

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANTONIO RAFAEL COELHO JORGE

**ESTUDO DOS EFEITOS DA ALTA INGESTÃO DE
CLORETO DE SÓDIO POR VIA ORAL SOBRE O
METABOLISMO DIÁRIO E FUNÇÃO RENAL DE
RATOS.**

Fortaleza

2009

ANTONIO RAFAEL COELHO JORGE

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 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
Mestre em Farmacologia.

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

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

FORTALEZA
2008

J71e Jorge, Antonio Rafael Coelho

Estudo dos efeitos da alta ingestão de cloreto de sódio por via oral sobre o metabolismo diário e função renal de ratos / Antonio Rafael Coelho Jorge . – Fortaleza, 2009.

108 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009

1. Fisiologia Humana 2. Cloreto de Sódio 3. Rim
4. GMP Cíclico 5. Metabolismo I. Monteiro, Helena Serra Azul (orient.) II. Título

ANTONIO RAFAEL COELHO JORGE

**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 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 grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 23 de Janeiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Orientadora

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
Co-orientador

Prof. Dr. Alexandre Havt
Membro da banca examinadora

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso que está sempre ao meu lado me guiando e me mostrando que nada é impossível.

Aos meus pais Margarida e Milton, que sempre me apóiam e me oferecem um porto seguro mesmo nas mais tenebrosas tempestades.

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

Ao Dr. Manassés Claudino Fonteles, por ter idealizado esse trabalho tão fascinante e ter depositado em mim a confiança de realizá-lo.

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

Aos meus amigos Renata de Sousa Alves e René Duarte que me receberam tão bem desde o primeiro dia que entrei no laboratório e me ensinaram as 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, Daniela Amora, Paulo César, Juliana, Ticiania, Claudênio, pela ajuda e amizade que me foram prestadas.

Aos alunos de Iniciação Científica Isadora, Diego, Neto, João Vítor, Ana Luiza, João Paulo, pela ajuda e apoio nos experimentos.

Aos funcionários do IBIMED José Amadeus, Silvia Helena, Domingos Barreto, Terezinha, Juciê, Bento, Charliene, Francisca 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!

Senhor, tu és o nosso refúgio, sempre,
de geração em geração.
Antes de nascerem os montes
e de criares a terra e o mundo,
de eternidade e eternidade tu és Deus.
Salmo 90

RESUMO

Guanilina (GN), uroguanilina (UGN) e a enterotoxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa) fazem parte de uma nova família de peptídeos que ativam a formação de cGMP. A ingestão de sal na dieta induz a secreção de GN e UGN no lúmen intestinal, inibindo a reabsorção de sódio e induzindo a secreção de Cl^- , HCO_3^- e água. Simultaneamente, esses hormônios estimulam a excreção renal de eletrólitos através da indução de natriurese, caliurese e diurese. Esse mecanismo altamente integrado permite a manutenção do sódio corporal, através da eliminação desse excesso de sódio pela urina. Entretanto, essa regulação fisiológica entre o intestino e o rim na tem sido muito bem estudada. O objetivo desse trabalho é estudar as alterações no metabolismo diário e na função renal de ratos submetidos a uma alta ingestão de cloreto de sódio. Os efeitos foram examinados usando ratos Wistar mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas. O grupo controle recebeu somente água destilada, enquanto que os grupos tratados receberam 1% e 2% de solução de NaCl. Foram analisadas diariamente o volume urinário, o peso corporal e o consumo de água e alimento. A função renal foi avaliada através da perfusão de rim isolado de ratos após dez dias de tratamento em gaiolas metabólicas, onde a perfusão foi realizada com solução de Krebs-Henseleit modificada com 6g% de albumina bovina. Os dados foram comparados através de teste *t* de Student e ANOVA, com significância $p < 0,05$. O peso dos ratos tratados com 2% de NaCl apresentou uma redução a partir do dia 8, em relação ao controle, enquanto que 1% não apresentou redução significativa. O volume urinário e o consumo de água apresentaram um aumento em ambos os tratamentos a partir do dia 2. O consumo de alimento ingerido não apresentou grandes variações entre os grupos. Em rim isolado de rato ambos os tratamentos aumentou a pressão de perfusão (PP). A resistência vascular renal (RVR), o fluxo urinário (FU), o ritmo de filtração glomerular (RFG) e o *clearance* osmolar (Cosm) aumentou no grupo de 1% comparado ao controle, porém esses mesmos parâmetros diminuíram no grupo de 2%. Em relação ao transporte de eletrólitos observa-se alteração somente no grupo de 2%, onde reduziu o transporte de sódio ($\% \text{TNa}^+$, $\% \text{pTNa}^+$), potássio ($\% \text{TK}^+$, $\% \text{pTK}^+$) e cloreto ($\% \text{TCl}^-$, $\% \text{pTCl}^-$). Esses resultados sugerem que a alta ingestão de NaCl na dieta promove significativa alterações no metabolismo diário e na função renal.

Palavras-chaves: guanilina, uroguanilina, NaCl, cGMP, gaiolas metabólicas, perfusão de rim isolado.

ABSTRACT

Guanylin (GN), uroguanylin (UGN), and the bacterial heat-stable enterotoxin (ST) peptides comprise a new family of cyclic guanosine 3'-5' monophosphate (cGMP)-regulating agonist. Ingestion of a salt meal induces secretion of GN and UGN into the intestinal lumen, where they inhibit Na^+ absorption and induces Cl^- , HCO_3^- , and water secretion. Simultaneously, these hormones stimulate renal electrolyte excretion by inducing natriuresis, kaliuresis, and diuresis. The highly integrated mechanism allows the organism to maintain sodium balance by eliminating excess NaCl in the urine. However, their physiological regulation within the kidney has not been studied. The aim of this study was showing changes on daily metabolism and renal function of rat under high sodium chloride ingestion. Its effects were examined using wistar rats maintained for ten days in metabolic cages. Control group received only water, two more groups received 1% and 2% solutions of sodium chloride. We daily analyzed urinary volume, weigh, and food and water consume. The renal function was evaluated using isolated perfused kidneys, in which the kidneys were perfused after ten days in metabolic cages, only with Krebs-Henseleit solution containing 6g% of a previously dialysed bovine albumine serum. All data were analyzed by ANOVA and Student *t*-test with level of significance set at $*p < 0,05$. Rat's weights of 2% group decreased after eighth day, compared with control group, while 1% group did not show significative weight lost. Urinary volume and water consume increased, in both treatments, from second day. Food consume did not show significative among groups. In isolated kidney both treatments increase perfusion pressure (PP). The renal vascular resistance (RVR), urinary flow (UF), glomerular filtration rate (GFR) and the osmolar *clearance* (Cosm) increased in the 1% group compared with control group, however decreased in 2% NaCl group. Treatment with 2% NaCl decreased the sodium (% TNa^+ , % pTNa^+), potassium (% TK^+ , % pTK^+) and chloride (% TCl^- , % pTCl^-). These results suggest that a high salt ingestion on diet promote significative changes on daily metabolism and the renal function of rats.

Key-words: guanylin, uroguanylin, NaCl, cGMP, metabolic cages, isolated perfused kidney.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Estrutura molecular da guanilato ciclase C (GC-C) na sua forma dimerizada. O ligante (L) corresponde a GN, UGN ou STa.....	31
FIGURA 2:	Mecanismo de sinalização celular do peptídeo GN e UGN em células de túbulo proximal renal. GN ativa duas vias de sinalização: GC-C e cGMP dependentes e ativada por proteína G sensível à toxina pertussis.....	34
FIGURA 3:	Foto do sistema de perfusão de rim isolado.....	44
FIGURA 4:	Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.....	45
FIGURA 5:	Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	46
FIGURA 6:	Valores registrados pelo fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6).....	46
FIGURA 7:	Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n=6).....	47
FIGURA 8:	Técnica cirúrgica. A - veia femoral; B - ureter direito canulado; C - artéria mesentérica; D - cânula arterial.....	49
FIGURA 9:	Medições diárias do peso de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).....	59
FIGURA 10:	Medições diárias do volume urinário de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).....	60
FIGURA 11:	Medições diárias do consumo de água de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).....	61

FIGURA 12:	Medições diárias do consumo de alimento de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).....	62
FIGURA 13:	Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	66
FIGURA 14:	Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	67
FIGURA 15:	Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	68
FIGURA 16:	Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	69
FIGURA 17:	Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	70
FIGURA 18:	Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	71
FIGURA 19:	Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	72
FIGURA 20:	Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	73
FIGURA 21:	Percentual de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	74

FIGURA 22:	Percentual de Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%pTCl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	75
FIGURA 23:	Excreção de Sódio (ENa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	76
FIGURA 24:	Excreção de Potássio (EK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	77
FIGURA 25:	Excreção de Cloreto (ECl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	78
FIGURA 26:	<i>Clearance</i> osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	79
FIGURA 27:	Curva da eficiência da amplificação do gene iniciador da cadeia 18S do RNA ribossômico (18S rRNA) utilizando cDNA sintetizado a partir 2 ug de RNA isolado de rim de rato com 4 diluições utilizando entre os pontos um fator intercalar de 5. C _T = números de ciclos necessários para a amplificação de cada diluição.....	82
FIGURA 27.1:	Curva da eficiência da amplificação do gene iniciador para o receptor de guanilato ciclase C (GC-A) utilizando cDNA sintetizado a partir 2 ug de RNA isolado de aorta de rato com 4 diluições utilizando entre os pontos um fator intercalar de 5. C _T = números de ciclos necessários para a amplificação de cada diluição.....	82
FIGURA 27.2:	Curva da eficiência da amplificação do gene iniciador para o receptor de guanilato ciclase C (GC-C) utilizando cDNA sintetizado a partir 2 ug de RNA isolado de intestino de rato com 4 diluições utilizando entre os pontos um fator intercalar de 5. C _T = números de ciclos necessários para a amplificação de cada diluição.....	83

FIGURA 28:	Determinação de GMPc urinário de ratos mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas, nos grupos controle e tratados (1% e 2% de NaCl).....	85
FIGURA 29:	Determinação de GMPc urinário de rins de ratos submetidos à perfusão renal após manutenção crônica de 10 dias em gaiola metabólica na ausência e presença de solução salina a 2%.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Isoformas da enzima guanilato ciclase.....	30
Tabela 2:	Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no peso de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	59
Tabela 3:	Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no volume urinário de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	60
Tabela 4:	Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no consumo de água de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	61
Tabela 5:	Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no alimento consumido de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	62
Tabela 6:	Pressão de Perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	66
Tabela 7:	Resistência Vascular Renal (RVR) em $\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas...	67
Tabela 8:	Fluxo Urinário (FU) em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	68
Tabela 9:	Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	69
Tabela 10:	Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	70
Tabela 11:	Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	71

