,4*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 33 – Percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 23 – Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

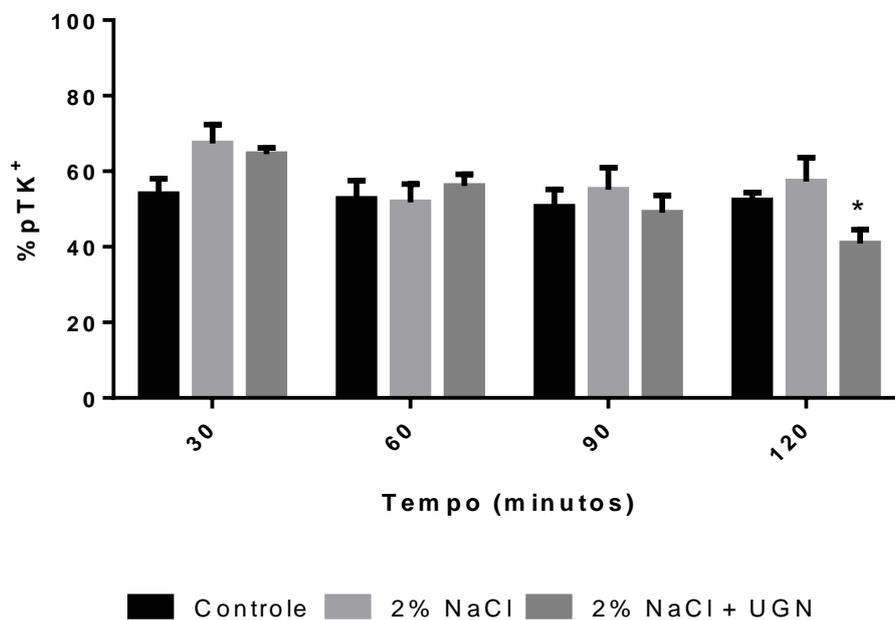
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	53,9 ± 4,1	52,7 ± 4,9	50,7 ± 4,6	52,3 ± 2,1
2% NaCl	67,4 ± 5,0	51,8 ± 4,9	55,1 ± 5,9	57,3 ± 6,4
2% NaCl + UGN	64,5 ± 1,7	56,1 ± 3,1	49,0 ± 4,6	41,0 ± 3,7*

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 34 – Percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 24 – Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCI⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

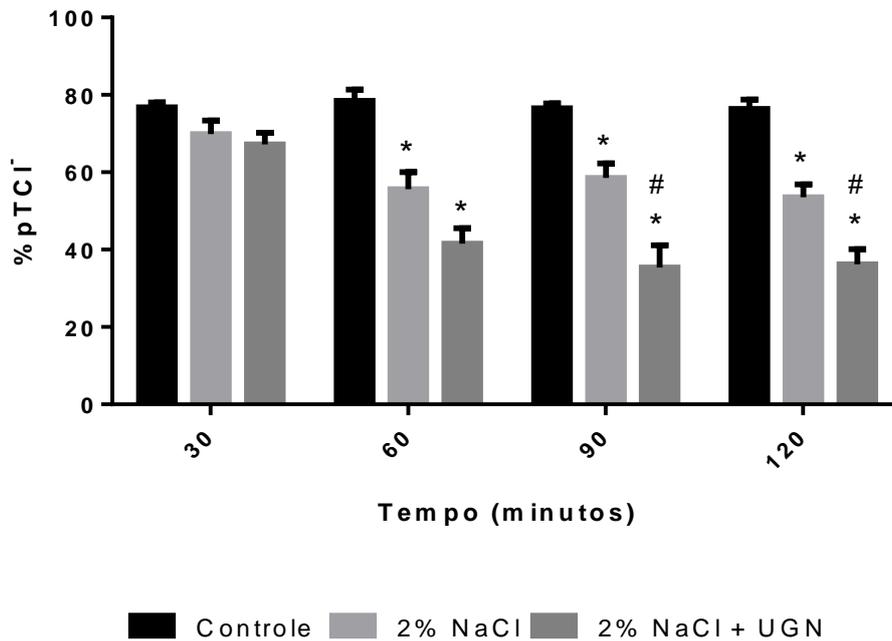
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	76,8 ± 1,2	78,5 ± 2,9	76,6 ± 1,2	76,4 ± 2,5
2% NaCl	69,8 ± 3,5	55,6 ± 4,4*	58,5 ± 3,8*	53,5 ± 3,3*
2% NaCl + UGN	67,2 ± 3,0	41,5 ± 4,0*	35,4 ± 5,7*#	36,2 ± 3,9*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 35 – Percentual de transporte tubular proximal de cloreto (%pTCI⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 25 – Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

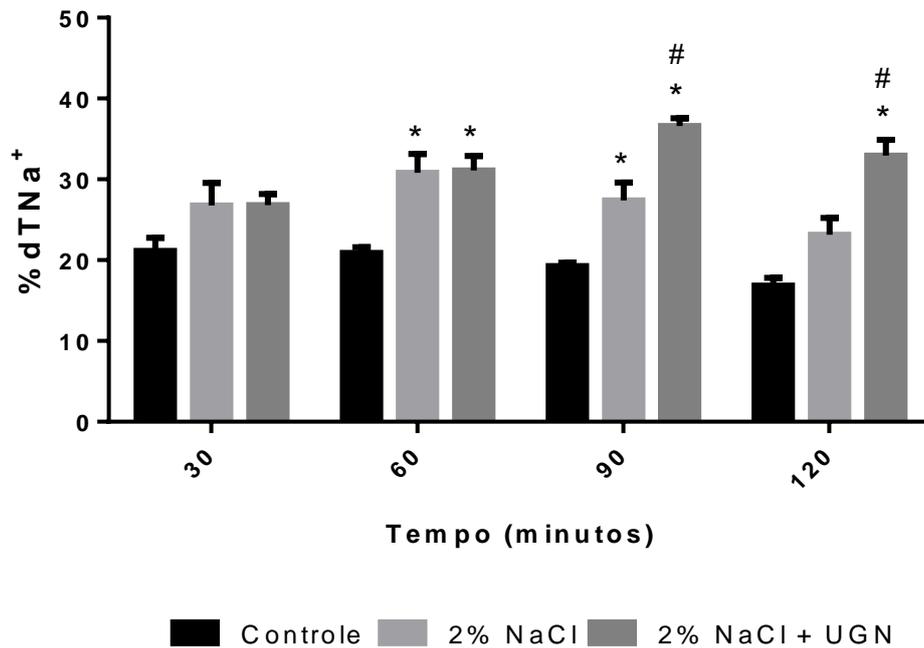
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	21,1 ± 1,7	20,9 ± 0,7	19,2 ± 0,4	16,9 ± 1,0
2% NaCl	26,8 ± 2,8	30,8 ± 2,3*	27,4 ± 2,1*	23,2 ± 2,1
2% NaCl + UGN	26,8 ± 1,4	31,1 ± 1,8*	36,6 ± 0,9*#	32,9 ± 1,9*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 36 – Percentual de transporte tubular distal de sódio (%dTNa⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 26 – Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

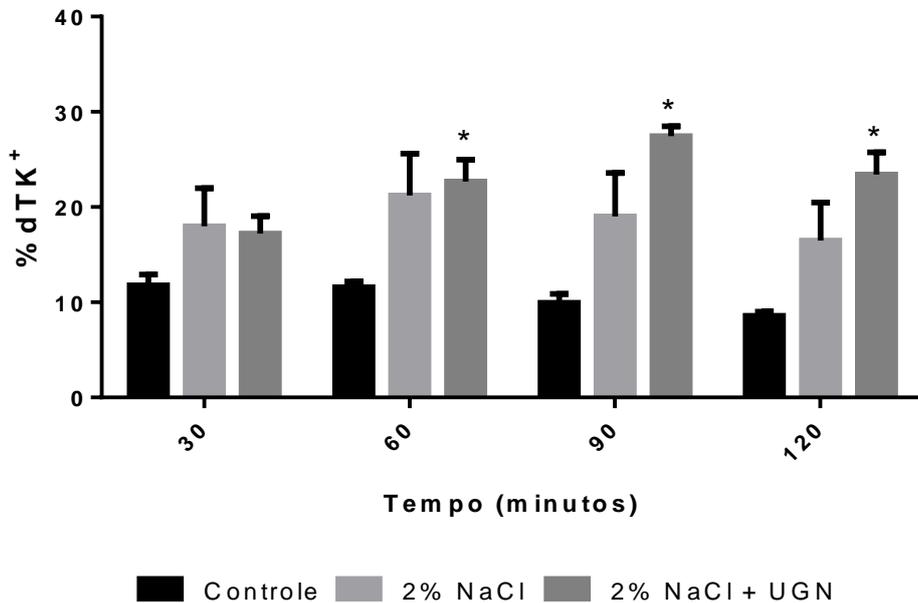
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	11,8 ± 1,2	11,6 ± 0,6	9,9 ± 0,9	8,6 ± 0,4
2% NaCl	17,9 ± 3,9	21,2 ± 4,4	19,0 ± 4,5	16,5 ± 4,0
2% NaCl + UGN	17,2 ± 1,8	22,7 ± 2,3*	27,4 ± 1,0*	23,4 ± 2,3*

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 37 – Percentual de transporte tubular distal de potássio (%dTK⁺) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 27 – Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCI⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

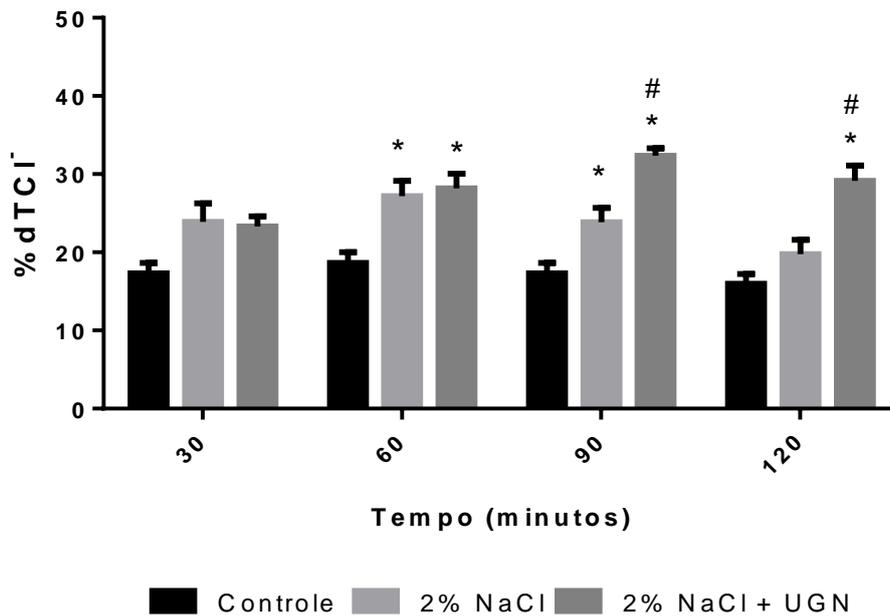
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	17,3 ± 1,3	18,6 ± 1,4	17,3 ± 1,3	15,9 ± 1,3
2% NaCl	23,9 ± 2,4	27,2 ± 1,9*	23,8 ± 1,8*	19,8 ± 1,9
2% NaCl + UGN	23,3 ± 1,3	28,2 ± 1,9*	32,4 ± 0,9*#	29,1 ± 1,9*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 38 – Percentual de transporte tubular distal de cloreto (%dTCI⁻) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Tabela 28 - *Clearance* osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).

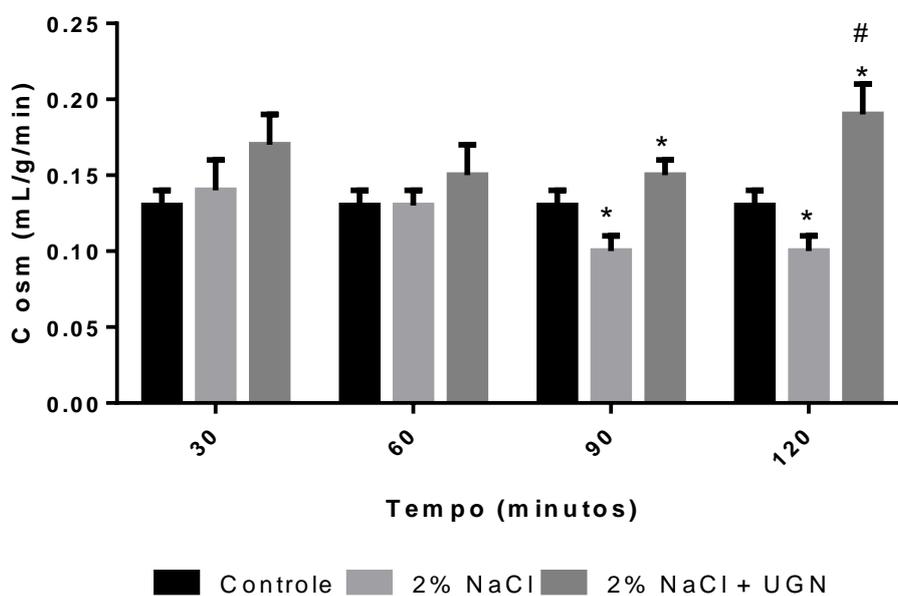
Grupos	Tempo (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
2% NaCl	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01*	0,10 ± 0,01*
2% NaCl + UGN	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01*	0,19 ± 0,02*#

Resultados expressos em média ± EPM

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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

Figura 39 - *Clearance* osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6), 2% NaCl (n=6) e 2% NaCl com Uroguanilina (n=6).



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

p < 0,05 para comparação em relação ao 2% NaCl

5.3 Expressão gênica em rins tratados com sal

A expressão renal dos receptores de GC-A e GC-C foram avaliados pela reação de polimerase em cadeia (PCR) em Tempo Real. A expressão relativa para ambos os genes de ratos controle e tratado com 2% de NaCl foram comparados. O Limiar de ciclo (C_T) pode ser definido como o ciclo de amplificação, onde a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. Níveis de C_T são inversamente proporcionais à quantidade de alvo de ácido nucleico da amostra (isto é, quanto menor o valor de C_T maior a quantidade de ácido nucléico na amostra alvo). Valores de C_T menores do que 29 indicam grande quantidade de ácido nucléico na amostra, em vista disso podemos evidenciar que nossos resultados apresentam um valor de C_T abaixo e próximos ao valor que indicam grande quantidade de ácido nucléico (Tabela 26).

Todos os iniciadores do gene apresentaram uma eficiência que variou de 95% a 105%, demonstrando que os iniciadores apresentaram boa eficiência.

Avaliamos pelo método matemático descrito por Pfaffl (2001) a amplificação dos genes de GC-A e GC-C em relação à amplificação do gene de referência 18S Rrna para os rins de ratos controle e tratado com solução 2% de NaCl. Nesse método, valores acima de 1,0 são considerados aumento da expressão e números abaixo de 1,0 a expressão dos genes estudados estão diminuídas. Os nossos resultados demonstram o redução da expressão gênica para o receptor GC-A e aumento bastante considerável da expressão para o receptor GC-C após o tratamento com 2% de NaCl (Tabela 26). O intestino delgado corresponde ao controle para o GC-C e a aorta para o GC-A.

O tratamento salino aumenta a expressão para o receptor GC-C ao mesmo tempo em que diminui a expressão de mRNA para o receptor de GC-A, demonstrando que o tratamento salino promove alterações em receptores renais.

Tabela 29 – Expressão gênica de receptores GC-A e GC-C após o tratamento por 10 dias em gaiolas metabólicas em ratos controle e tratados com 2% de NaCl por via oral.

Grupos	Valor de C_T 18S rRNA	Valor de C_T GC-A	Valor de C_T GC-C	Razão GC-A	Razão GC-C
Controle	12,85 ± 0,21	28,15 ± 1,15	33,73 ± 0,60	-	-
2% NaCl	14,50 ± 0,63	30,28 ± 1,48	22,05 ± 0,95	0,68	13.948,45
Intestino delgado	15,44 ± 0,25	-	29,45 ± 0,28	-	124,43
Aorta	12,87 ± 0,006	22,10 ± 0,13	-	73,20	-

Resultados expressos em média ± EPM. O C_T (*Threshold cycle*), pode ser definido como o ciclo de amplificação, onde a quantidade de fluorescência observada é 10 vezes maior que a fluorescência inicial ou basal de cada reação de PCR. A razão da expressão relativa é calculada baseada no método descrito por Pfaffl (2001).

6. Discussão

O presente trabalho se deteve em estudar os efeitos fisiológicos em nível de órgão isolado de ratos. A metodologia de órgão isolado é fundamental para a compreensão e explicação de mecanismos observados individualmente no órgão em questão, eliminando, assim, a influência de outros órgãos no tecido em estudo. Para a seguinte tese, usamos o sistema de perfusão de rim isolado de rato estabelecido por Fonteles (1980; 1983).

Em nosso estudo, animais foram submetidos a uma ingestão por 10 dias em gaiolas metabólicas de uma solução de 2% de NaCl, tendo o rim perfundido após o tratamento. Estudos anteriores mostraram que os ratos ingerindo 2% de NaCl na dieta, apresentaram um significativo aumento na diurese e natriurese, seguido por alterações em alguns parâmetros renais (Jorge, 2009).

A ingestão de sal estimula a secreção de prouroguanilina das células enterocromafins encontradas no intestino delgado. A prouroguanilina secretada pelo intestino atinge a circulação sistêmica e alcança os rins, onde é convertida em uroguanilina. A uroguanilina atua nos segmentos do néfron regulando o transporte tubular de eletrólitos, promovendo a excreção de sódio e diurese (Lessa, 2012). O mecanismo de ação provavelmente está relacionado a ativação do receptor GC-C e aumento da excreção urinário de cGMP (Fonteles *et al.*, 2009).

A urodilatina é outro hormônio renal que está relacionada ao controle de eletrólitos no rim. Urodilatina é sintetizada e secretada no túbulo distal do rim, envolvida diretamente na regulação de sódio e água no tecido renal (Hirsch, 2006). A via de ativação da urodilatina é a mesma do peptídeo natriurético atrial (ANP), através da estimulação de receptores GC-A (NPR-A), produzindo cGMP como segundo mensageiro (Vives, 2010). Porém, seu mecanismo de ação ainda não foi claramente elucidado.

A ingestão aumentada de NaCl na dieta e a regulação do excesso de sódio via sistema renal, também é promovida pela urodilatina. Estudos demonstraram que o aumento da ingestão de sódio promove uma elevada excreção urinária da urodilatina, além de diurese e natriurese (Forssmann, 2001). A urodilatina apresentou-se como um peptídeo com um potente efeito

natriurético parácrino, responsável pela regulação de sódio e água na função renal.

Portanto, quando há uma ingestão aumentada de sódio na dieta a uroguanilina e a urodilatina parecem estar envolvidas nesse processo de regulação do sódio ingerido em excesso. A uroguanilina atua via intestino, através da ativação de receptores GC-C no rim (Sindice, 2006). Enquanto que a urodilatina atuando por via parácrina na ativação de receptores GC-A (Hirsch, 2006). Contudo, a regulação de sódio renal não é tão simples, e precisa ser mais bem compreendida através do estudo da interação desses hormônios com os seus respectivos receptores na função renal que é alterada por todos esses mecanismos moleculares.

Os resultados observados no presente estudo, demonstram alterações na função renal em rins de animais tratados com 2% de NaCl por 10 dias, em comparação ao grupo controle. Observou-se um pequeno decréscimo significativo na pressão de perfusão durante todo o período de experimentação. Os resultados demonstram também a redução da resistência vascular renal, mas sem qualquer alteração no fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular. Além disso, segue-se um aumento na excreção renal de sódio e cloreto, sendo a excreção de sódio e cloreto mais proeminente no túbulo proximal, mais do que no distal. O transporte de potássio não sofre alteração. Observou-se também uma redução no *Clearance osmolar* com o tratamento salino.

Alterações semelhantes na função renal em ratos tratados com sal foram também observadas por Jorge (2009). Estudo com ratos em gaiolas metabólicas demonstraram que a solução de 2% de NaCl na água promovia aumento do volume urinário, excreção de sódio, osmolaridade da urina e na concentração de cGMP urinário (Fonteles *et. al.*, 2009). Os resultados sugerem a participação da uroguanilina que é produzida após uma prolongada ingestão de sal (Fonteles, 2009).

Outro hormônio envolvido na regulação da excreção de sódio renal é a urodilatina. No presente trabalho foi investigado os efeitos da urodilatina em rim isolado de rato, sendo as seguintes as principais alterações encontradas: redução da pressão de perfusão, resistência vascular renal e fluxo urinário. Não foram observadas alterações no ritmo de filtração glomerular. Quanto ao

transporte de eletrólitos foi observado aumenta da excreção de sódio e cloreto, sendo as alterações mais proeminentes ao nível distal do que proximal.

Ratos submetidos a ingestão de 2% de NaCl por 10 dias, também tiveram seus rins perfundidos com urodilatina na concentração de 0,1 µg/mL. Observou-se um aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular renal, porém o fluxo urinário mostrou-se reduzido durante todo o experimento. O ritmo de filtração glomerular não foi alterado. Os resultados foram comparados ao grupo controle com o tratado com 2% de NaCl.

O transporte tubular total de sódio e cloreto apresentou-se aumentado com a o grupo salina perfundido com urodilatina. Sendo esse aumento principalmente ao nível proximal do que distal para sódio e cloreto, quando comparado ao grupo de solução 2% NaCl. Observou-se também nesse grupo que o transporte tubular total de potássio foi discretamente alterado, seguido de um aumento no transporte distal de potássio em relação ao controle. Ao mesmo tempo em que se demonstrou uma redução significativa no *clearance osmolar*. Os resultados mostraram que a urodilatina promove alterações significativas na função de renal de ratos tratados com sal.

Estudos com perfusão de rim isolado de rato, submetidos ao efeito da urodilatina, demonstraram significativa ação diurética e inibição na reabsorção de sódio (Kirchhoff, 1994). O mesmo estudo demonstrou que a ação da urodilatina é dependente da pressão de perfusão. Observou-se também que a urodilatina aumenta a excreção de sódio e do fluxo urinário sem alterar a taxa de filtração glomerular e o fluxo renal (Kirchhoff, 1994).

Outros estudos de rim isolado com urodilatina demonstraram redução na pressão de perfusão e no transporte tubular de sódio e cloreto; não alterando o fluxo urinário e nem transporte tubular de potássio (Santos-Neto, 2008). A redução da pressão de perfusão também foi observada no presente estudo no grupo urodilatina controle (UD), porém esse efeito não ocorreu após o tratamento com sal e perfusão com urodilatina (2% NaCl + UD).

Um estudo clínico realizado por Bestle (1999) com pacientes que receberam urodilatina intravenosamente, após uma dieta rica em sódio, apresentaram muitos dos parâmetros similares os nosso resultado com ratos. Observou-se que a urodilatina promovia uma redução da pressão arterial

média e uma aumento da concentração de cGMP na urina e no plasma (Bestle, 1999).

Os parâmetros renais também foram alterados pela urodilatina em humanos. A urodilatina reduziu o fluxo plasmático renal e o ritmo de filtração glomerular (Bestle, 1999). O fluxo urinário apresentou um padrão bifásico; observou-se um aumento em doses menores, seguido de uma redução em doses maiores de urodilatina. A taxa de excreção de sódio demonstrou o mesmo padrão bifásico observado para o fluxo urinário, enquanto que a excreção de potássio foi reduzida (Bestle, 1999).

Os estudos renais em humanos com urodilatina demonstram uma similaridade com os nossos resultados apresentados anteriormente. A urodilatina atua no rim através da ativação de receptores de guanilato ciclase A (GC-A; NPR-A), estimulando a produção de cGMP (Kirchhoff, 1994). Os resultados da expressão gênica demonstraram que ratos submetidos a alta ingestão de NaCl apresentam uma reduzida expressão de GC-A e aumento na expressão de mRNA para o receptor de uruguanilina GC-C. Portanto, os efeitos observados no presente trabalho podem ser resultado da menor ativação do receptor de GC-A pela urodilatina, quando ratos são submetidos a uma alta ingestão de NaCl.

Quanto ao transporte de eletrólitos é importante observar que a urodilatina sem tratamento salino promove um aumento na excreção de sódio e cloreto, sem alterar o transporte de potássio. O presente estudo demonstra que a urodilatina (UD) sozinha promove alterações no transporte total de sódio, porém essas alterações não ocorrem ao nível de túbulo proximal, esse dados parecem fortalecer a hipótese de que a UD não exerce função em túbulo proximal (Vives *et al.*, 2010).

Os resultados também podem ser explicados pela ativação de receptores de GC-C, visto que existem evidências de que a urodilatina e a uroguanilina agem sinergicamente na ativação desses mecanismos renais (Fonteles, 2009). Outros estudos demonstram que urodilatina está envolvida na regulação circadiana da excreção de sódio, sendo essa regulação tardia e após uma infusão salina aguda (Drummer, 1991).