Tabela 12:	Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	71
Tabela 13:	Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	73
Tabela 14:	Percentual de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pTK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	74
Tabela 15:	Percentual de Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%pTCl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	75
Tabela 16:	Excreção de Sódio (ENa ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	76
Tabela 17:	Excreção de Potássio (EK ⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	77
Tabela 18:	Excreção de Cloreto (ECl ⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	78
Tabela 19:	<i>Clearance</i> osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.....	79
Tabela 20:	Quantificação e qualidade do RNA total isolado dos rins de ratos Wistar tratados ou não em gaiola metabólica com solução salina de 1 ou 2%.....	80
Tabela 20.1:	Quantificação e qualidade do RNA total isolado dos rins de ratos Wistar tratados em gaiola metabólica com solução salina de 1 ou 2% seguidos de perfusão renal...	81

Tabela 21:	Valores da expressão relativa dos genes de GC-A e GC-C em referência a amplificação do gene 18S rRNA para animais tratados na presença ou ausência de solução salina de 1 e 2% em gaiola metabólica.....	84
Tabela 21.1:	Valores da expressão relativa dos genes de GC-A e GC-C em referência a amplificação do gene 18S rRNA para rins perfundidos após tratamento na presença ou ausência de solução salina de 1 e 2% em gaiola metabólica.....	84
Tabela 22:	Dosagem de GMPc (pmol/mL) em amostras de urina de ratos mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas, nos grupos controle e tratados (1% e 2% de NaCl). Os dados foram avaliados em três períodos: Inicial (dias 1-4), Intermediário (dias 5-7) e Final (8-10).....	85
Tabela 23:	Dosagem de GMPc (pmol/mL) em amostras controle e tratado com 2% de NaCl de urina de rins de ratos perfundidos após permanência por 10 dias em gaiolas metabólicas, nos grupos controle e tratado (2% de NaCl).....	86

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Regulação da excreção renal de Cloreto de Sódio (NaCl).....	21
1.2. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	22
1.3. Peptídeos Natriuréticos.....	23
1.4. Peptídeo Guanilina e Uroguanilina.....	25
1.5. Efeitos Gerais das Guanilinas.....	28
1.6. Receptores de Guanilato Ciclase.....	29
1.7. Mecanismos de ação dos peptídeos da família das guanilinas.....	32
1.8. Considerações Gerais.....	35
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo Geral.....	40
3.2. Objetivos Específicos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Animais de Experimentação.....	42
4.2. Avaliação do metabolismo diário.....	42
4.3. Grupos Experimentais.....	42

4.4. Perfusão de Rim Isolado.....	43
4.4.1. O Sistema de Perfusão.....	43
4.4.2. Calibração do Sistema.....	45
4.4.3. Solução Perfusora.....	47
4.4.4. Substâncias Utilizadas.....	48
4.4.5. Técnica Cirúrgica.....	48
4.4.6. Protocolo Experimental.....	50
4.4.7. Análises Bioquímicas	50
4.4.8. Cálculo dos parâmetros renais	51
4.5. Biologia Molecular.....	52
4.5.1. Isolamento de RNA.....	52
4.5.2. Síntese de cDNA pela reação de Transcriptase Reversa.....	52
4.5.3. Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real.....	53
4.6. Dosagem de GMPc.....	55
4.7. Análises Estatísticas.....	56
4.8. Comitê de Ética.....	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1. Avaliação do metabolismo diário.....	58
5.2. Perfusão de rim isolado.....	63
5.3. Biologia molecular e determinação de CMPc.....	80
5.3.1. Isolamento de RNA.....	80
5.3.2. Reação de PCR em Tempo Real.....	81
5.3.3. Determinação de cGMP.....	84
6. DISCUSSÃO.....	87

7. CONCLUSÕES.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXO	

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
%TCl - percentual de cloro tubular total transportado
%pTCl - percentual de cloro tubular proximal transportado
TCl – 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

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Regulação da excreção renal de Cloreto de Sódio (NaCl)

Sem água não há vida e sem NaCl não há volume celular (Forte & Fonteles, 2007). De maneira geral, os seres vivos podem ser descritos como uma solução aquosa, contendo eletrólitos, envolta por uma membrana, a superfície do corpo. O volume do organismo deve ser mantido dentro de limites bastante estreitos. O funcionamento fisiológico de um animal requer uma composição relativamente constante e bem definida de seus fluidos corpóreos e grandes alterações são geralmente incompatíveis com a vida (Schmidt-Nielsen, 2002).

Por milhares de anos os ancestrais evolucionários da espécie humana se alimentavam de uma dieta com baixas quantidades de sal, ingerindo valores inferiores a 1 g de sal por dia. Esses dados implicam que a espécie humana nos dias presentes é geneticamente programada para uma baixa ingestão de sal, já que a vida originou-se provavelmente no mar. Nos últimos anos devido à agricultura e a industrialização o consumo de sal passou para aproximadamente 10 g/dia ou mais (Blackburn *et al.*, 1983). Porém, mecanismos fisiológicos muito bem regulados, permitem que esse excesso de sal ingerido na dieta não seja retido no organismo.

Os órgãos excretores foram desenvolvidos para manterem as 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 do sódio incluem tanto sinais neurais como hormonais, dentre eles podemos citar a atividade nervosa simpática, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, o peptídeo natriurético atrial (Vander *et al.*, 2001) e a regulação induzida por outros hormônios como as guanilinas e uroguanilinas.

As fibras nervosas simpáticas inervam as arteríolas aferente e eferente dos glomérulos, assim como as diversas células dos néfrons. Quando há uma ingestão aumentada de sódio ocorre uma expansão de volume que é percebido pelos barorreceptores, reduzindo a atividade simpática no rim. O resultado final consiste na excreção aumentada de sódio. Contrariamente, quando há um balanço negativo de sódio, a atividade simpática no rim é aumentada (Greger, 2000).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O sistema renina-angiotensina-aldosterona exerce um papel fundamental na regulação do metabolismo renal de sódio e água através de uma variedade de vias fisiológicas (Kwon *et al.*, 2003). O produto final dessa via, a angiotensina II (ANG II), tem seus efeitos estabelecidos na regulação da hemodinâmica renal, taxa de filtração glomerular, secreção de aldosterona, além de seus efeitos diretos no túbulo proximal de células renais (Burns *et al.*, 1993).

A renina é sintetizada, armazenada e secretada em células granulares justaglomerulares que revestem a arteríola aferente (Greger, 2000). A secreção de renina pelo rim é controlada por diversos fatores, incluindo o sistema nervoso simpático, um barorreceptor intrarrenal e pela liberação de NaCl para a mácula densa (Lumbers, 1999). O aumento da atividade nervosa simpática, mediada pela ativação dos receptores β_1 -adrenérgicos estimula a liberação de renina. O outro mecanismo de controle de liberação de renina envolve um barorreceptor intrarenal, onde o aumento ou decréscimo na pressão dos vasos pré-glomerulares inibe ou estimula a liberação de renina, respectivamente (Carey, 1997). A mácula densa contém um receptor sensível a alteração na

taxa de suprimento de NaCl pelo túbulo distal, na qual um aumento na carga de NaCl inibe a secreção de renina e por outro lado induz a redução de NaCl que estimula sua secreção (Jackson, 2006).

O angiotensinogênio é o substrato glicoprotéico circulante, sintetizado predominantemente no fígado, cuja clivagem pela renina libera o decapeptídeo angiotensina I (Jackson, 2006). A angiotensina I apresenta pouca ou nenhuma atividade biológica, porém é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A enzima conversora é uma metaloprotease encontrada em ambas as formas solúvel e ligada à membrana, catalisa a clivagem de dipeptídios a partir da extremidade carboxi-terminal, liberando o octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor (Lumbers, 1999).

A angiotensina II é conhecida por sua ação vasoconstritora muito potente. Porém, a angiotensina II apresenta muitas outras funções fisiológicas importantes e uma delas é estimular a secreção de aldosterona, que reduz a excreção de NaCl estimulando sua reabsorção distal. A angiotensina II age diretamente no rim produzindo vasoconstrição renal, aumento da reabsorção tubular proximal de sódio e inibição da secreção de renina (Dina *et al.*, 2000).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é ativado quando ocorre a diminuição do volume, resultando na diminuição da excreção de NaCl pelos rins. Porém quando ocorre expansão de volume, esse sistema precisa ser inibido para que a excreção de NaCl seja intensificado, e assim o volume seja restabelecido ao seu normal (Berne *et al.*, 2004).

1.3 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, 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).

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 (Murthy *et al.*, 2000).

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).

A urodilatina é um peptídeo de 32 resíduos de aminoácidos que foi isolado em 1988 da urina humana por Schulz-Knappe e colaboradores. A urodilatina é sintetizada nos túbulos renais e pertence à família do peptídeo natriurético do tipo-A (ANP). A urodilatina assim como o ANP, liga-se ao receptor NPR-A localizado no túbulo renal e músculo liso vascular renal e sua ação consiste em aumentar a diurese, natriurese e uma considerável queda da pressão arterial. Outros efeitos desse peptídeo consistem na broncodilatação pulmonar e inibição da secreção de renina e aldosterona (Forssmann *et al.*, 2001).

Diversos outros peptídeos além dos natriuréticos são sintetizados no intuito de regular a excreção de sódio, havendo a participação não só do rim e do coração, mas também do sistema gastrointestinal e sistema nervoso central. Entre esses peptídeos podemos citar a uroguanilina, que participa do mecanismo renal que regula o transporte tubular de sódio e contribui para a natriurese induzida pela ingestão aumentada de sal na dieta (Meneton *et al.*, 2005).

1.4 Peptídeos Guanilina e Uroguanilina

Os peptídeos guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) são moléculas pequenas, termos-estáveis com 15 a 19 aminoácidos compondo sua estrutura. A descoberta das guanilinas é similar a dos opióides endógenos, pois os receptores para os agonistas exógenos foram identificados bem antes dos

peptídeos endógenos serem isolados e possuem sua estrutura molecular caracterizada (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. 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). Os peptídeos da família das guanilinas foram recentemente descobertos e muito de suas funções na homeostase do organismo ainda não foram 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 em 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. 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).

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).