Sugere-se que os resultados apresentados pela urodilatina em ratos tratados com sal, sejam devido a reduzida expressão do GC-A, que impede as

alterações renais promovidas por sua ativação. Estudos realizados por Fluge (1999) mostram que a queda da pressão arterial promovida pela urodilatina está relacionada a vasodilatação promovida pela ativação dos receptores GC-A. A ação da uroguanilina também pode estar envolvida, visto a existência de múltiplos sítios de ação para a uroguanilina, que podem envolver diferentes receptores e transportadores, como proposto por Carritherss (2004), ou interações com diferentes mediadores ao longo do néfron (Sindic, 2005).

Na tentativa de melhor esclarecer os mecanismos e a atuação dos diversos peptídeos envolvidos na regulação renal após uma ingestão aumentada de sódio, foram realizados estudos também com a uroguanilina. Após o tratamento por 10 dias em gaiolas metabólicas com solução de 2% NaCl, os rins foram perfundidos com 0,1 mg de uroguanilina. Os resultados observados foram: elevação da pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular; seguido de aumento na excreção de sódio e cloreto, atuando principalmente ao nível de túbulo proximal.

Seguido disso, foi determinada através de PCR em tempo real a participação dos receptores de GC-A e GC-C após um ingestão aumentada de NaCl. Os resultados demonstraram uma redução na expressão de mRNA para GC-A e aumento bastante considerável para GC-C. Portanto, podemos afirmar que o tratamento salino sensibiliza o rim para a possível atuação da uroguanilina, ao aumentar a expressão de receptores GC-C e reduzir os de GC-A. Todos esses eventos ocorrem na tentativa de manter a homeostasia, ou seja, excretar o excesso de sódio que foi ingerido através da dieta (Lessa & Fonteles, 2012).

Estudos realizados com a Renoguanilina, um dos peptídeos da família das guanilinas, demonstraram sua ação no transporte de hidrogênio através da inibição do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) e da bomba H^+ -ATPase na membrana luminal de túbulo renais perfundidos pela via PKG dependente, conforme demonstrado por microperfusão renal *in vivo* (Lessa *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem a atuação da uroguanilina nos segmentos do néfron regulando o transporte tubular de eletrólitos, resultando em diminuição da reabsorção de sal pelos túbulos proximais, por inibição do trocador NHE3 local (Lessa & Fonteles, 2012).

Em vista disso, nossos resultados confirmam a participação da uroguanilina em promover a excreção aumentada de sódio após uma ingestão de grandes quantidades de sal. Observa-se também que a diminuição da reabsorção de sal pelos túbulos proximais é realizada principalmente pela uroguanilina e não pela urodilatina, provavelmente na inibição do trocador NHE3 promovida pela ativação do receptor GC-C (Sindic & Schlatter, 2006).

O tratamento com 2% de NaCl promove uma regulação aumentada do receptores GC-C para a uroguanilina. Além disso, observou-se que em animais tratados com sal, pequena concentração de uroguanilina é necessária para produzir diurese, natriurese e excreção de cGMP (Fonteles *et al.*, 2009). Em vista disso, o sal promove alterações renais significativas, provavelmente através de receptores de guanilato ciclase, sensibilizando o rim para a atuação de prováveis sinalizadores. Devido a isso, as alterações apresentadas no grupo tratado com sal e perfundido com UD em relação ao UD controle podem ser explicadas pela expressão reduzida do receptor GC-A, resultando no comportamento diferenciado da urodilatina em rins submetidos ao tratamento salino.

Existem estudos também que mostram o aumento nos níveis plasmáticos de ANP em ratos submetidos a uma ingestão aumentada de NaCl. Observa-se também que o receptor GC-A para o ANP apresenta uma expressão reduzida (Gauquelin, 1988). Portanto, os resultados apresentados anteriormente podem estar associados ao ANP e uroguanilina, que podem interagir sinergicamente (Fonteles *et al.*, 2009).

O presente estudo também demonstrou a atuação da uroguanilina sobre o transporte tubular de potássio, visto que a urodilatina apresentou pouca alteração nesse transporte. O tratamento salino promove aumento da secreção distal de potássio, o que se mostra bem mais pronunciado na presença da uroguanilina. A urodilatina não afetou o transporte de potássio a nível distal. Esses resultados corroboram com outros estudos que demonstram o aumento da secreção de potássio em túbulo distal final e coletor cortical, via canais MAXIK (Lessa & Fonteles, 2012).

Os resultados apresentados demonstram que a urodilatina e uroguanilina atuam em vias distintas na promoção da excreção do excesso de sal em rins de ratos. Após uma ingestão aumentada de sal, são ativadas vias

fisiológicas muito bem reguladas no objetivo de eliminar o excesso de sódio. A uroguanilina parece ser o hormônio primordial envolvido nessa via, contudo o ANP e urodilatina apresentam também participações nesse processo. O receptor GC-C está diretamente envolvido na produção de cGMP e inibição de trocador NHE3.

Estudos mais apurados e extensivos precisam ser realizados nessa área, principalmente devido ao aumento de doenças associadas ao excesso de consumo de sódio na dieta. As vias de sinalização das guanilinas no rim tem se tornado alvo de inúmeras pesquisas recentes devido a sua grande importância nesse processo (Lessa & Fonteles, 2012). Outras vias de sinalização precisam também ser exploradas, tais como realizadas no presente estudo ao investigar a interação existente entre urodilatina, uroguanilina, sal e receptores GCs.

Visto a complexidade da regulação salina, esse estudo trouxe algumas contribuição para o melhor entendimento dessas vias de sinalização celular, porém mais estudos precisam ser feitos para a compreensão dos mecanismos moleculares e fisiológicos de regulação renal envolvidos na alta ingestão de sódio. Principalmente envolvendo os receptores GCs e família das guanilinas e peptídeos natriuréticos.

7. Conclusão

- ✓ O presente estudo mostrou que o tratamento de 2% de NaCl promoveu alterações significativas na função renal de ratos, resultando na excreção aumentada de sódio e cloreto, principalmente ao nível de túbulo proximal;
- ✓ A urodilatina reduziu a pressão de perfusão e a diurese, promovendo aumento na excreção de sódio e cloreto, contudo alterando mais ao nível distal do que proximal;
- ✓ Na presença do sal os efeitos da urodilatina se encontram atenuados, devido principalmente a expressão reduzida de seu receptor GC-A;
- ✓ A uroguanilina na presença do sal promove aumento da pressão de perfusão e diurese, acompanhada de excreção aumentada de sódio e cloreto, principalmente ao nível de túbulo proximal;
- ✓ As alterações renais promovidas pela ingestão de NaCl foram provavelmente resultados da ativação da via UGN-GC-C-cGMP;
- ✓ A ação natriurética e diurética promovidas pelo sal e a uroguanilina é provavelmente resultante da ativação do receptor GC-C com posterior inibição do trocador NHE3 em túbulo proximal de néfron.

Referências Bibliográficas

AYALA, C.; TONG, X.; VALDERRAMA, A.; IVY, A.; KEENAN, N. (2010) Actions taken to reduce sodium intake among adults with self-reported hypertension: healthstyles survey, 2005 and 2008. **The Journal of Clinical Hypertension**. Vol. 12, No. 10: 793-799.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. (2004) **Fisiologia**. São Paulo: Elsevier. 5ed. p. 701-727.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. (2009) **Fisiologia**. São Paulo: Elsevier. 6ed.

BESTLE, M.H.; OLSEN, N.V.; CHRISTENSEN, P.; JENSEN, B.V.; BIE, P. (1999). Cardiovascular, endocrine, and renal effects of urodilatin in normal humans. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 276: R684-R695.

BOOMSMA, M.; VAN DEN MEIRACKER, A.H. (2001) Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. **Cardiovasc Res**, 51:442.

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

CARRITHERS, S.L.; HILL, M.J.; JOHNSON, B.R.; O'HARA, S.M.; JACKSON, B.A.; OTT, C.E.; LORENZ, J.; MANN, E.A.; GIANNELLA, R.A.; FORTE, L.R.; GREENBERG, R.N. (1999) Renal effects of uroguanylin and guanylin in vivo. **Braz J Med Biol Res** 32: 1337–1344.

CARRITHERS, S.L.; OTT, C.E.; HILL, M.J.; JOHNSON, B.R.; CAI, W.; CHANG, J.J.; SHAH, R.G.; SUN, C.; MANN, E.A.; FONTELES, M.C.; FORTE, L.R.; JACKSON, B.A.; GIANNELLA, R.A.; GREENBERG, R.N. (2004) Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. **Kidney Int** 65: 40–53.

CHOI, M.R.; CITARELLA, M.R.; LEE, B.M.; LUCANO, F.; FERNANDEZ, B.E. (2011) Urodilatin increases renal uptake: intracellular network involved. **J. Physiol. Biochem.** 67:243-247.

CITARELLA, M.R.; CHOI, M.R.; GIRONACCI, M.M.; MEDICI, C.; CORREA, A.H.; FERNANDEZ, B.E. (2009) Urodilatin and dopamine: a new interaction in the kidney. **Regulatory Peptides**, 153:19-24.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE JR. (1977) Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J Physiol.**, v. 266, n. 1, p. 103-121.

COHEN, M. B.; HAWKINS, J. A.; WITTE, D. P. (1998) Guanylin mRNA expression in human intestine and colorectal adenocarcinoma. **Lab Invest** 78, 101–108.

COMRIE, M. M.; CUTLER, C. P.; CRAMB, G. (2001) Cloning and expression of guanylin from the European eel (*Anguilla anguilla*). **Biochem Biophys Res Commun** 281, 1078– 1085.

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

DRUMMER, C.; FIEDLER, F.; KONING, A.; GERZER, R. (1991) Urodilatin, a kidney-derived natriuretic factor, is excreted with a circadian rhythm and is stimulated by saline infusion in man. **Journal of the American Society of Nephrology.** 1: 1109-1113.

ENDLICH, K.; FORSSMAN, W.G.; STEINHAUSEN, M. (1995) Effects of urodilatin in the rat kidney: comparison with ANF and interaction with vasoactive substances. **Kidney International**, vol. 47, pp. 1558-1568.

FAN, X.; WANG, Y.; LONDON, R.M.; EBER, S.L.; KRAUSE, W.J.; FREEMAN, R.H.; FORTE, L.R. (1997) Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in

the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. **Endocrinology** 138: 4636– 4648.

FLUGE, T.; FORSSMANN, W.G.; KUNKEL, G. (1999) Bronchodilation using combined urodilatin-albuterol administration in asthma: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Eur. J. Med. Res.** 4:411-415.

FORSSMANN, W.G.; RICHTER, R.; MEYER, M. (1998) The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. **Histochem. Cell Biol.** 110: 335-357.

FORSSMANN, W.G.; MEYER, M.; FORSSMANN, K. (2001) The renal urodilatin system: clinical implications. **Cardiovascular Research**, 51:450-462.

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

FORTE, L.R.; LONDON, R.M.; FREEMAN, R.H.; KRAUSE, W.J. (2000) Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 278:180-191.

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

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

FONTELES, M. C.; LEIBACH, F. H. (1982) Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, v. 90, n. 3, p. 159-161.

FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACK, A. J.; WHERTHEIM, S. J (1983) Support of kidney function by long-fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 235-246.

FONTELES, M.C.; LIMA, A. A. M.; FANG, G.; GUERRANT, R. L. (1991) **Effects os STa, Lt and cholera toxin on renal electrolyte, transport: Possible roles of na endogenous ST like compound from the isolated perfused kidney.** Extended Abstract. XXVII US-Japan Cholera Meeting in Charlottesville.

FONTELES, M. C. C.; VILLAR-PALLASI, G.; FANG, J.; LARNER, R. L. GUERRANT. (1993) Partial characterization of an ANF/urodilatin-like substance released from perfused rabbit kidney under hypoxia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 75-79.

FONTELES, M.C.; GREENBERG, R.N.; MONTEIRO, H.S.A.; CURRIE, M.G.; FORTE, L.R. (1998) Natriuretic and kaliuretic actives of guanylin induces intestinal secretion and natriuresis in the isolated perfused kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29:267-271.

FONTELES, M.C.; HAVT, A.; PRATA, R.B.; PRATA, P.H.B.; MONTEIRO, H.S.A.; LIMA, A.A.M.; JORGE, A.R.C.; SANTOS, C.F.; GREENBERG, R.N.; NASCIMENTO, N.R.F. (2009) High-salt intake primes the rat kidney to respond to a subthreshold uroguanylin dose during ex vivo renal perfusion. **Regulatory Peptides.** 158: 6-13.

FRANCO, V.; OPARIL, S. (2006) Salt sensitivity, a determinant of blood pressure, cardiovascular disease and survival. **Journal of American College of Nutrition.** Vol. 25, No. 3, 247S-255S.

GARDNER, D.G.; CHEN, S.; GLENN, D.J.; GRIGSBY, C.L. (2007) Molecular biology of the natriuretic peptide system implications for physiology and hypertension. **Hypertension.** 49:419-426.

GAUQUELIN, G.; GARCIA, R.; CARRIER, F.; CANTIN, M.; GUTKOWSKA, J.; THIBAUT, G.; SCHIFFRIN, E.I. (1998) Glomerular ANF receptor regulation during changes in sodium and water metabolism. **Am. J. Physiol.**; 254:F51-5.

GOODMAN & GILMAN (2012) **As bases farmacológicas da terapêutica.** São Paulo, Editora McGraw-Hill, 12.ed.

HALL, J.E. (1986) Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 250, R960-972.

HALL, J.E. (2011) **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro, Elsevier, 12.ed.

HAMRA, F.K.; FORTE, L.R.; EBER, S.L.; PIDHORODECKYJ, N.V.; KRAUSE, W.J.; FREEMAN, R.H.; CHIN, D.T.; TOMPKINS, J.A.; FOK, K.F.; SMITH, C.E.; DUFFIN, K.L.; SIEGEL, N.R.; CURRIE, M.G. (1993) Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:10464-8.

HAMILTON, R. L.; BERRY, M. N.; WILLIAMS, M. C.; SEVERINGHAUS, E. M. (1974) A simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. **J Lipid Res.** v. 15, n. 2, p. 182-186.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. J. (1968) Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J Lipid Res.**, v. 9, n. 5, p. 667-8.

HIRSCH, J.R.; MEYER, M.; FORSSMANN, W.G. (2006) ANP and Urodilatin: Who is who in the kidney. **European Journal of Medical Research**, 11: 447-454.

JORGE, A. R. C. (2009) **Estudo dos efeitos da alta ingestão de cloreto de sódio por via oral sobre o metabolismo diário e função renal de ratos**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará.

KIERSZENBAUM, A. L. & TRES, L. L. (2012) **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 3.ed.

KINOSHITA, H.; FUJIMOTO, S.; NAKAZATO, M.; YOKOTA, N.; DATE, Y.; YAMAGUCHI, H.; HISANAGA, S.; ETO, T. (1997) Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular form in renal diseases. **Kidney Int** 52: 1028–1034.

KIRCHOFF K.; BUB, A.; MARXEN, P.; FROSSMAN, W.G. (1994) Urodilatin inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused rat kidney. **Exp. Nephrol.**, 2, 6: 231-7.

KITA, T.; SMITH, C.E.; FOK, K.F.; DUFFIN, K.L.; MOORE, W.M.; KARABATSOS, P.J.; KACHUR, J.F.; HAMRA, F.K.; PIDHORODECKYJ, N.V.; FORTE, L.R.; CURRIE, M.G. (1994) Characterization of human uroguanylin: member of the guanylin peptide family. **Am. J. Physiol.** 266:F342-8.

KITA T.; KITAMURA K.; SAKATA J.; ETO T. (1999) Marked increase of guanylin secretion in response to salt loading in the rat small intestine. **Am J Physiol** 277: G960-6.

KUHN M (2004) Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. **Basic Res Cardiol** 99: 76–82.

LESSA, L.M.A.; AMORIM, J.B.O.; FONTELES, M.C.; MALNIC, G. (2009) Effects of renoguanylin on hydrogen enterotoxin in renal sodium tubular transport. **Pharmacol. Toxicol.** 70: 163-167.

LESSA, L.M.A.; FONTELES, M.C. (2012) **Uroguanilina**. In Fisiologia. Margarida de Mello Aires. 4ª Ed., p. 829-833. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

LIMA, A.A.M.; FONTELES, M.C. (1983) **Efeitos das toxinas do V. Cholerae e da E. coli no rim perfundido**. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fisiologia. São Lourenço – MG. Anais...S-31, p46.

LUCAS, K.A.; PITARI G.M.; KAZEROUNIAN S.; RUIZ-STEWART I.; PARK J.; SCHULZ S.; CHEPENIK K.P.; WALDMAN S.A. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev** 52: 375–414.

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

MELO, L.G.; ACKERMAN, U. (2000) ANP in regulation of arterial pressure and fluid-electrolyte balance: lessons from genetic mouse models. **Physiol Genomics**, 3:45.

MICHELL, A.R.; DEBNAM, E.S.; UNWIN, R.J. (2008) Regulation of renal function by the gastrointestinal tract: potential role of gut-derived peptides and hormones. **Annu. Rev. Physiol.** 70:379-403.

MONTEIRO, H. S. A. (1990) **Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato.** Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MURTHY K.S.; TENG B.Q.; ZHOU H.; JIN J.G.; GRIDER J.R.; MAKHLOUF G.M. (2000) G(i-1) /G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 278:G974–G980.

PITTS, R. F. (1971) Metabolism of aminoacids by the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 220, p. 862-867.

QIAN, X.; MOSS, N.G.; FELLNER, R.C.; GOY, M.F. (2008) Circulating prouroguanylin is processed to its active natriuretic form exclusively within the renal tubules. **Endocrinology**, 149: 4499-509.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. (2011) **Farmacologia.** Rio de Janeiro, Elsevier, 7.ed.

ROSS, B. D. (1978) The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.**, v. 55, n. 6, p. 513-521.

SANTOS-NETO, M.S. (2008). **Um estudo renal das interações entre Uroguanilina, Urodilatina e Bradicinina na presença de Isatin e ODQ.** Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará.

SARNO, F.; CLARO, R.M.; LEVY, R.B.; BANDONI, D.H.; FERREIRA, S.R.G.; MONTEIRO, C.A. (2009). Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2002-2003. **Rev. Saúde Pública**. 43(2): 219-25.

SARNO, F. (2010) **Estimativas do consumo de sódio no Brasil, revisão dos benefícios relacionados à limitação do consumo deste nutriente na Síndrome Metabólica e avaliação de impacto de intervenção no local de trabalho**. Tese de Doutorado em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo.

SCHMITZ, P.G. (2012) **Rins: uma abordagem integrada à doença**. Porto Alegre, AMGH, 1.ed.

SCHULZ, S.; GREEN, C.K.; YUEN, P.S.; GARBERS, D.L. (1990) Guanylyl cyclase is a heatstable enterotoxin receptor. **Cell** 63:941–948.

SINDICE, A.; HIRSCH, J.R.; VELIC, A.; PIECHOTA, H.; SCHLATTER, E. (2005) Guanylin and uroguanylin regulate electrolyte transport in isolated human cortical collecting ducts. **Kidney Int** 67: 1420–1427.

SINDICE, A.; SCHLATTER, E. (2006) Cellular effects of guanylin and uroguanylin. **Journal of the American Society of Nephrology** 17:607-16.

SUZUKI, T.; YAMAZAKI, T.; YAZAKI, Y. (2001) The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. **Cardiovasc Res**, 51:489.

VANDER (2001) **Human Physiology: The Mechanism of Body Function**. McGraw–Hill. 8 ed. 800p.

VIVES, D.; FARAGE, S.; MOTTA, R.; LOPES, A.G.; CARUSO-NEVES, C. (2010) Atrial natriuretic peptides and urodilatin modulate proximal tubule Na⁺-ATPase activity through activation of the NPR-A/cGMP/PKG pathway. **Peptides**, 31: 903-908.

VOLMER, V.M.; SACKS, F.M.; ARD, J.; APPEL, L.J.; BRAY, G.A.; SIMONS-MORTON, D.G.; COLIN, P.R.; SVETKEY, L.P.; ERLINGER, T.P.; MOORE, T.J.; KARANJA, N. (2001) Effects of diet and sodium intake on blood pressure:

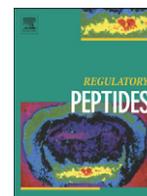
subgroup analysis of the DASA – Sodium trial. **Annals of Internal Medicine**, v.135, p. 1019 – 28.

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

WANG, X.; ARMANDO, I.; UPADHYAY, K.; PASCUA, A.; JOSE, P.A. (2009) The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** 18: 412-20.

YU, S.; AVERY, L.; BAUDE, E.; GARBERS, D.L. (1997) Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: A new family of chemosensory receptors. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:3384–3387.

ANEXO



High-salt intake primes the rat kidney to respond to a subthreshold uroguanylin dose during *ex vivo* renal perfusion

Manassés C. Fonteles^{a,b,c,*}, A. Havt^a, Rodrigo B. Prata^a, Patrícia H.B. Prata^a, Helena S.A. Monteiro^a, Aldo A.M. Lima^a, Antônio R.C. Jorge^a, Cláudia F. Santos^c, Richard N. Greenberg^{d,e}, Nilberto R.F. Nascimento^c

^a INCT-Institute of Biomedicine & Clinical Research Unit/Center for Global Health, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Mackenzie Presbyterian University, São Paulo, Brazil

^c Superior Institute of Biomedicine, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d University of Kentucky Medical School, Lexington, Kentucky, USA

^e Veterans Administration Medical Center, Lexington, Kentucky, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2008

Received in revised form 11 July 2009

Accepted 17 July 2009

Available online 23 July 2009

Keywords:

Salt metabolism

Intestinal natriuretic peptide

Guanylate cyclase-C

ABSTRACT

In a variety of animal models, uroguanylin causes diuresis, natriuresis and kaliuresis and is found in larger concentrations in the urine compared to controls after oral salt intake or in conditions of excess salt and fluid retention. It has been proposed that uroguanylin functions as an intestinal natriuretic hormone following intake of meals high in salt content. In the present work, we examined if 10 days of salt ingestion resulted in an enhanced response to uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. Rats were given normal water, 1% NaCl (HS1%), or 2% NaCl (HS2%) for 10 days, at which time the right kidneys were surgically removed and perfused with a modified Krebs-Henseleit solution for 30 min. After a 30-min control period, the kidneys were perfused with a modified Krebs-Henseleit solution containing 0.06 μ M uroguanylin for an additional 90 min. Compared to vehicle-matched time controls, 0.06 μ M uroguanylin perfusion of kidneys from rats maintained on HS2% resulted in a significantly increased urine flow (UF; from 0.17 ± 0.01 to 0.23 ± 0.01 , after 60 min, $n = 6$, $P < 0.05$), fractional Na^+ excretion ($\%E_{\text{Na}^+}$; from 16.6 ± 0.7 to 30 ± 2 , after 60 min, $n = 6$, $P < 0.05$), fractional K^+ excretion ($\%E_{\text{K}^+}$; from 20.5 ± 0.58 to 37.4 ± 2.1 , after 60 min, $n = 6$, $P < 0.05$), and fractional Cl^- excretion increased from 18.16 ± 0.52 to 35.2 ± 2.0 at 60 min, $n = 6$, $P < 0.05$. With the exception of a significant increase in the $\%E_{\text{K}^+}$, no other effect was observed in the kidneys from the rats maintained on HS1%, and no significant effects were seen in those that were maintained on normal water. The effect of a higher dose (0.6 μ M) of uroguanylin on urinary flow, sodium or potassium excretion was also significantly increased by 2% NaCl (HS2%) treatment ($P < 0.05$). We also observed an expressive upregulation of the GC-C and a slight downregulation of the GC-A receptor in high-salt treated rats. These data demonstrate that prolonged salt ingestion primes the kidney to enhanced renal responses to uroguanylin.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Three decades ago Lennane and associates demonstrated a robust natriuretic response elicited by high-salt meals when compared to equimolar intravenous infusion of NaCl. They suggested the rapid release of a portal or intestinal hormone after the ingestion of salt meals in order to regulate responses to oral salt loading [1]. Uroguanylin and guanylin may work this way, but in particular uroguanylin. Guanylin and uroguanylin are two endogenous human natriuretic peptides with homology to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa and which bind to STa's receptor in intestinal tissue, guanylyl cyclase-C (GC-C) [2–6]. Both guanylin and uroguanylin are present in the intestinal epithelia, are secreted into the intestinal

lumen and into the circulation [3,7]. Uroguanylin is thought to be the main intestinal natriuretic peptide since it is produced and stored in specific populations of enterochromaffin cells [7], its expression is influenced by the levels of dietary salt [8,9], circulates in the bloodstream [10–14] and was shown to have natriuretic activity both *in vitro* and *in vivo* experimental models [15,16]. Furthermore, both blunted natriuresis after high-salt oral load and a modest chronic hypertension were observed in uroguanylin knockout mice [17].

Recently two reports have described the release of uroguanylin as a propeptide (proUGN) from the intestine and its conversion to active natriuretic peptide within renal tubules [8,9], reinforcing the existence and complexity of this putative intestinal–renal endocrine axis.