Uroguanilina e guanilina apresentam em sua estrutura quatro cisteínas conservadas em cada domínio do peptídeo ativo. Pontes de dissulfeto são formadas entre a primeira e a terceira, e entre a segunda e quarta cisteínas em cada peptídeo (Figura 02). As pontes de dissulfeto são essenciais para a ação do peptídeo (Kita *et al.*, 1994). Os genes para a guanilina são localizados em humanos no cromossomo 1 (p33 ao p36) e em camundongos no cromossomo 4. Guanilina e uroguanilina humana são codificadas por diferentes genes, porém homólogos que consistem de três éxons e dois íntrons (Schulz, 1999). *E. coli* STa apresenta o mesmo par de pontes de dissulfeto da guanilina, porém a presença de uma terceira ponte de dissulfeto pode contribuir para sua maior potência na ativação do receptor intestinal de GCs comparado aos peptídeos GN e UGN.

Linfoguanilina apresenta em sua estrutura três cisteínas, possibilitando a formação de somente uma ponte de dissulfeto intramolecular. Um peptídeo de linfoguanilina contendo uma simples ponte de dissulfeto entre a primeira e terceira cisteína foi sintetizado e os resultados demonstraram a ativação de receptores GCs de células T84 intestinais e receptores OK-GC em células renais de gambá (Forte, et al. 1999).

Os peptídeos da família das guanilinas podem ser divididos em três subclasses distintas de acordo com o número de pontes de dissulfeto intramolecular. Em ordem de descoberta, classe 1 – peptídeos da *E. coli* STa contendo três pontes de dissulfeto, classe 2 – peptídeos GN e UGN com duas pontes de dissulfeto, classe 3 – peptídeo Linfoguanilina contendo uma simples ponte de dissulfeto (Forte et al., 2000).

1.5 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).

Guanilina 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 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 (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 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).

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.

1.6 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).

Os receptores de GC presentes na membrana plasmática são proteínas transmembranares que apresentam quatro principais regiões, consistindo de um domínio NH_2 terminal altamente variável que funciona como ligante dos peptídeos endógenos, uma região transmembranar, um domínio homólogo a quinase e a região catalítica altamente conservada localizada na região COOH terminal da proteína (Figura 04) (Krause et al., 1997).

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). A tabela 01 mostra as isoformas dos receptores GC, as suas distribuições e seus agonistas.

Tabela 01 – Isoformas da enzima guanilato ciclase.

Ciclase	Distribuição	Agonistas
GC-A	Músculo liso, rim, adrenal, coração, SNC	ANP, BNP
GC-B	Fibroblasto, coração, SNC	CNP
GC-C	Intestino, adrenal, SNC, pulmão, glândulas reprodutivas, rim	STa, GN, UGN
GC-D	Células olfatórias	Indeterminado
GC-E	Retina	Indeterminado
GC-F	Retina	Indeterminado
GC-G	Músculo esquelético, pulmão, intestino, rim	Indeterminado

Guanilato ciclase C é o principal receptor para a guanilina no intestino (Figura 01). 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).

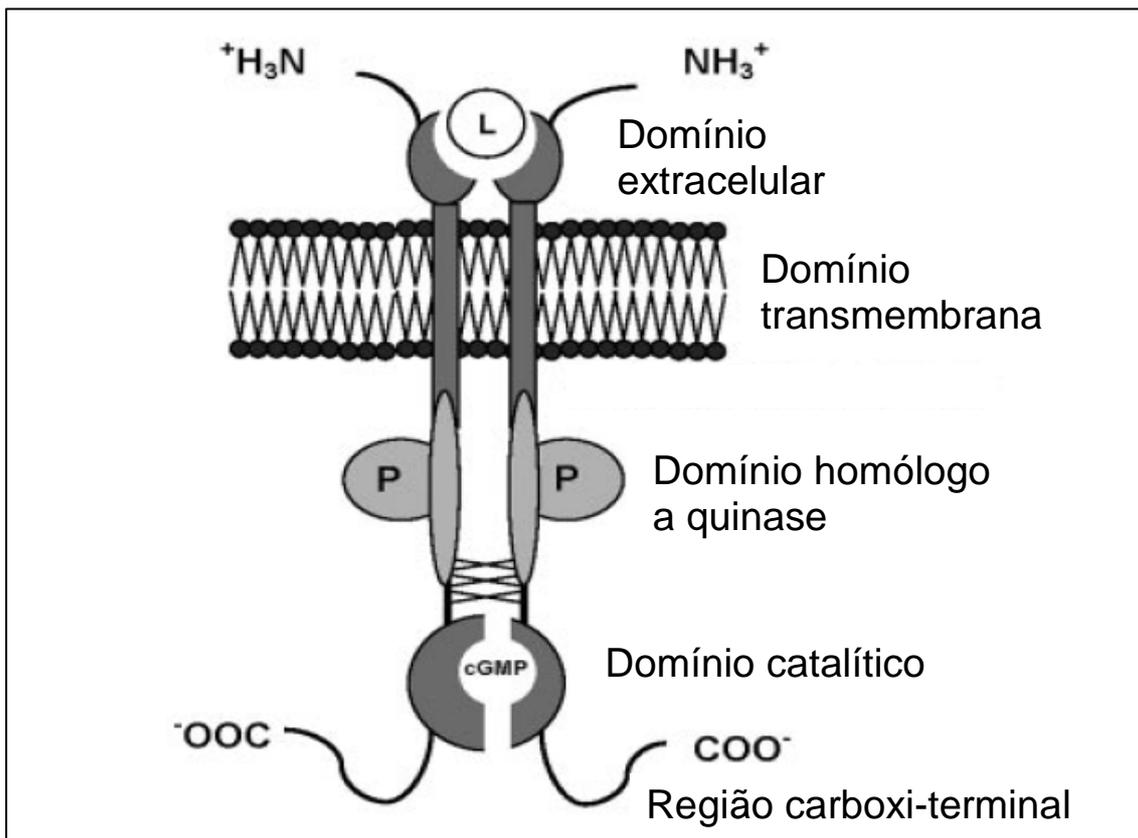


Figura 01 – Estrutura molecular da guanilato ciclase C (GC-C) na sua forma dimerizada. O ligante (L) corresponde a GN, UGN ou STa. Para detalhes, ver texto (Modificados de Sindic & Schlatter, 2006).

O estudo da distribuição do mRNA para o receptor de GC-C em néfron de ratos, demonstrou a sua expressão em maior quantidade em túbulos coletores corticais, seguindo uma ordem decrescente de expressão em túbulo proximal, ramo ascendente espesso da alça de Henle, ducto coletor e ramo delgado da alça de Henle. O mesmo estudo também mostrou que o mRNA para GN e UGN também é expresso em néfron de ratos, sugerindo então uma regulação endócrina intrarenal para GN e UGN (Carrithers et al., 2000).

Potthast et al. (2001) localizaram GC-C em rim de camundongos somente no glomérulo e túbulo proximal, enquanto que o estudo com rim de humanos detectou a expressão de mRNA para GC-C somente na região cortical, especificamente no túbulo proximal (Sindic et al., 2005). Esses achados sugerem diferenças na distribuição renal para o receptor de GC-C em diferentes espécies.

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 teleosteos 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).

1.7 Mecanismos de ação dos peptídeos da família das guanilinas

O estudo com linhagem de células de túbulo proximal de humanos, IHKE-1, demonstram que os peptídeos da família da guanilinas podem desencadear duas diferentes respostas biológicas. GN, UGN e STa inibem a condutância ao potássio via ativação da GC-C e aumento do cGMP celular. Um segundo receptor seria ativado por UGN, por uma via independente de cGMP. Esse receptor ainda não foi determinado, mas sabe-se que ele é acoplado a

proteína G sensível à toxina pertussis (PT), levando a hiperpolarização celular e ativação da condutância ao K^+ (Figura 05). Mudanças na condutância para o K^+ influenciam na força propulsora e o transporte através do túbulo proximal é direcionado para a sua excreção. O primeiro receptor GC-C apresenta maior afinidade para GN e STa, enquanto que o segundo, independente de cGMP, se liga com mais afinidade a UGN (Sindice et al., 2002).

Estudos com cultura de células de túbulo proximal sugerem que GN inibe a reabsorção de Na^+ em diferentes segmentos do néfron. UGN diminui a expressão da Na^+/K^+ -ATPase, que diminui o gradiente de concentração para Na^+ e conseqüentemente reduz o transporte de Na^+ e aumenta a sua excreção para o lúmen tubular (Carrithers et al., 1999). Além disso, como citado anteriormente, GN diminui a força propulsora elétrica para a reabsorção do Na^+ por inibir os canais de K^+ via cGMP, com conseqüente despolarização celular (Figura 02). Outro mecanismo de ação da GN e UGN consiste na inibição do antiporte Na^+/H^+ pelo aumento do cGMP, promovendo assim a redução na reabsorção de Na^+ e água no túbulo proximal (Sindice et al., 2002).

Proteínas isoladas da membrana de células intestinais também apresentam afinidade para GN e UGN, sendo outros possíveis receptores envolvidos nesse mecanismo de regulação de sódio. A concentração de cGMP intracelular influencia a secreção transepitelial de Cl^- e HCO_3^- no intestino pela interação com proteína quinase II dependente de cGMP (PKG II) ou proteína quinase II dependente de cAMP (PKA II), que servem como receptores para GN e UGN (Vaandrager et al., 1998). Camundongos “knockout” para o gene que codifica PKG II resulta na inibição da secreção de fluidos em resposta a STa in vivo e um decréscimo na secreção de eletrólitos in vitro (Pfeifer et al., 1996).

A proteína reguladora da condução transmembrana da fibrose cística (CFTR) exerce um importante papel nas respostas celulares induzidas por GN e UGN. A CFTR é um membro da família das proteínas ABC que transportam pequenas moléculas através da membrana celular em uma via dependente de ATP. A CFTR também funciona como canais para a secreção de Cl^- e HCO_3^-

para o lúmen intestinal. Mutações do gene para CFTR resulta em perda da proteína ou modificação de sua atividade, produzindo a doença genética fibrose cística (Joo et al., 1998). CFTR também é expressa em células renais, produzindo como principais efeitos diurese, natriurese e caliurese em respostas a UGN e STa (Morales et al., 1996).

A provável sinalização celular envolve a alteração da concentração intracelular de cGMP com ativação da PKG II e/ou PKA II para fosforilação da CFTR, com conseqüentes alterações na transporte de Cl^- e/ou Na^+ em células tubulares renais que são alvos da GN e UGN (Forte et al., 2000).