Several investigators have reported on the presence of circulating guanylin and uroguanylin in the situation of excess salt intake and volume overload [10–13,20,21]. Analysis of uroguanylin in the urine and mRNA measurements in intestinal and renal cells show that

* Corresponding author. Rua da Consolação, 896-8° andar 01302-907, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 2114 8550; fax: +55 11 3214 3102.

E-mail address: reitor@mackenzie.br (M.C. Fonteles).

uroguanylin levels increase after oral salt loading and in pathological states of salt and fluid overload, including congestive heart failure, renal failure requiring dialysis, and nephrotic syndrome [10,11,13,20–22].

In one report, urine levels of uroguanylin increased significantly from 128 to 425 pmol/ml with the oral salt loading of healthy rats given sodium intakes from 0.08% to 4% NaCl [14]. The urinary excretion of uroguanylin significantly correlated with that of Na^+ , K^+ , Cl^- and cyclic GMP while the expression level of uroguanylin mRNA in both the upper small intestine and kidneys significantly increased in rats fed a high-salt diet [14]. In another study, plasma uroguanylin levels were significantly increased in a rat model of nephrotic syndrome [20]. Uroguanylin excretion into urine is reported to be increased in humans and rats on a high-salt diet compared with those on a low-salt diet [11,14].

The renal mechanisms of uroguanylin are currently under investigation by several laboratories. For example, both GC-C and GC-C independent mechanisms were proposed for its natriuretic and kaliuretic activities [23–25].

It has been proposed that uroguanylin participates in an endocrine axis linking the intestine to the kidney, inducing the kidney to excrete salt and water whenever it is necessary to balance the variable concentrations of salt in diets.

Otherwise, reports of plasma levels of uroguanylin are usually in the femtomolar to picomolar range but the minimal concentration necessary to elicit significant natriuresis at least in the isolated rat kidney was found to be $0.19 \mu\text{M}$ [16]. This discrepancy has argued against a physiological role of UGN as a natriuretic peptide.

On the other hand, synergism between ANP and urodilatin with uroguanylin at subthreshold doses was reported by our group [26] and may imply in the existence of important cross-talk mechanisms for the regulation of salt excretion.

Our hypothesis is that besides increased levels of proUGN and UGN in the circulation, an adaptive response of the target organ, i.e., the kidney, turns it more sensitive and responsive to uroguanylin after prolonged oral high-salt load.

The perfusion of kidneys, obtained from rats receiving normal water, with $0.06 \mu\text{M}$ uroguanylin was shown to be devoid of effect in the renal function [26]. Using the isolated perfused rat kidney model and 0.06 or $0.6 \mu\text{M}$ bioactive uroguanylin in the perfusate, this work examines the influence of prolonged (ten days) oral high-salt loading on renal responses to this peptide and verified whether this procedure sensitized the kidney to respond to a subthreshold concentration of UGN.

2. Materials and methods

2.1. Uroguanylin synthesis

Opossum uroguanylin (EDCELCINVACTGC) was kindly supplied by Dr. Leonard Forte (University of Missouri, Columbia, Missouri). It was synthesized by a solid-phase method and purified by C_{18} reverse-phase HPLC as described in detail elsewhere [4]. The protein structure was verified by amino acid analysis, mass spectrometry and N-terminal sequence analysis. The opossum uroguanylin has almost the same structure as the rat uroguanylin, except for an N-terminal amino acid. All chemicals were reagent grade and were purchased from either Sigma (St. Louis, MO) or Merck (West Point, PA).

2.2. Animals

Adult Wistar–Kyoto rats (250–280 g) were kept in metabolic cages for 10 days in a 12-h light–dark cycle and received normal water, 1% NaCl (HS1%), or 2% NaCl (HS2%) solution *ad libitum*. Urine samples were collected daily and analyzed for volume, Na^+ , K^+ , Cl^- ,

osmolality and cGMP. Before each experiment, the animals were fasted for 24h except for either NaCl or water *ad libitum*.

2.3. Isolated perfused rat kidney assay

The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body wt ip). The renal artery of the right kidney of each animal was cannulated via the superior mesenteric artery without flow interruption to avoid ischemic damage and placed into the perfusion line. The animals were then euthanized.

The perfusate solution was a modified Krebs-Henseleit solution (MKHS) with the following composition (in mM): 147Na^+ , 5K^+ , 2.6Ca^{2+} , 2.0Mg^{2+} , 110Cl^- , 25HCO_3^- , 1SO_4^{2-} , 1PO_4^{3-} . Six grams of previously dialyzed bovine serum albumin (BSA) were added to 100 ml of MKHS. Immediately before the beginning of each experiment, 100 mg of glucose, 50 mg of urea, and 50 mg of inulin were added to the MKHS in a final volume of 100 ml. The pH was adjusted to 7.4. The perfusion system is a modification of the technique of Bowman [27] by employing a silastic membrane oxygenator in the perfusion line ($\text{Po}_2 = 450$ to 500 Torr) [28].

A period of 15 to 20 min before the beginning of the experiment was allowed for the washout of remaining blood. Perfusate flow was kept constant (average of 20 ml/min) and perfusion pressure allowed to fluctuate. At the beginning of each perfusion experiment, there was a 30-min control period before infusion of the test peptide ($0.06 \mu\text{M}$ uroguanylin). In another set of experiments uroguanylin was probed at a dose 10-fold larger (i.e., $0.6 \mu\text{M}$) in kidneys isolated from both high-salt (HS2%) and normal water-treated rats. This dose was previously shown to be very effective to increase urinary flow, sodium and potassium excretion [16]. Each experiment lasted 120 min. Samples of both urine and perfusate were collected at 10-min intervals for analysis. The perfusate and urine aliquots obtained were analyzed for Na^+ , K^+ , Cl^- , and osmolality.

2.4. Biochemical analyses

The fractional excretions of Na^+ ($\%E_{\text{Na}^+}$), K^+ ($\%E_{\text{K}^+}$), and Cl^- ($\%E_{\text{Cl}^-}$) were determined by conventional clearance formulas as described in detail elsewhere [28,29]. The glomerular filtration rate was determined by the method described by Wasler [30] as modified by Fonteles [28]. cGMP levels in urine were determined by a cGMP enzyme immunoassay (EIA; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The cGMP concentration of urine samples was determined in duplicate or triplicate by comparison with known standards as previously described by Fonteles et al [31].

2.4.1. Gene expression of GC-A and GC-C receptors in kidney

Following TRI-Reagent® protocol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), total RNA was extracted from samples of rat kidney and small intestine (duodenum). The samples were obtained from both control (normal water-treated rats; $n = 4$) and from rats treated with either 1% NaCl (HS1%; $n = 4$) and 2% NaCl (HS2%; $n = 4$). The yield and quality of total were determined spectrophotometrically using 260 nm and 260/280 nm ratio, respectively. Two micrograms of RNA with a final volume of $20 \mu\text{l}$ were reverse transcribed into cDNA with the SuperScript™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen), using a 96-well MyCycler thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA).

The expression of guanylate cyclase receptors (GC-A and GC-C) were investigated into all samples described above. The 18 subunit rRNA gene was used as reference to show that all RNA and cDNA samples were working to amplify the studied genes. The specific primers sequences (5'–3') used were: GC-A receptor (sense: GAACCGAAGCTTCCAAGGTG; antisense: GTGGATATCCCAGAGGCCAGT), GC-C receptor (sense: ATGACGCTACTCTGGGCTT and antisense: GTGGCACTTCTGCTCACCT) and 18S rRNA (sense: ACATCCAAGGAAGGCAGCAG and antisense: GCTGGAATTACCGCGGCTG) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad-CA,

USA). Real Time PCR was performed by using the iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) and iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Thermal cycling for GC-C and GC-A analysis comprised an initial denaturation step at 95 °C for 3 min followed by 35 cycles for GC-C and 40 cycles for GC-A at 95 °C for 30 s, an annealing temperature of 60.5 °C for GC-C and 58 °C for GC-A and an extension step at 72 °C for 1 min. For 18S rRNA analysis, thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95 °C for 3 min followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, an annealing temperature of 60 °C and an extension step at 72 °C for 1 min. As a final extension step, we heated the samples at 72 °C for 3 min. After each reaction we also performed a melting curve analysis to evaluate specificity of PCR amplification. All samples were run as duplicates. Each well contained 25 μ l as final volume, including 2 μ l of cDNA and 200nM of gene-specific primers. cDNA samples from rat small intestine and aorta were used as positive control and 18S rRNA as housekeeping gene. Negative samples were run with miliQ autoclaved water as template. The threshold cycle (C_T), defined as the fractional PCR cycle number at which the fluorescence reaches 10 times the baseline standard deviation, was used to compare the expression of GC-C and GC-A in the tissues studied. The mathematical method described by Pfaffl [32] was performed to evaluate the relative expression of GC-C and GC-A based on SYBR green staining.

2.5. Data analyses

The data (mean \pm SEM) were averaged in triplicate between 30-min intervals. Statistical analyses were carried out by one-way ANOVA followed by Dunnet or unpaired Student *t* test by using the GraphPad Prism 4.0 software. There were at least six or more perfused kidney experiments for each data point.

3. Results

The rats were housed in metabolic cages and provided normal water (control), HS1%, or HS2%. Urine was collected every 24h. For analysis, urine specimens were pooled for days 1–4, 5–7 and 8–10. Fig. 1 summarizes the data concerning the amount of urinary volume, Na^+ excretion, and cGMP levels in the urine. Table 1 shows the variation in rat weight, water intake, K^+ excretion and urinary concentration (Osmols) for the various time points. There were no differences among these parameters in the control group. The urinary volume was unaltered among the 3 periods studied in the control group (Fig. 1A). The urinary volume in the HS1% group presented 67.8% increase (from 9.28 ± 0.8 to 15.58 ± 1.59) in the initial period (1–4 days) associated to increased urinary cGMP levels.

The HS1% group had increased urinary volume values as compared to control at the 5–7-day period (17.41 ± 1.85 ml vs. 11.08 ± 1.40 ml; $P < 0.05$) and 8–10-day period (21.60 ± 2.47 vs. 12.04 ± 1.50 ml; $P < 0.01$). In the HS2% group the urinary volume increased significantly in the initial period (44.30 ± 4.5 ml vs. 12.58 ± 1.59 ; $P < 0.001$) and continued to increase in the following periods (Fig. 1A). The same pattern of increase occurred for the sodium excretion parameter. The animals maintained on HS1% and HS2% had significant increases in excretion of sodium and in urine osmolality on all experimental periods (Fig. 1B). The water intake (ml/day/100 g) was increased proportional to the NaCl level in the drinking water (Table 1). This probably means an attempt to keep a positive water balance in face of increased urinary volumes.

The level of cGMP excretion (fmol/min) in the initial period (days 1–4) in the HS1% group was greater than in the control group (21.7 ± 3.4 vs. 13.8 ± 1.2 ; $P < 0.05$) (Fig. 1C). There was a higher increase in the 5–7-day period (33.8 ± 4.1 vs. 9.8 ± 1.6 fmol/min; $P < 0.01$) and in the 8–10-day period (31.4 ± 2.5 vs. 12.2 ± 2.5 ; $P < 0.01$). The concentration of cGMP in the urine of HS2% treated rats was even higher (50.8 ± 9.9 —days 1–4; 72.6 ± 15 —days 5–7 and 69.6 ± 9.3 —days 8–10; $P < 0.001$ vs. control).

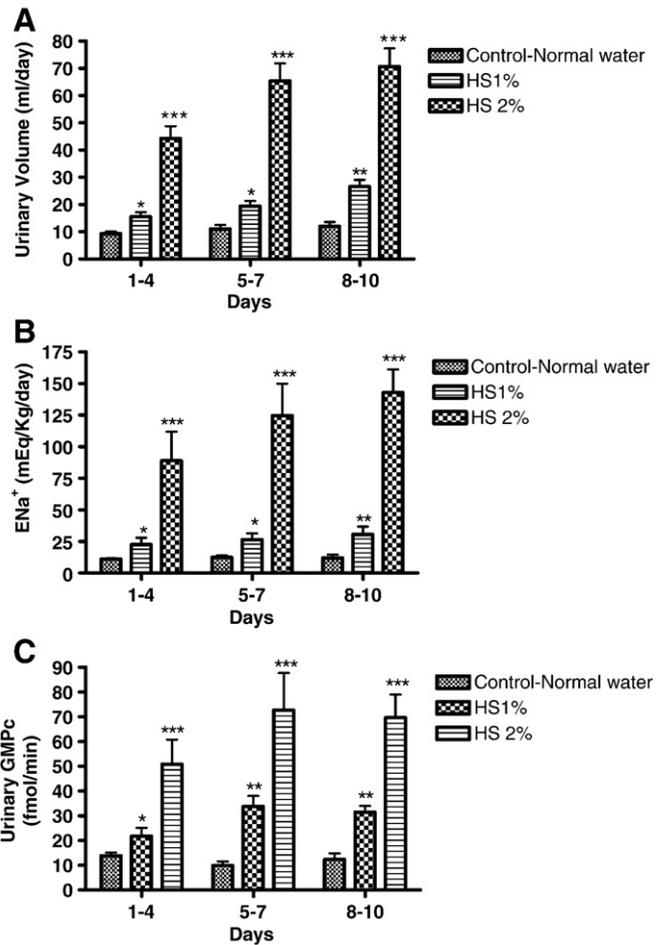


Fig. 1. Diuresis, natriuresis and cGMP urinary levels in normotensive Wistar rats kept in metabolic cages. The data were evaluated in three periods: Initial (days 1–4), Intermediate (days 5–7) and Final (days 8–10). The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$ /group). The data were compared for statistical significance to values from control animals at the same time point. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, ANOVA followed by Dunnet.

Fig. 2A shows the two-fold increase in urine flow with the perfusion of $0.06 \mu\text{M}$ uroguanylin in the rats maintained on HS2% ($P < 0.01$). Similarly, with perfusion of $0.06 \mu\text{M}$ uroguanylin in the rats maintained on HS2%, Fig. 2B shows an increase in fractional excretion of sodium ($\% \text{ENa}^+$) from 16.6 ± 0.7 to 30 ± 2.0 at 60 min ($P < 0.01$).

Table 1
Urinary data from metabolic cages in normal and salt fed rats.

Group/period	Parameters			
	Rat weight (g)	Water intake (ml/day/100 g)	EK^+ (mEq/kg day)	EOsm. (mOsm/kg day)
Normal water (days 1–4)	269.8 \pm 4.60	8.3 \pm 0.40	9.96 \pm 0.63	75.39 \pm 6.39
Normal water (days 5–7)	280.0 \pm 5.40	8.4 \pm 0.80	11.53 \pm 0.99	80.71 \pm 9.15
Normal water (days 8–10)	271.3 \pm 6.10	9.9 \pm 0.61	10.68 \pm 1.54	77.03 \pm 11.14
HS 1% (days 1–4)	278.5 \pm 6.90	16.68 \pm 0.60*	11.18 \pm 1.30	93.52 \pm 7.27
HS 1% (days 5–7)	275.4 \pm 8.80	16.79 \pm 0.65*	13.4 \pm 1.40	128.45 \pm 8.29*
HS 1% (days 8–10)	287.0 \pm 7.20	14.73 \pm 0.95*	12.26 \pm 0.93	156.65 \pm 9.36*
HS 2% (days 1–4)	262.0 \pm 5.40	34.74 \pm 2.47**	10.6 \pm 2.73	208.28 \pm 49.41*
HS 2% (days 5–7)	251.7 \pm 4.80	39.64 \pm 1.67**	9.48 \pm 0.93	286.04 \pm 59.33*
HS 2% (days 8–10)	244.0 \pm 4.60	43.27 \pm 1.89**	8.8 \pm 0.71	298.09 \pm 42.81*

Data were evaluated at: Initial (1–4 days), Intermediate (5–7 days) and Final (8–10 days) periods. Data are expressed as mean \pm SEM. of six rats in each group. Comparisons were made with the initial 4-day period (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. control-normal water at the same time period, ANOVA followed by Dunnet).

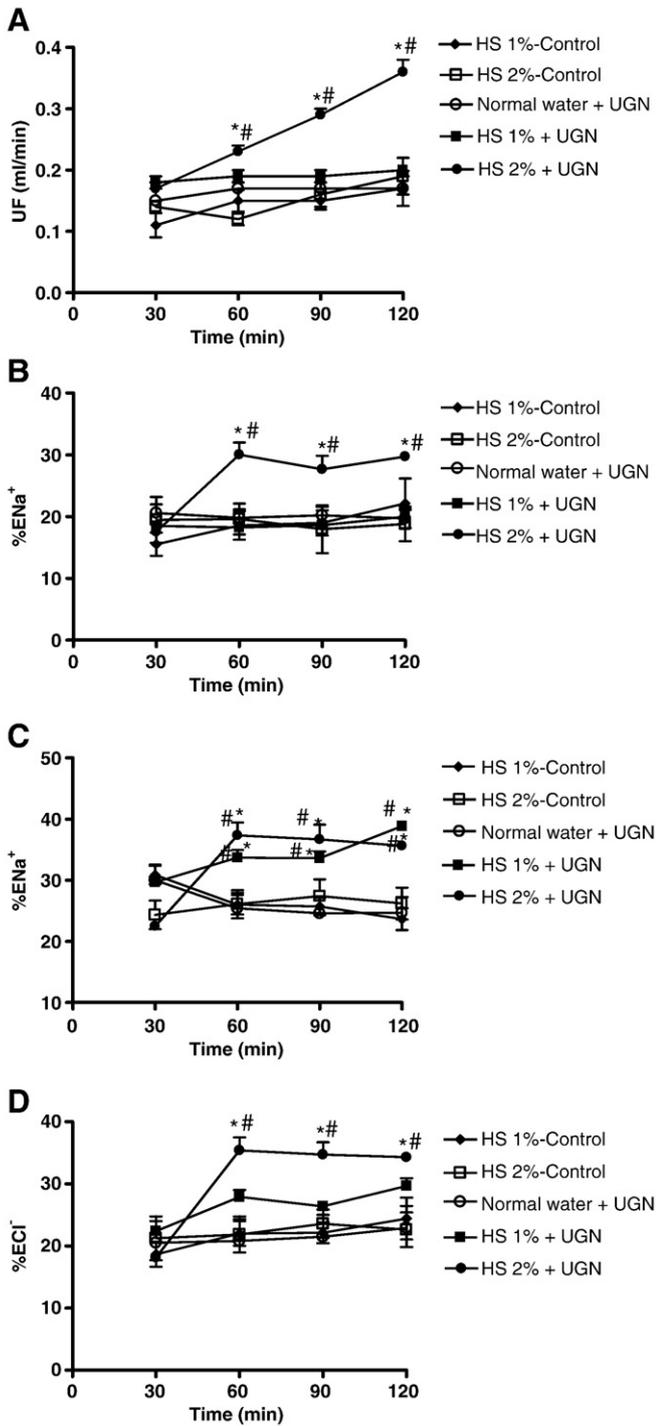


Fig. 2. Effect of uroguanylin (0.06 μ M) on urinary flow (A), fractional sodium (B), potassium (C) and chloride excretion (D) in the isolated perfused rat kidney. The normal water group received tap water and HS1% and HS2% received water with 1% and 2% NaCl, respectively, as drinking water during 10 days and thereafter the kidneys were isolated and perfused. 0.06 μ M UGN was added to the perfusate at the end of the 30-min period of perfusion. * P <0.05 (ANOVA followed by Dunnett) vs. internal control i.e., the value obtained in the 30-min period, before UGN administration, in the same group. # P <0.05 (unpaired Student t test) vs. the external control group (i.e., the value obtained in the control animals, i.e. from normal water + UGN group, at the same time point).

Fig. 2C demonstrates that rats maintained on HS2% had an increase in their fractional excretion of potassium ($\%E_{K^+}$) from 20.5 ± 0.6 to 37.4 ± 2.0 at 60 min (P <0.05). A similar and significant increase in the fractional excretion of potassium was found in rats maintained on 1% NaCl (P <0.05). This was the only significant result in this group (Fig. 2C),

and no natriuresis was detected. Fig. 2D shows an increase in the fractional excretion of chloride ($\%E_{Cl^-}$) from 18.16 ± 0.5 to 34.0 ± 0.5 at 120 min (P <0.01). There was only a slight increase in chloride excretion with the perfusion of 0.06 μ M uroguanylin in the rats maintained on HS1% (P <0.06).

Fig. 3A and B shows the urinary excretion of cGMP in the perfused kidney. No significant changes were seen in the control rats maintained on water (Fig. 3A). The excretion of urinary cGMP was not altered in the HS1% group and no significant natriuresis was elicited by the subthreshold concentration of UGN in this group. When compared to the control rats maintained on water, basal urinary cGMP levels were at least 10-fold greater at each time point in control rats maintained on HS2%. Perfusion of 0.06 μ M uroguanylin resulted in a slight increase in cGMP (Fig. 3A), but this was not sufficient to evoke natriuresis. The increase in cGMP (fmol/min) was greater in the rats maintained on HS2% at 60 (11.9 ± 3.4 vs. 0.007 ± 0.001 ; P <0.001) and 90 (3.6 ± 1.0 vs. 0.006 ± 0.001 ; P <0.001) min (Fig. 3B).

Kidneys isolated from rats treated with HS2% were also perfused with a higher concentration of uroguanylin and proved to induce effective diuresis, natriuresis and kaliuresis. The addition of 0.6 μ M uroguanylin to the perfusate of kidneys isolated from normal water-treated rats, evoked an increase in urinary flow (ml/g/min) from 0.15 ± 0.009 at the 30-min period to 0.20 ± 0.013 , 0.27 ± 0.02 and 0.26 ± 0.01 at 60, 90 and 120-min periods, respectively. This diuretic effect was greater in HS2%-treated rats being 0.14 ± 0.018 at the 30-min internal control period and 0.28 ± 0.04 ; 0.42 ± 0.05 and 0.47 ± 0.01 at 60, 90 and 120-min periods (Fig. 4A). The same pattern occurred when the data from percentual sodium and potassium excretion were compared between kidneys isolated from normal water or HS2% treated rats. The percentual sodium excretion increased in kidneys isolated from normal water-treated rats from 21.42 ± 1.43 at the 30-min internal control period to 30.00 ± 2.71 ; 35.71 ± 3.28 and 42.14 ± 4.28 in the following periods, respectively. In the HS2% group the sodium excretion was

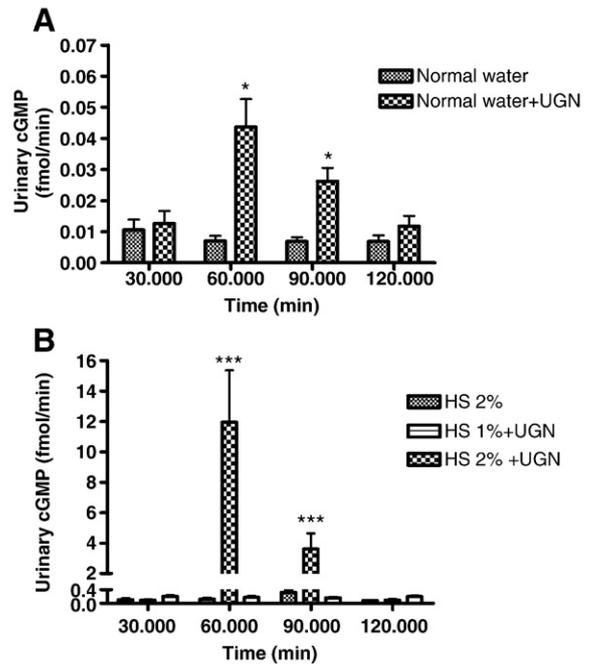


Fig. 3. Urinary GMPc concentration obtained from urines collected in the perfused rat kidney and in 30-min intervals during 2 h. The Normal water group received tap water and HS1 and 2% received tap water with 1% and 2% NaCl, respectively, as drinking water during 10 days and thereafter the kidneys were isolated and perfused. 0.06 μ M UGN was added to the perfusate 30min after the control period. The results are expressed mean \pm SEM. * P <0.05 vs. control normal water, not perfused with UGN, at the same time point and *** P <0.001 vs. control HS2%, not perfused with UGN, at the same time point; these data were compared by using unpaired Student t test.