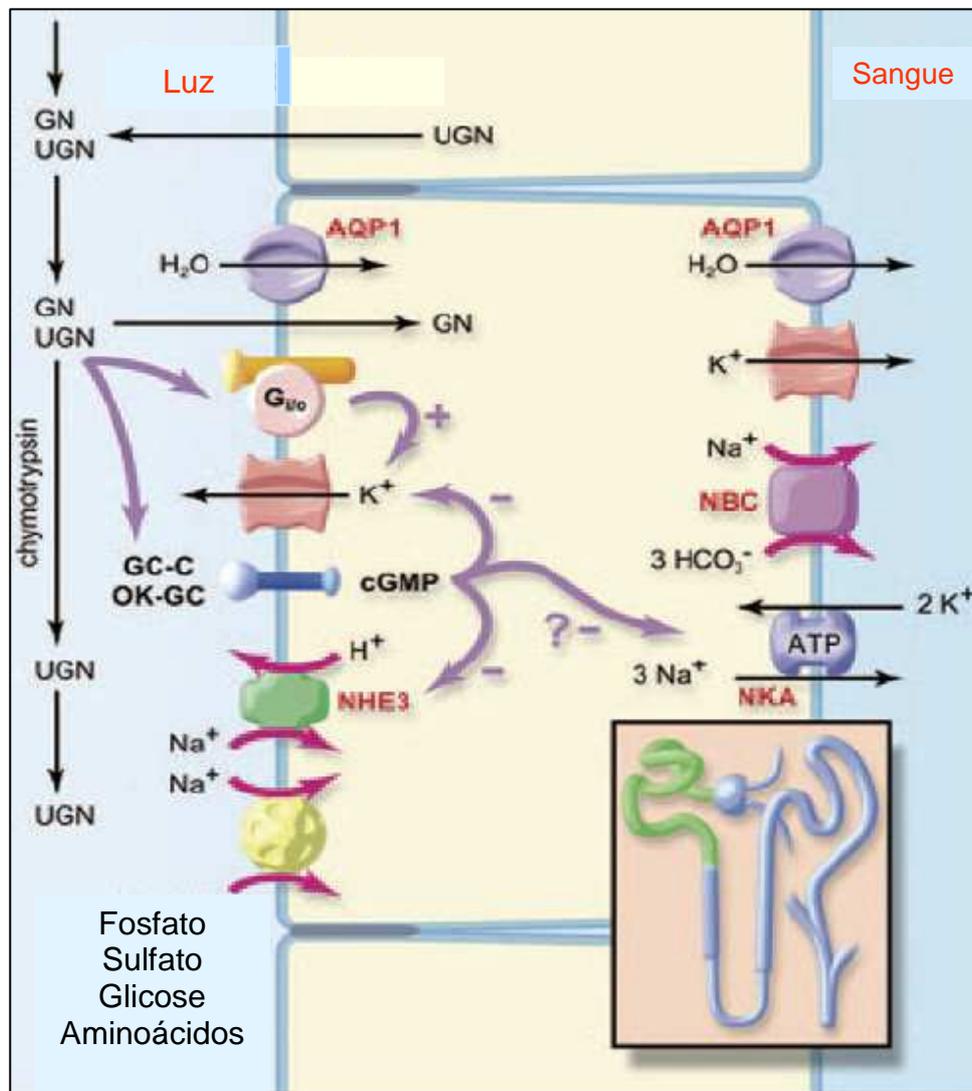


Figura 02 – Mecanismo de sinalização celular do peptídeo GN e UGN em células de túbulo proximal renal. GN ativa duas vias de sinalização: GC-C e

cGMP dependentes e ativada por proteína G sensível à toxina pertussis. Para detalhes, ver texto (Modificados de Sindic & Schlatter, 2006).

Em células principais do ducto coletor UGN inibe os canais de potássio (ROMK) por um mecanismo dependente de fosfolipase A_2 e ácido araquidônico, inibindo a secreção de K^+ ao mesmo tempo reduzindo a força propulsora para a reabsorção de Na^+ , resultando em natriurese (Michell et al., 2008). Estudos com camundongos “knockout” para GC-C com UGN mostraram o aumento da excreção urinária de cGMP, sugerindo a ativação de outros receptores GCs, um possível candidato seria o receptor órfão GC-G (Sindic et al., 2006).

1.8 Considerações Gerais

Uroguanilina é o principal candidato a fator natriurético intestinal, pois a sua liberação no intestino, após uma ingestão oral de NaCl, apresentam respostas natriuréticas muito mais pronunciadas do que o sal administrado por via intravenosa (Drummer *et al.*, 1996). A via endócrina que envolve a liberação do peptídeo uroguanilina na circulação sanguínea pelo trato gastrintestinal está relacionada ao controle de sódio corporal, sendo esse peptídeo o principal mediador responsável pela interação direta entre sistema digestivo e renal (Saville *et al.*, 1988).

O aumento da excreção urinária de sal e água após uma refeição é influenciado por diversos fatores, dentre eles podemos citar os peptídeos da família das guanilinas, os peptídeos natriuréticos e o óxido nítrico (NO) produzido pelo próprio rim. O mecanismo de ação desses mediadores ainda não foi completamente elucidado, mas sabe-se que guanilinas e peptídeos natriuréticos regulam a função celular através da ativação de receptores de guanilato ciclase (GC) de membrana, enquanto o NO ativa GC citosólico (Forte *et al.*, 2000). Esses achados demonstram a importância do cGMP como um sinalizador fundamental na regulação da excreção de sal e água no rim em estado pós-prandial.

Estudos citados anteriormente demonstram a existência de diversos receptores GC sem a identificação de seus agonistas, sendo denominados de receptores órfãos. O conhecimento dos agonistas e o mecanismo de ação envolvido na sua regulação serão importantes na compreensão das ações fisiológicas desses peptídeos, principalmente na função renal.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

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), a urodilatina, a guanilina e a uroguanilina têm sido implicados na regulação da homeostase de sal e água. Essas substâncias têm afinidade por receptores de membrana, cujas mensagens são 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. Os processos envolvidos são complexos e ainda não foram completamente esclarecidos, 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.

O estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação do NaCl ingerido por via oral, através da sinalização intestino-rim via peptídeo guanilina, constitui uma via importante na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos. Os estudos *in vivo* com ratos em gaiolas metabólicas submetidos à ingestão de NaCl, permitem estudar as alterações promovidas no metabolismo diário e na fisiologia renal desses animais. A proposta deste estudo consiste em avaliar as alterações induzidas pelo NaCl tanto no metabolismo diário de ratos mantidos em gaiolas metabólicas, como na função renal, no intuito de tentar compreender o mecanismo de sinalização após uma alta ingestão de sal.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as alterações produzidas tanto na excreção renal de sódio e água assim como a função renal de ratos submetidos a uma alta ingestão crônica de NaCl.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as alterações metabólicas de ratos submetidos à ingestão de 1% e 2% de NaCl por um período de 10 dias em gaiolas metabólicas;
- Estudar as alterações renais causados pela ingestão de 1% e 2% de NaCl, através do método de perfusão de rim isolado;
- Estudar a excreção urinária de GMPc de urinas obtidas de gaiolas metabólicas e de rim perfundido após tratamento crônico de NaCl;
- Investigar a expressão dos genes GC-A e GC-C em ratos submetidos ao tratamento crônico de NaCl.

MATERIAL E MÉTODOS

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 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DIÁRIO

Para avaliação do metabolismo diário, 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 de sal (NaCl) na água de beber nas concentrações de 1% e 2% de NaCl. Animais controle receberam água destilada. 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. A urina era coletada em béquer de plástico com funil e peneira para evitar a evaporação e resíduos de ração e fezes. No dia seguinte, era pesado o que sobrou da ração fornecida e anotado o volume restante de água e a quantidade de urina presente no béquer coletor. Além disso, o peso corpóreo dos ratos era medido diariamente. Este procedimento foi repetido durante 10 dias consecutivos mantendo sempre o mesmo horário de avaliação.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

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.

Grupos Tratados: Ratos (n=6) para cada concentração mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas com ingestão de solução com 1% e 2% de NaCl.

4.4 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

4.4.1 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 03). 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 04):

- 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 (5 μ m): 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: Retira 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 03 - Foto do sistema de perfusão de rim isolado (LFAVET-UFC)