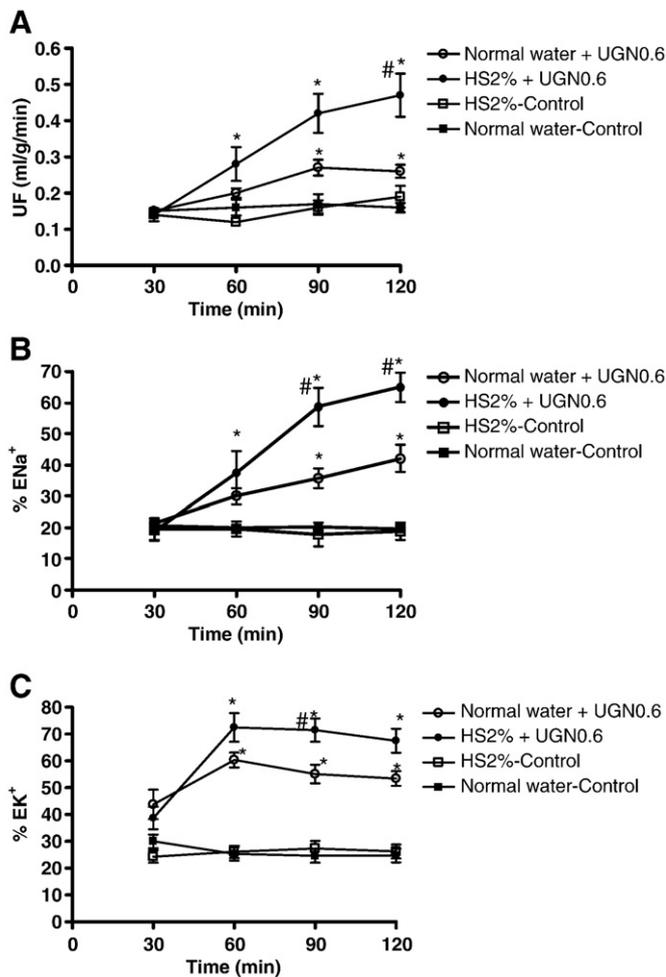


Fig. 4. Effect of uroguanylin (0.6 μM) on urinary flow (A), fractional sodium (B) and potassium excretion (C) in the isolated perfused rat kidney. The normal water group received tap water and HS2% received water with 2% NaCl, respectively, as drinking water during 10 days and thereafter the kidneys were isolated and perfused. UGN was added to the perfusate at the end of the 30-min period of perfusion. * $P < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett) vs. internal control (i.e., the value obtained in the 30-min period, before UGN administration, in the same group). # $P < 0.05$ (unpaired Student t test) vs. the external control group (i.e., the value obtained in the control animals, i.e. normal water + UGN0.6, at the same time point).

Table 2
Data collected from kidneys harvested from normal water, high-salt 1% (HS1%, 2%–HS2%) fed animals perfused with Krebs–Henseleit solution plus uroguanylin (UGN) 0.06 μM 30 min after the beginning of the experiment.

Parameters	Groups	30 min	60 min	90 min	120 min
PP (mmHg)	Control normal water	122.0 \pm 3.17	122.3 \pm 3.40	120.3 \pm 2.27	121.8 \pm 3.62
	Control HS 2%	96.4 \pm 5.30	97.8 \pm 5.00	91.0 \pm 4.30	90.2 \pm 5.60
	UGN 0.06 μM normal water	126.0 \pm 3.10	121.3 \pm 1.80	123.5 \pm 2.00	128.9 \pm 2.60
	UGN 0.06 μM HS 1%	104.0 \pm 3.20	100.0 \pm 2.50	101.0 \pm 3.30	103.0 \pm 2.80
	UGN 0.06 μM HS 2%	104.5 \pm 1.23	106.3 \pm 2.39	106.9 \pm 1.73	120.6 \pm 3.71*
	UGN 0.6 μM normal water	115.5 \pm 3.06	122.2 \pm 4.10	134.2 \pm 3.44	129.5 \pm 3.60
	UGN 0.6 μM HS 2%	122.53 \pm 5.28	129.6 \pm 4.33	129.7 \pm 5.28	127.7 \pm 6.05
	GFR (ml/g/min)	Control normal water	0.69 \pm 0.09	0.66 \pm 0.08	0.65 \pm 0.10
Control HS 2%		0.83 \pm 0.16	0.65 \pm 0.10	0.63 \pm 0.08	0.76 \pm 0.13
UGN 0.06 μM normal water		0.83 \pm 0.10	0.81 \pm 0.06	0.80 \pm 0.05	0.83 \pm 0.06
UGN 0.06 μM HS 1%		0.80 \pm 0.15	0.70 \pm 0.12	0.65 \pm 0.12	0.75 \pm 0.13
UGN 0.06 μM HS 2%		0.82 \pm 0.13	0.79 \pm 0.02	1.05 \pm 0.08*	1.16 \pm 0.07*
UGN 0.6 μM normal water		0.69 \pm 0.02	0.64 \pm 0.02	0.86 \pm 0.06	0.7 \pm 0.02
UGN 0.6 μM HS 2%		0.71 \pm 0.09	0.84 \pm 0.13*	1.61 \pm 0.21**	1.35 \pm 0.25**

Results are expressed as means \pm SEM. There were 9 control kidneys and 6 uroguanylin-treated kidneys for each data point. In all the other treatments there were 6 kidneys for each group. Data were measured at 10-min intervals for calculations. Sampling was made at 10-min intervals and averaged at every 30-min period. GFR and PP are glomerular filtration rate and perfusion pressure, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (compared with the 30-min internal control, ANOVA followed by Dunnett).

further increased from 19.03 ± 2.87 to 37.56 ± 6.99 ; 58.67 ± 6.0 and 64.97 ± 4.65 , respectively (Fig. 4B). Similarly, the kaliuretic effect of uroguanylin was higher in kidneys isolated from HS2%-treated rats when compared to normal water-treated rats (Fig. 4C).

Mean perfusion pressures and glomerular filtration rates for each group were not significantly different during the perfusion periods (Table 2) with the exception of perfusion pressure at the 120 min point in the animals infused with 0.06 μM uroguanylin and maintained on a HS2% salt intake, though not different from the control normal water (120.6 ± 3.71 mmHg vs. 121.8 ± 3.62 mmHg). The same pattern was found for the kidney perfusion with 0.6 μM UGN in both control and HS2% groups, with significant diuresis and saluresis independent of perfusion pressure alterations (Table 2).

The kidney expression of GC-A and GC-C receptors was evaluated by Real Time PCR. The relative expression of both target genes of normal water-treated rats and from rats treated with either 1% NaCl (HS1%) or 2% NaCl (HS2%) was compared. Table 3 shows the threshold cycles (C_T) obtained for each group and the calculated ratio corresponding to the level of expression of both target genes related to the expression of the housekeeping gene. Fig. 5A, 5B and 5C demonstrate the amplification products of all genes tested showing the primer specificities of each reaction compared to a tissue considered as positive control. All primer efficiencies were in the range of 95% to 105%. The negative controls did not show any amplification. The data demonstrated a slight downregulation of the GC-A receptor after both HS1% and HS2% treatments. However, we found a very expressive upregulation of the GC-C receptor, especially after the 2% NaCl treatment (Table 3).

4. Discussion

Rats that have not been salt loaded require at least 0.19 μM uroguanylin in the perfusate to affect natriuresis [16]. In the present study, we aimed to test whether kidneys isolated from rats maintained on a high oral salt load were sensitized to a subthreshold concentration of uroguanylin. This subthreshold dose (0.06 μM uroguanylin) elicited diuresis, natriuresis, kaliuresis and an increase in urinary cGMP only in kidneys isolated from rats maintained on HS2% for 10 days, but not in kidneys from rats drinking normal water. Our findings suggest that prolonged salt ingestion enhances renal responses to uroguanylin and increased urinary levels of cGMP. Prolonged oral salt intake of HS2% also resulted in maintained high level of urinary cGMP (throughout the experimental period). The HS1% also had higher levels in all periods suggesting that increased salt intake activates a cGMP signal transduction pathway.

Table 3

Tissues expression of GC-A and GC-C receptors after 10 days of drinking water with 1%, 2% NaCl or a normal water treatment.

Sample groups	C_T values 18S rRNA	C_T values GC-A	C_T values GC-C	Ratio	
	(mean \pm SEM)	(mean \pm SEM)	(mean \pm SEM)	GC-A	GC-C
Kidney control	12.85 \pm 0.21	28.15 \pm 1.15	33.73 \pm 0.60	–	–
Kidney HS1%	12.46 \pm 1.02	28.00 \pm 1.78	25.70 \pm 2.70	0.86	255.41
Kidney HS2%	14.50 \pm 0.63	30.28 \pm 1.48	22.05 \pm 0.95	0.68	13,948.45
Small Intestine	15.44 \pm 0.25	–	29.45 \pm 0.28	–	124.43
Aorta	12.87 \pm 0.006	22.10 \pm 0.13	–	73.20	–

C_T = threshold cycle is defined as the fractional PCR cycle number at which the fluorescence reaches 10 times the baseline standard deviation. The relative expression ratio is calculated based in the method described by Pfaffl [32]. Data were obtained from 4 animals at each group and each sample was tested in duplicates. GC-A and GC-C ratios for small intestine and aorta show how both tissues express these receptors as related to the kidney.

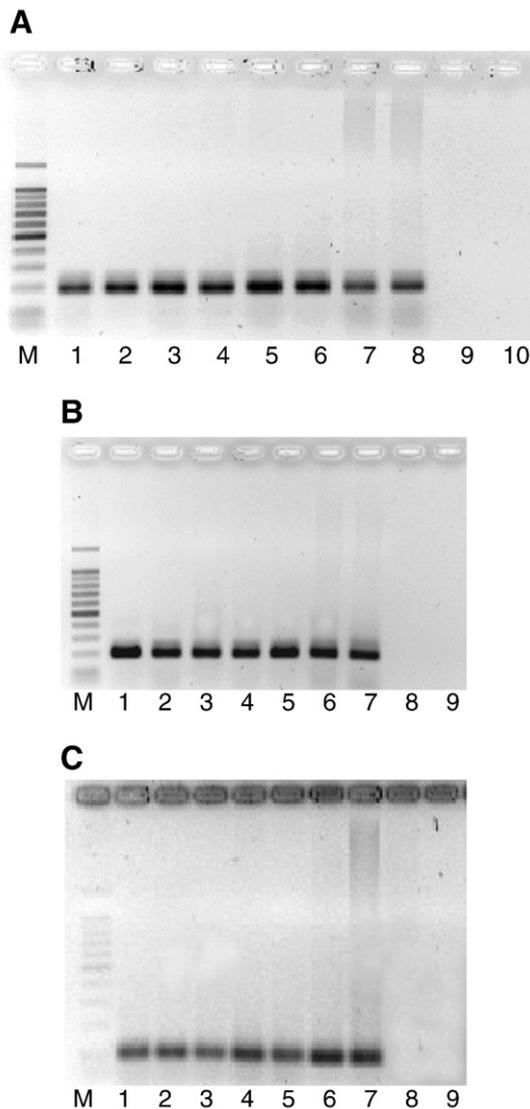


Fig. 5. Real time PCR products of 18S rRNA after 30cycles (A), GC-A receptor after 40cycles (B) or GC-C receptor (C) gene after 35cycles. The products run into an agarose gel (2%) stained with ethidium bromide. M—molecular marker (100 bp); (A) 1 - small intestine; 2 - aorta; 3 and 4 - controls; 5 and 6 - HS1%; 7 and 8 - HS2%; 9 - RT minus; 10 - qPCR minus (B) 1 - aorta; 2 and 3 - controls; 4 and 5 - HS1%; 6 and 7 - HS2%; 8 - RT minus; 9 - qPCR minus and (C) 1 - small intestine; 2 and 3 - controls; 4 and 5 - HS1%; 6 and 7 - HS2%; 8 - RT minus; 9 - qPCR minus.

There were no hemodynamic alterations in the perfused kidneys suggesting that the diuresis, natriuresis, kaliuresis, and chloruresis were not related to arterial pressure changes or glomerular filtration, but were most likely a tubular response to the perfusion of uroguanylin. That this represents a tubular response to the perfusion of uroguanylin and not a glomerular response was also validated by the significant increases in the fractional excretions of Na^+ , K^+ and Cl^- during the 0.06 μM uroguanylin perfusion periods (30 to 90min) when pressure was constant.

In regard to evidences of direct tubular effects of uroguanylin, Amorim and coworkers have recently reported, by using a stationary tubular microperfusion technique, that this peptide reduces bicarbonate reabsorption in proximal and distal tubules by a mechanism involving inhibition of Na^+/H^+ exchanger and H^+ -ATPase. In addition, it was also demonstrated that the kaliuretic effect of uroguanylin is partially dependent on maxi-K channel activation [33].

Recent reviews present arguments that link uroguanylin to an endocrine axis between the intestine and the kidney [3,7,34,35]. Some of the arguments include (a) the presence of uroguanylin in the intestinal cells; (b) the enhancement of its mRNA expression in these cells during high-salt diets; (c) the detection of the peptide and its propeptide form (i.e., prouroguanylin) in the circulation; (d) the increase of the circulating propeptide in volume expansion conditions associated with renal disease; (e) the presence of receptors for the peptide in the target organ, the kidney; and (f) the possibility of adjustments by the target organ to a variety of salt concentrations in the diet. This study now adds data that prolonged oral salt intake enhances the kidney's response to uroguanylin. The mechanism for this could be the upregulation of receptors for uroguanylin in the kidney during prolonged oral salt loading. Our results, presented herein, show that the mRNA levels of the GC-C receptors are greatly increased in the kidney of HS2% treated rats.