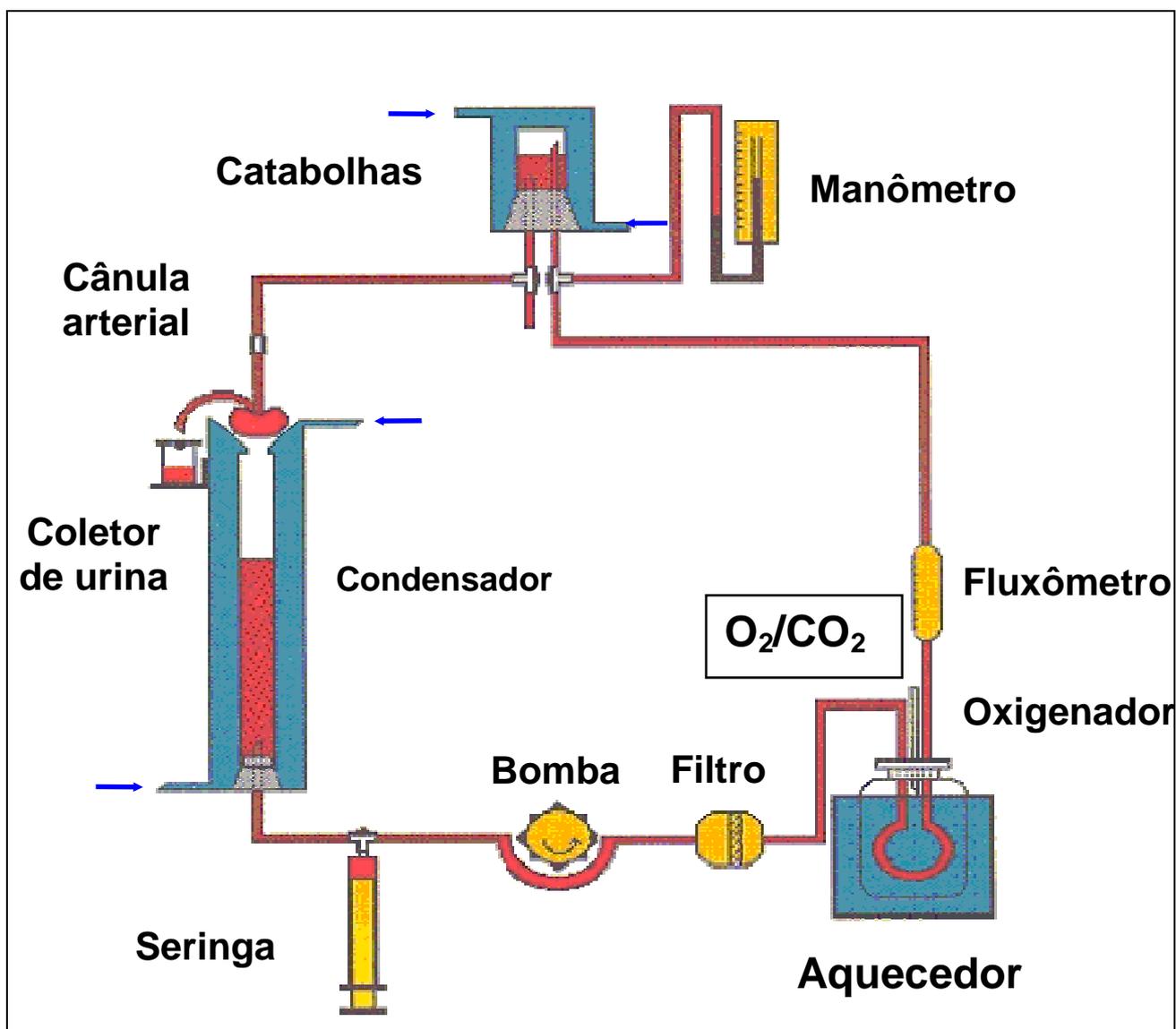


Figura 04 – Representação esquemática do sistema de perfusão de rim isolado.

4.4.2 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 05; 06 e 07).

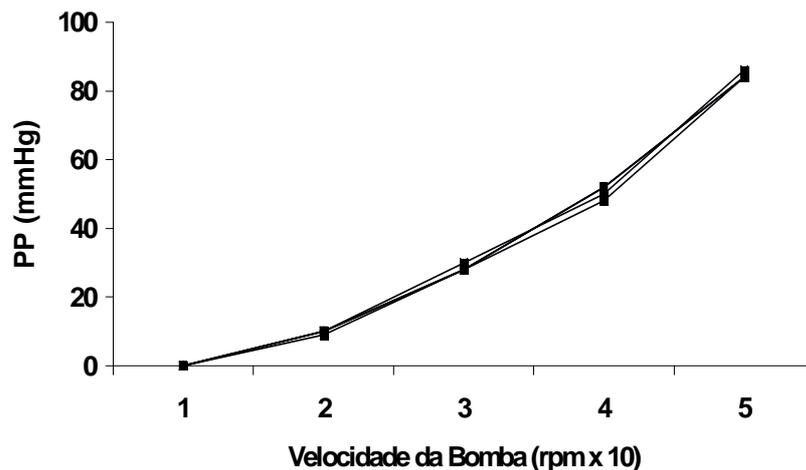


Figura 05 – Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).

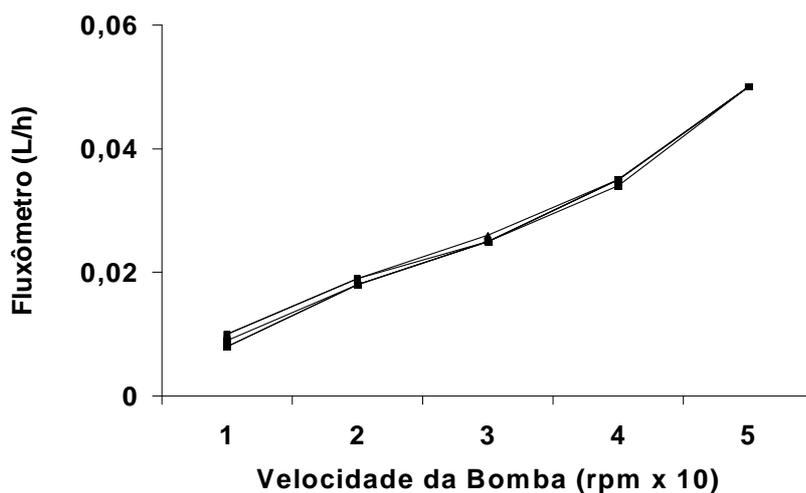


Figura 06 – Valores registrados pelo fluxômetro (L/h) durante a calibração do sistema (n=6).

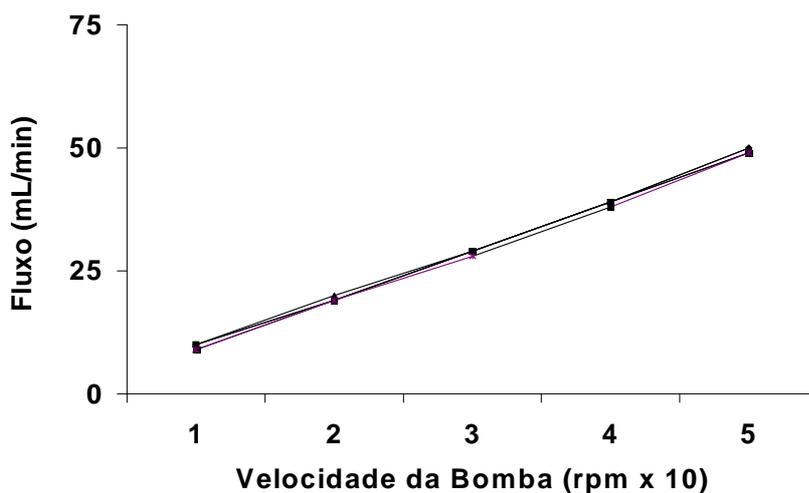


Figura 07 – Valores de volume urinário (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n=6).

4.4.3 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5,8g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e 10g de Uréia. Quarenta e oito horas antes dos experimentos, 100mL desta solução foi separada e acrescida de 4,2 g de NaHCO_3 , 0,74g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 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.

4.4.4 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)

4.4.5 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 sangüíneo para o rim. 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.

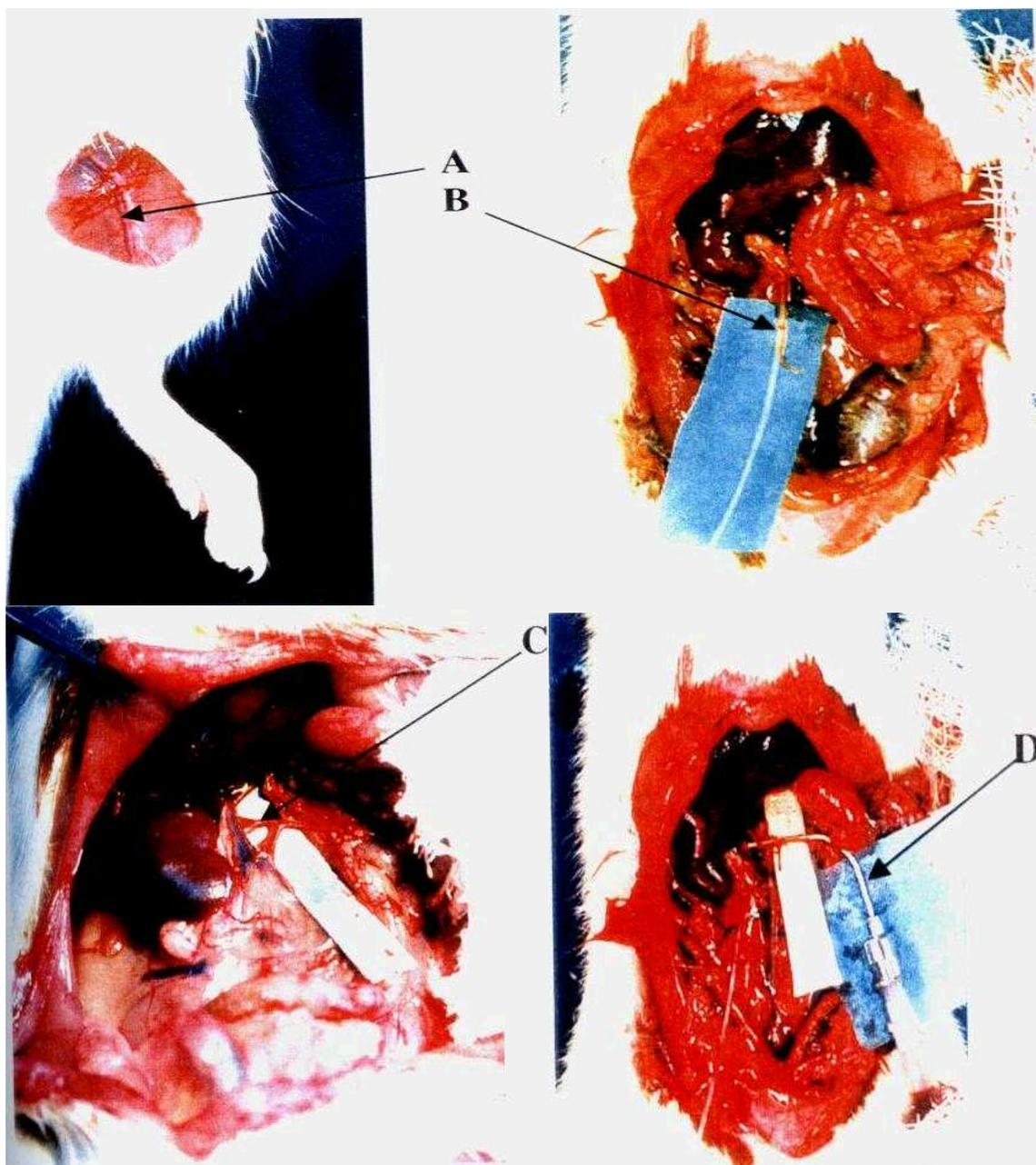


Figura 08 - Técnica cirúrgica. A - veia femoral; B - ureter direito canulado; C - artéria mesentérica; D - cânula arterial.

4.4.6 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.

Os grupos controle passaram pelo mesmo processo de adaptação, porém tiveram sua pressão de perfusão controlada para que se mantivesse fixa durante os 120 minutos de duração do experimento.

4.4.7 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 e potássio foi realizada pelo método de fotometria de chama (Flame photometer - modelo 4431L). As dosagens de cloro foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. 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.

4.4.8 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.

4.5 Biologia Molecular

4.5.1 Isolamento de RNA

Rins de ratos Wistar, mantidos em gaiolas metabólicas por 10 dias ingerindo ou não uma solução salina a 1 e 2% foram excisados ao término do período observacional e submetidos ao isolamento de RNA pelo método descrito para o *Trizol Reagent* (Invitrogen). Este método 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.

4.5.2 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).

4.5.3 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 (soluções salinas de 1 e 2%) 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, um a 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.

4.6 Dosagem de GMPc

A Guanidina 3'-5'-monofosfato cíclica (GMPc) foi descoberta em 1963 (ASHMAN et al., 1963) e está envolvida em inúmeros processos biológicos, como o efeito natriurético. Alguns hormônios, como acetilcolina, inulina e ocitocina, além de serotonina e histamina aumentam a concentração de GMPc. Peptídeos, como o Peptídeo Atrial Natriurético, que relaxam o músculo liso vascular também são responsáveis por elevação de GMPc.

As urinas provenientes dos rins isolados de rato foram utilizadas para determinação GMPc, sendo previamente diluídas (1:50) no tampão do Kit segundo as recomendações do fabricante (Sigma).

O Kit utilizado foi imunensaio competitivo em microplacas de 96 poços, para a determinação quantitativa de GMPc. A dosagem consistiu na utilização de um anticorpo policlonal que se liga ao GMPc ou a fosfatase alcalina complexada ao GMPc (complexo presente no Kit) de maneira competitiva. As amostras ou padrões foram, então, incubados a temperatura ambiente e, em seguida, adicionado um substrato para a enzima fosfatase alcalina. Após um breve período de incubação a reação foi parada com solução “stop” e a cor amarela formada foi lida em 405nm.

A intensidade da cor formada foi inversamente proporcional a concentração do GMPc nas amostras. Os resultados foram calculados a partir

da curva padrão dos controles e expressos em pmol/mL/g, compilados em intervalos de 30 minutos.

4.7 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%.

4.8 Comitê de Ética

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

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DIÁRIO

Com este estudo foi observado uma redução do peso corporal dos animais tratados com NaCl quando comparados ao grupo controle (Figura 09). Observa-se que no grupo controle não houve alteração do peso ao longo dos 10 dias de tratamento (Dia 1: 308,8g \pm 8,0; Dia 10: 302g \pm 11,6). O grupo que recebeu solução de 1% de NaCl apresentou redução do peso do dia 2 ao 6 quando comparado ao controle, com posterior recuperação (controle – Dia 1: 300,8 \pm 8,0; Dia 6: 304,4 \pm 8,4; Dia 10: 302 \pm 11,6) (1% - Dia 1: 284,6g \pm 8,9; Dia 6: 277 \pm 11,8; Dia 10: 297g \pm 8,7). No entanto, o animais submetidos a uma ingestão de 2% de NaCl apresentaram uma redução considerável do peso ao longo do tratamento (Dia 1: 289,8g \pm 3,9; Dia 6: 256,6 \pm 5,8*; Dia 10: 251g \pm 10,0*). Para maiores detalhes ver Tabela 02.

Em relação ao volume urinário observa-se um aumento entre os grupos tratados com NaCl, principalmente com o grupo submetido a ingestão de 2% de NaCl (Figura 10). Os resultados mostram que no dia 1 de experimento os animais não apresentaram diferença estatística para o volume urinário (C: 3,48mL \pm 0,86; NaCl 1%: 4,55mL \pm 1,29; NaCl 2%: 3,9mL \pm 0,71), porém a partir do segundo dia houve um aumento do volume urinário nos grupos tratados com sal. Este acréscimo foi bem mais pronunciado no grupo de 2% de NaCl (Tabela 03).

O consumo de água aumentou proporcional ao aumento da concentração de NaCl presente na dieta desses animais, com maior significância estatística para o grupo de 2% de NaCl (Figura 11). O consumo de alimento apresentou-se bastante variável, porém observa-se uma redução nos dois tratamentos (Figura 12) (Tabela 05).

Tabela 02 – Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no peso de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tratamento	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
Dia 1	300,8±8,0	284,6±8,9	289,8±3,9
Dia 2	301,4±7,4	280,6±10,7*	255,6±4,9*
Dia 3	303,4±7,1	285±8,9*	260,8±4,7*
Dia 4	306,8±7,5	280,4±8,4*	252,8±2,9*
Dia 5	305,4±8,1	276,8±8,7*	254,4±2,5*
Dia 6	304,4±8,4	277±11,8*	256,6±5,8*
Dia 7	301,8±9,3	283,8±9,4	262,8±7,1
Dia 8	301±9,8	289±8,9	260±6,8
Dia 9	301,2±10,8	290,4±9,5	255±9,2*
Daí 10	302±11,6	297±8,7	251±10,0*

Resultados expressos em Média ± EPM

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

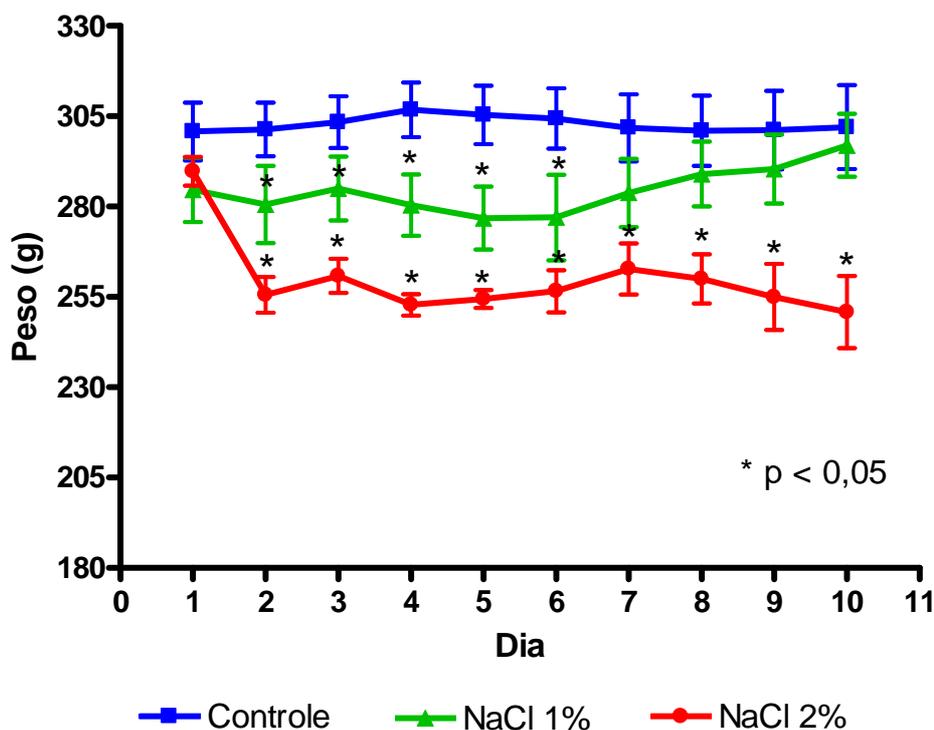


Figura 09 - Medições diárias do peso de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).

Tabela 03 – Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no volume urinário de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tratamento	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
Dia 1	3,48±0,86	4,55±1,29	3,9±0,71
Dia 2	2,90±0,73	17,5±3,52*	34,0±1,96*
Dia 3	2,88±0,64	14,0±1,60*	72,0±5,12*
Dia 4	1,40±0,31	14,3±1,76*	78,8±7,0*
Dia 5	1,00±0,05	14,8±1,71*	72,5±5,9*
Dia 6	2,40±0,54	15,05±1,65*	85,5±7,73*
Dia 7	2,93±0,70	22,43±4,59*	74,7±7,75*
Dia 8	3,20±0,92	17,1±1,66*	84,8±9,12*
Dia 9	3,77±0,64	24,8±5,02*	82,3±7,12*
Daí 10	4,05±0,6	23,0±5,32*	81,0±8,36*

Resultados expressos em Média ± EPM

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

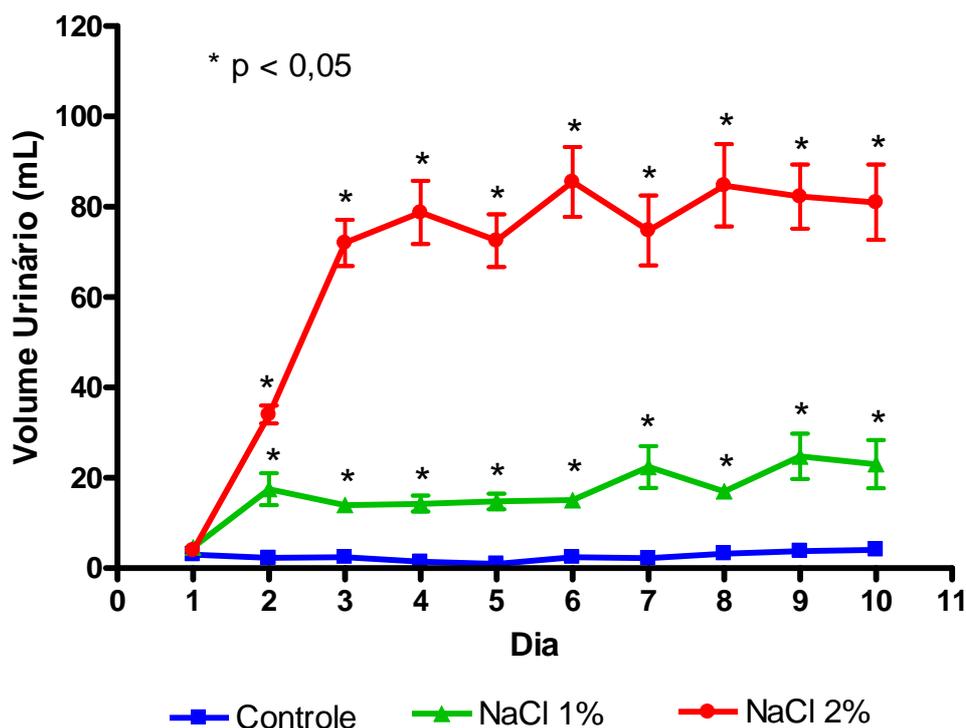


Figura 10 - Medições diárias do volume urinário de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).