Recently, Fukae et al. showed that rats fed a high-salt diet have higher urine cGMP concentrations and increased amounts of uroguanylin in their urine. At the same time, they did not find that plasma uroguanylin levels were increased despite significantly enhanced uroguanylin expression in the small intestine and kidney [14]. Recent evidence shows however, that a plasma pool of proUGN secreted from the intestine is not cleaved in the active peptide in the intravascular space, but instead is converted to the active peptide intrarenally [18,19].

On the other hand, it has been shown that GC-C deficient mice still show renal effects induced by guanylin or uroguanylin [25]. In a recent review on the cellular effects of guanylin and uroguanylin, Sindic and Schlatter [35] proposed that these peptides may have at least three different receptors in the kidney, including GC-C, but the relative importance of these different pathways remains to be established, especially in the intact kidney, in the intact animal and in humans. Whatever the case, the increased response reported in the present paper may reflect an increased expression of GC-C receptors and/or the action of UGN on the cGMP independent sites. Nevertheless, the high cGMP levels attained in the urine of kidneys obtained from high-salt diet groups perfused with UGN and the expressive upregulation of the GC-C receptor may point out to a particular importance of the GC-C-cGMP pathway in the increased renal response to UGN. The results presented herein point to diuresis and natriuresis associated to increased urinary cGMP levels and are similar to the data reported by Kinoshita et al. [11] in humans on a high-salt diet and to the results obtained by Fukae et al. [14] for rats on a high-salt diet, which are also associated to increased urinary UGN levels.

High dietary salt load increases UGN mRNA levels in the intestine and kidney, causing both endocrine and paracrine/autocrine activity of UGN to participate to some extent in the regulation of sodium balance. It is important to note the fact that the enhanced *ex vivo* kidney sensitivity reported herein persists for hours after being removed from the animal body, and this phenomenon may have

physiological implications in the adaptation to high-salt loads. Potthast et al. have shown that high-salt intake (in mice) increases uroguanylin expression in the kidney and that renal tubular epithelium synthesis of uroguanylin occurs and is increased by exposure to hypertonic NaCl solutions [9]. Hence, there appears to be a complex but integrated pathway of physiological responses to oral salt loading, linking uroguanylin to the intestine and kidney and that adaptative responses within the kidney itself are also relevant.

Additionally, an interaction with ANP or even urodilatin could also explain the high urinary output shown in this report, but this remains to be tested.

There are conflicting reports concerning high-salt oral load and plasma ANP levels that should be taken into account. For example, one report showed that the plasma level of ANP was not altered in rats drinking 4% NaCl during 7 days [14] and that rats receiving 0.9% or 2% NaCl as drinking water, during a 10-day period, had no significant differences in atrial or plasma levels of ANP [36]. Furthermore, the same study showed that the levels of ANP receptor density and mRNA expression were decreased in the renal cortex in the 2% NaCl group, while this parameter was unaltered in the 0.9% NaCl group [36]. Similarly, Deloof and coworkers found that pregnant rats ingesting a high-salt diet presented high diuresis and natriuresis, that were not associated to increased ANP plasma levels and also with no alterations in both GC-A, GC-B or NPR-C receptor expression [37]. Another group, by using a genetic model (GC-A null mice) reported that the ANP receptor “appears to be dispensable for regulation of sodium/water excretion in response to changes in dietary sodium concentration, but likely becomes critical in volume expansions where the isoosmotic pressure remains constant” [38].

Our results, presented in the current investigation, demonstrated a slight downregulation of the GC-A receptor and a clear upregulation of the GC-C receptor and, therefore, the diuretic and natriuretic effects of uroguanylin at subthreshold concentration (0.06 μM), in HS2% kidneys and the increased response of an effective concentration (0.6 μM), in this group, may be related to an increased UGN–GC–cGMP signaling. Nevertheless, earlier studies have demonstrated increased plasma levels of ANP in rats submitted to high dietary salt loads [39,40]. The results presented herein may be associated to ANP or urodilatin since we have shown that those peptides and UGN have synergistic interactions [26], nevertheless, this hypothesis was not tested yet in animals fed high-salt diet.

Perfusion of the isolated rat kidney with 0.06 μM uroguanylin is close to the concentration that has been reported for circulating uroguanylin and prouroguanylin in rats with salt and fluid overload conditions [14,20]. Without this increased sensitivity to uroguanylin, as would be expected with a normal salt intake, renal responses to uroguanylin would be baseline and would not promote natriuresis or kaliuresis. In this regard, there is a recent report showing that uroguanylin, used in a concentration insufficient to induce natriuresis, is able to induce an increase in urinary sodium excretion and water during the sodium retention phase in nephrotic rats, but was unable to do so in normal rats. The authors also postulated that *the status of the sodium balance could influence the sensitivity of the kidney to uroguanylin* [41].

The increased response to uroguanylin shown herein may represent both increased sensitivity (i.e., the effect of the lower UGN concentration) and increased responsiveness (increased response to the higher concentration). This may represent an additional way to increase response, associated to increased synthesis and release of proUGN/UGN, since without such upregulation at the receptor level the renal response would reach the saturation point earlier.

The conditioning of the kidney by the high sodium intake shown herein persists throughout the time of perfusion and might reflect changes in an intrinsic renal mechanism. This increased renal sensitivity to uroguanylin after oral salt loading, may be a physiological response to both, enhance natriuresis after an oral salt load and a

natural regulatory mechanism to prevent salt wasting, when the body is not subject to increased oral salt diet.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Office of Research and Development, Medical Research Service, Department of Veterans Affairs, Lexington, KY (RNG) and by the Brazilian National Research Council (CNPq—Grant 486044/2007-6) and FUNCAP, Ceará (Brazil). We thank Silvia Helena Freire de França and Domingos Barreto for technical assistance and André Ferrer for discussing initial protocols.

References

- [1] Lennane RJ, Carey RM, Goodwin TJ, Peart WS. A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted man: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med* 1975;49:437–40.
- [2] Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, et al. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:947–51.
- [3] Forte Jr LR. Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacol Ther* 2004;104:137–62.
- [4] Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, et al. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10464–8.
- [5] Hughes JM, Murad F, Chang B, Guerrant RL. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature* 1978;271:755–6.
- [6] Lima AA, Monteiro HS, Fonteles MC. The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol Toxicol* 1992;70:163–7.
- [7] Forte Jr LR. Uroguanylin: physiological role as a natriuretic hormone. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:291–2.
- [8] Carrithers SL, Jackson BA, Cai WY, Greenberg RN, Ott CE. Site-specific effects of dietary salt intake on guanylin and uroguanylin mRNA expression in rat intestine. *Regul Pept* 2002;107:87–95.
- [9] Potthast R, Ehler E, Scheving LA, Sindic A, Schlatter E, Kuhn M. High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology* 2001;142:3087–97.
- [10] Kinoshita H, Fujimoto S, Fukae H, Yokota N, Hisanaga S, Nakazato M, et al. Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron* 1999;81:160–4.
- [11] Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Yokota N, Date Y, Yamaguchi H, et al. Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases. *Kidney Int* 1997;52:1028–34.
- [12] Kinoshita H, Nakazato M, Yamaguchi H, Matsukura S, Fujimoto S, Eto T. Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal function. *Clin Nephrol* 1997;47:28–32.
- [13] Nakazato M, Yamaguchi H, Kinoshita H, Kangawa K, Matsuo H, Chino N, et al. Identification of biologically active and inactive human uroguanylin in plasma and urine and their increases in renal insufficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:586–93.
- [14] Fukae H, Kinoshita H, Fujimoto S, Kita T, Nakazato M, Eto T. Changes in urinary levels and renal expression of uroguanylin on low or high salt diets in rats. *Nephron* 2002;92:373–8.
- [15] Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK, et al. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investig Med* 1997;45:276–82.
- [16] Fonteles MC, Greenberg RN, Monteiro HS, Currie MG, Forte LR. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1998;275:F191–7.
- [17] Lorenz JN, Nieman M, Sabo J, Sanford LP, Hawkins JA, Elitsur N, et al. Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. *J Clin Invest* 2003;112(8):1244–54.
- [18] Quian X, Moss NG, Fellner RC, Goy MF. Circulating prouroguanylin is processed to its active natriuretic form exclusively within the renal tubules. *Endocrinology* 2008;149:4499–509.
- [19] Moss NG, Fellner RC, Qian X, Yu SJ, Li Z, Nakazato M, et al. Uroguanylin, an intestinal natriuretic peptide, is delivered to the kidney as an unprocessed propeptide. *Endocrinology* 2008;149(9):4486–98.
- [20] Kikuchi M, Fujimoto S, Fukae H, Kinoshita H, Kita T, Nakazato M, et al. Role of uroguanylin, a peptide with natriuretic activity, in rats with experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:392–7.
- [21] Carrithers SL, Eber SL, Forte LR, Greenberg RN. Increased urinary excretion of uroguanylin in patients with congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H538–47.
- [22] Fukae H, Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Eto T. Plasma concentration of uroguanylin in patients on maintenance dialysis therapy. *Nephron* 2000;84:206–10.
- [23] Forte LR, London RM, Freeman RH, Krause WJ. Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F180–91.

- [24] Carrithers SL, Ott CE, Hill MJ, Johnson BR, Cai W, Chang JJ, et al. Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. *Kidney Int* 2004;65:40–53.
- [25] Sindić A, Schlatter E. Cellular effects of guanylin and uroguanylin. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:607–16.
- [26] Santos-Neto MS, Carvalho AF, Monteiro HS, Forte LR, Fonteles MC. Interaction of atrial natriuretic peptide, urodilatin, guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Regul Pept* 2006;136:14–22.
- [27] Bowman RH. Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J Biol Chem* 1970;245:1604–12.
- [28] Fonteles MC, Cohen JJ, Black AJ, Wertheim SJ. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am J Physiol* 1983;244:F235–46.
- [29] Martinez-Maldonado M, Opava-Stitzer S. Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea diuresis in the rat. *J Physiol* 1978;280:487–97.
- [30] Walser M, Davidson DG, Orloff J. The renal clearance of alkali-stable inulin. *J Clin Invest* 1955;34:1520–3.
- [31] Fonteles MC, Carrithers SL, Monteiro HS, Carvalho AF, Coelho GR, Greenberg RN, et al. Renal effects of serine-7 analog of lymphoguanylin in *ex vivo* rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F207–13.
- [32] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001 May 1;29(9):e45.
- [33] Amorim JB, Musa-Aziz R, Lessa LM, Malnic G, Fonteles MC. Effect of uroguanylin on potassium and bicarbonate transport in rat renal tubules. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84(10):1003–10.
- [34] Kuhn M. Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically modified mice. *Peptides* 2005;26:1078–85.
- [35] Sindić A, Schlatter E. Mechanisms of action of uroguanylin and guanylin and their role in salt handling. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3007–12.
- [36] Lee KS, Kim SY, Han JH, Kim YA, Cao C, Kim SZ, et al. Different responses of atrial natriuretic peptide secretion and its receptor density to salt intake in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229(1):65–71.
- [37] Deloof S, De Seze C, Montel V, Chatelain A. Atrial natriuretic peptide and aldosterone secretions, and atrial natriuretic peptide-binding sites in kidneys and adrenal glands of pregnant and fetal rats in late gestation in response to a high-salt diet. *Eur J Endocrinol* 2000;142:524–32.
- [38] Dubois SK, Kishimoto I, Lillis TO, Garbers DL. A genetic model defines the importance of the atrial natriuretic peptide receptor (guanylyl cyclase-A) in the regulation of kidney function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4369–73.
- [39] Hong M, Jin Y, Mai YQ, Han KK. The effects of salt-loading and dehydration on atrial natriuretic peptide (ANP) gene expression. *Comp Biochem Physiol B* 1990;97:205–8.
- [40] Gauquelin G, Garcia R, Carrier F, Cantin M, Gutkowska J, Thibault G, Schiffrin EL. Glomerular ANF receptor regulation during changes in sodium and water metabolism. *Am J Physiol* 1988;254:F51–5.
- [41] Baba A, Fujimoto S, Kikuchi M, Kita T, Kitamura K. Effects of uroguanylin on natriuresis in experimental nephrotic rats. *Nephrology (Carlton)* 2009;14(1):80–5.