Tabela 04 – Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no consumo de água de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tratamento	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
Dia 1	24,0±2,45	50,0±3,54*	53,4±1,89*
Dia 2	24,0±2,45	46,0±4,30*	96,4±1,86*
Dia 3	27,0±3,39	43,0±2,55*	103,4±12,9*
Dia 4	26,0±2,45	49,0±1,87*	106,6±4,12*
Dia 5	26,0±4,30	50,0±3,54*	87,0±6,34*
Dia 6	22,0±4,89	47,2±2,06*	102,6±3,87*
Dia 7	28,0±4,90	43,0±4,36*	117,2±10,2*
Dia 8	26,0±3,67	46,0±4,85*	102,4±4,96*
Dia 9	31,0±4,00	40,0±6,52	101,2±2,46*
Daí 10	32,0±3,39	42,0±4,64	125,6±10,2*

Resultados expressos em Média ± EPM

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

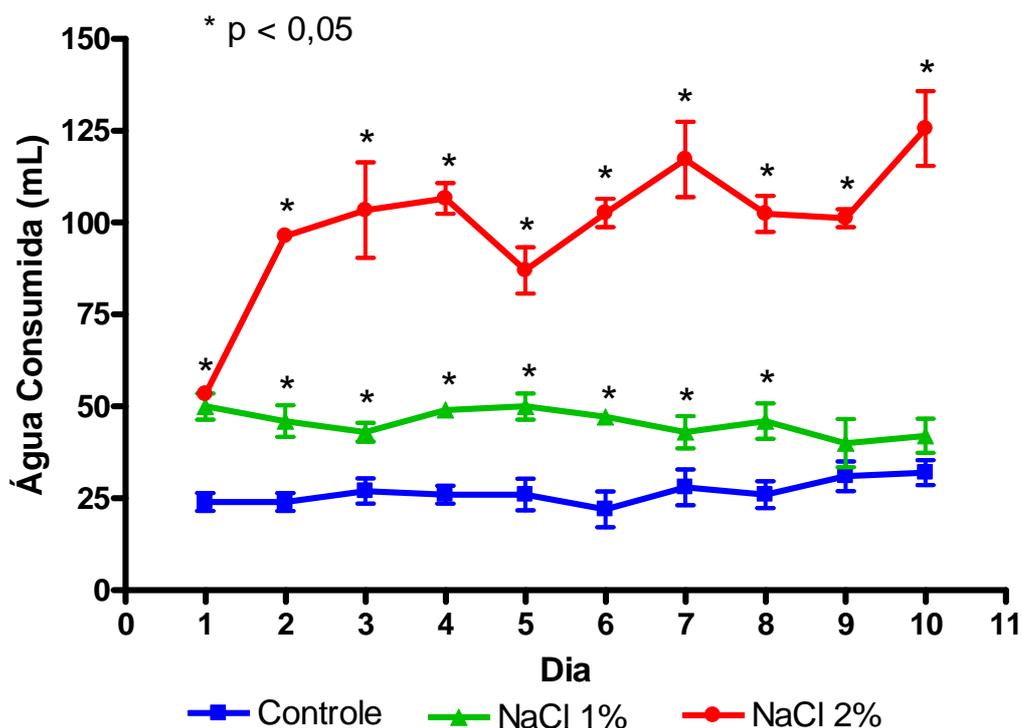


Figura 11 - Medições diárias do consumo de água de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).

Tabela 05 – Efeitos da ingestão de 1% e 2% de NaCl no alimento consumido de ratos tratados por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tratamento	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
Dia 1	24,0±1,50	24,0±1,95	22,4±0,60
Dia 2	30,6±2,86	20,8±1,46*	16,8±0,86*
Dia 3	18,4±2,06	21,2±1,71	17,6±2,21
Dia 4	23,8±1,91	21,0±0,95	13,8±2,71*
Dia 5	14,6±0,87	21,4±2,04*	16,8±1,39
Dia 6	10,2±0,49	19,8±1,11*	14,6±1,44*
Dia 7	15,6±1,47	20,6±1,08*	22,0±1,70*
Dia 8	13,0±1,52	25,4±2,32*	20,4±1,25*
Dia 9	21,0±1,09	18,8±2,86	21,0±1,58
Daí 10	18,6±1,54	18,6±0,93	20,8±1,16

Resultados expressos em Média ± EPM

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

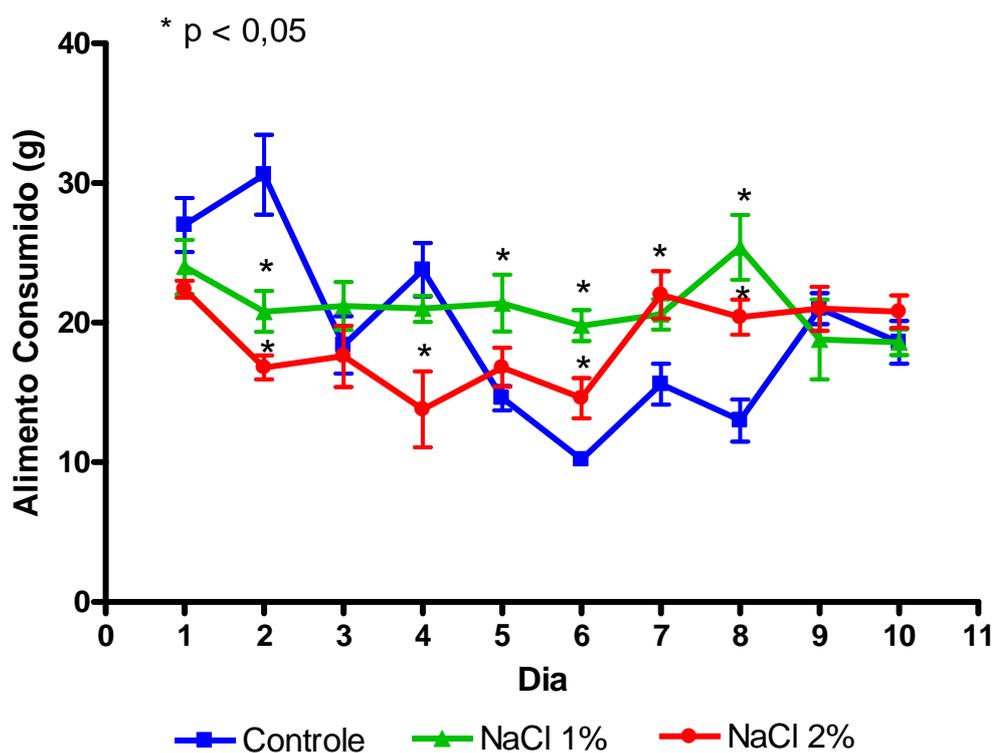


Figura 12 - Medições diárias do consumo de alimento de ratos submetidos a uma ingestão diária de solução de 1% e 2% de NaCl na água durante o período de 10 dias em gaiolas metabólicas (n=6).

5.2 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

Os resultados mostram que não há diferença na pressão de perfusão entre os grupos controle e salino (1 e 2% de NaCl), visto que a pressão foi mantida constante e igual em ambos os tratamentos durante todo o experimento (Tabela 06/Figura 13).

A resistência vascular renal não apresentou diferença significativa entre o grupo de 1% de NaCl e o controle. No grupo de 2% de NaCl a RVR mostrou uma redução significativa tanto em relação ao controle quanto ao grupo de 1% de NaCl, mantendo essa redução constante ao longo de todo o experimento (Tabela 07/Figura 14).

Observou-se que o fluxo urinário do grupo de 1% de NaCl não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Em relação ao grupo de 2% de NaCl houve uma redução significativa em relação ao controle somente aos 30 minutos, que é recuperada posteriormente. Nos tempos 60 e 90 minutos do grupo de 2% de NaCl observou-se uma redução significativa em relação ao tratamento de 1% de NaCl, evidenciando uma discreta redução do fluxo urinário no tratamento de 2% em relação ao de 1% de NaCl (Tabela 08/Figura 15).

O ritmo de filtração glomerular mostrou-se significativamente aumentado em relação ao controle no grupo de 1 % de NaCl somente aos 90 minutos de perfusão. Em relação ao grupo de 2% de NaCl o RFG apresentou-se significativamente reduzido quando comparado ao controle e ao grupo de 1% de NaCl ao longo de todo o experimento, assemelhando-se aos dados de resistência vascular renal (Tabela 09/Figura 16).

O percentual de transporte tubular de sódio foi alterado aos 30, 60 e 120 minutos de perfusão, sofrendo redução significativa em relação ao controle para o tratamento de 1% de NaCl. Observou-se também redução aos 30 e 120

minutos para o grupo de 2% de NaCl quando comparado ao controle, conforme pode ser observado na tabela 07/figura 20.

O percentual de transporte tubular de potássio apresentou uma redução significativa somente no grupo de 2% de NaCl, tanto em relação ao controle (em todos os tempos) quanto ao grupo de 1% de NaCl (a partir dos 60 minutos) como visto na tabela 08/figura 21.

A avaliação do percentual de transporte tubular de cloreto mostrou uma redução significativa nos tempos de 30, 60 e 120 minutos do grupo de 1% de NaCl comparado ao controle, enquanto que o tratamento de 2% de NaCl reduziu somente aos 30 e 120 minutos de perfusão em relação ao controle. Os dados estão representados na tabela 09/figura 22.

O transporte tubular proximal de sódio, tabela 10/figura 23, apresentou uma redução significativa no grupo 2% de NaCl nos tempos de 30 e 120 minutos, sendo essa redução somente significativa aos 30 minutos para o 1%.

Em relação ao transporte tubular de potássio observa-se um discreto aumento em relação ao controle aos 90 minutos no grupo de 1% de NaCl, porém no grupo de 2% de NaCl ocorre uma redução significativa quando comparado ao controle (em todos os tempos) e ao grupo de 1% de NaCl (a partir dos 60 minutos) (Tabela 11/Figura 24).

O transporte tubular de cloreto foi reduzido significativamente aos 30, 60 e 120 minutos no grupo de 1% de NaCl, enquanto que essa redução foi observada durante todos os tempos no grupo de 2% de NaCl, ambos em relação ao controle.(Tabela 12/Figura 25).

A excreção de sódio foi aumentada aos 60 e 90 minutos no grupo de 1% de NaCl, aumento esse significativo em relação ao controle. O grupo de 2% de NaCl não apresentou alteração em relação ao controle, porém mostrou-se significativamente reduzido em relação ao tratamento de 1% de NaCl aos 60 e

90 minutos de perfusão. Os dados podem ser melhores visualizados na tabela 13/figura 26.

A avaliação da excreção de potássio apresentou uma leve tendência ao aumento no grupo de 1% de NaCl, sendo significativo somente aos 90 minutos em relação ao controle, em relação ao grupo de 2% de NaCl não observou-se alterações (Tabela 14/Figura 27).

A excreção de cloreto também não apresentou alterações significativas em ambos os tratamentos em relação ao controle, porém observa-se uma redução significativa aos 60 e 90 minutos no grupo de 2% de NaCl em relação ao tratamento de 1% de NaCl. Os dados estão apresentados na tabela 15/figura 28.

Os dados mostrados na tabela 16/figura 29 são relacionados ao *clearance* osmolar. Observa-se uma redução significativa no tratamento de 2% de NaCl em relação ao controle (30, 60 e 90 minutos) e ao grupo de 1% (90 minutos). O grupo de 1% de NaCl apresentou uma leve tendência ao aumento porém não mostrou significância.

Tabela 06 – Pressão de Perfusão (PP) em mmHg nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	126,62 ± 2,22	127,3 ± 1,16*	122,7 ± 0,86*
60	124,17 ± 3,72	126,7 ± 1,11*	127,5 ± 1,46*
90	125,73 ± 4,23	126,4 ± 0,80*	127,2 ± 2,07*
120	128,00 ± 3,15	127,1 ± 0,75*	128,0 ± 1,84*

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

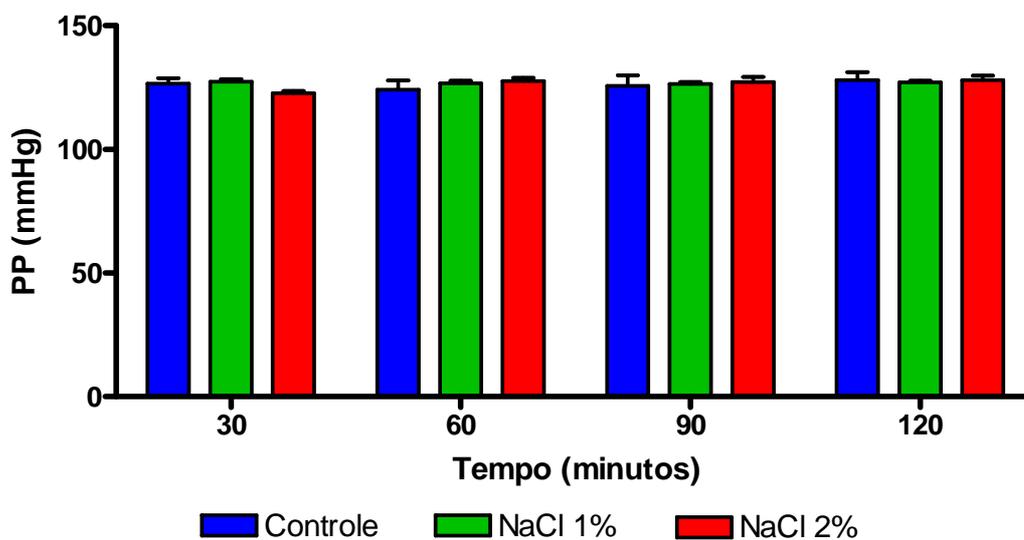


Figura 13 – Pressão de Perfusão (PP) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 07 – Resistência Vascular Renal (RVR) em $\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	4,85 ± 0,15	5,56 ± 0,59	2,73 ± 0,07*#
60	4,90 ± 0,16	5,20 ± 0,71	2,89 ± 0,10*#
90	4,47 ± 0,20	5,18 ± 0,69	2,88 ± 0,13*#
120	4,71 ± 0,18	5,20 ± 0,70	2,91 ± 0,12*#

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

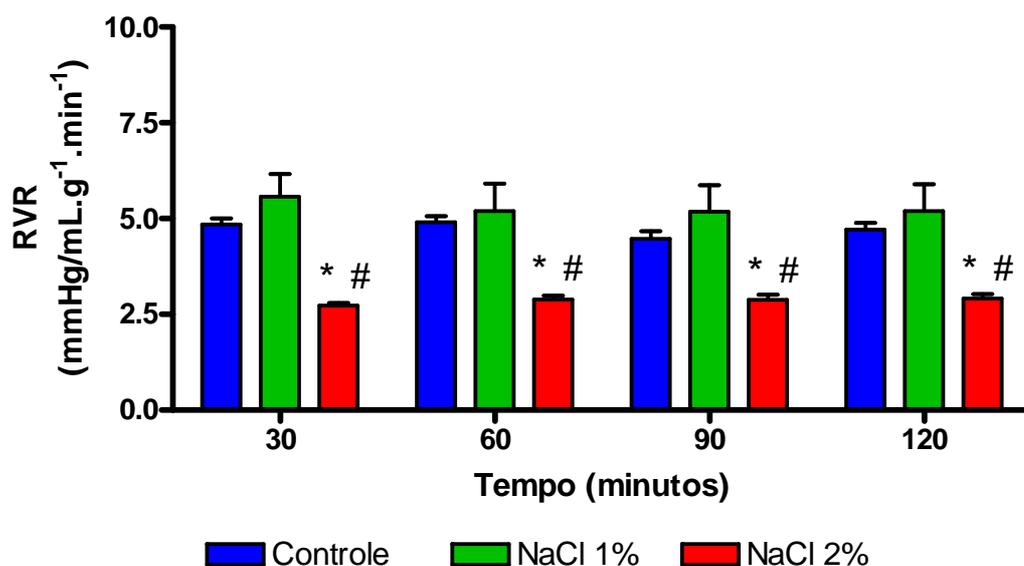


Figura 14 – Resistência Vascular Renal (RVR) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 08 – Fluxo Urinário (FU) em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	0,168 ± 0,011	0,166 ± 0,042	0,119 ± 0,007*
60	0,161 ± 0,015	0,214 ± 0,043	0,128 ± 0,020 [#]
90	0,164 ± 0,024	0,209 ± 0,034	0,118 ± 0,022 [#]
120	0,160 ± 0,020	0,169 ± 0,027	0,124 ± 0,017

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

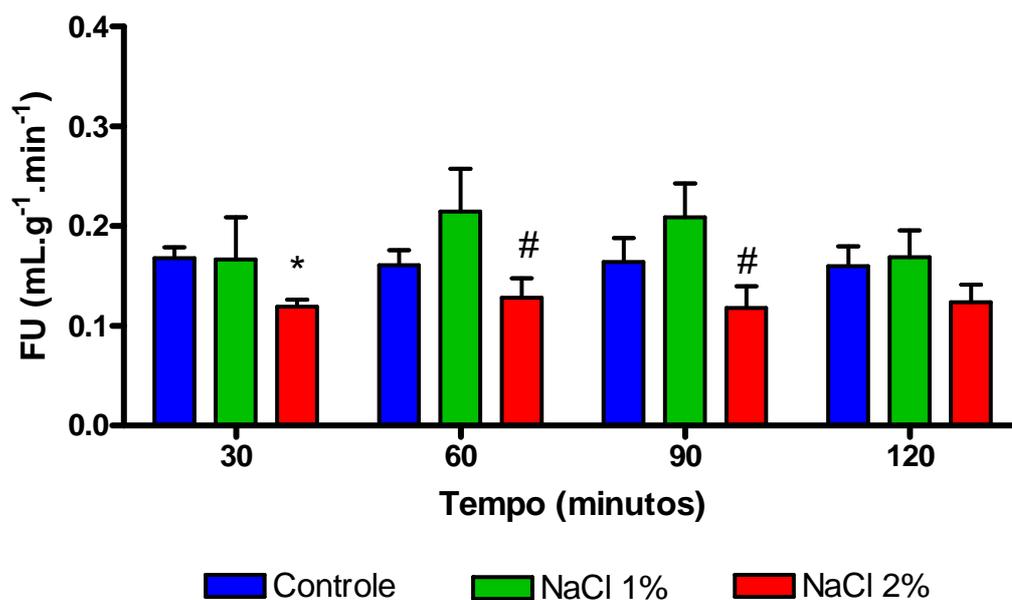


Figura 15 – Fluxo Urinário (FU) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 09 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) em mL.g⁻¹.min⁻¹ nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	0,701 ± 0,073	0,951 ± 0,397	0,349 ± 0,026*#
60	0,707 ± 0,051	1,031 ± 0,344	0,466 ± 0,048*#
90	0,633 ± 0,051	1,226 ± 0,316*	0,384 ± 0,055*#
120	0,697 ± 0,084	0,962 ± 0,325	0,395 ± 0,090*#

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

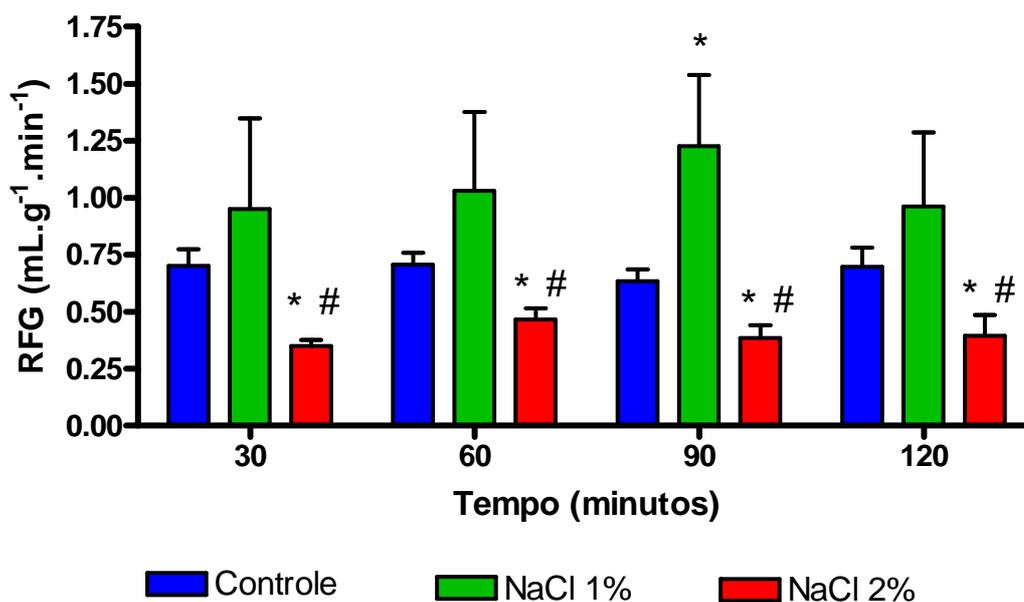


Figura 16 – Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 10 – Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	81,94 ± 1,24	64,51 ± 7,50*	71,77 ± 3,361*
60	81,11 ± 1,52	70,61 ± 4,67*	75,77 ± 3,611
90	79,26 ± 0,90	79,40 ± 2,52	77,25 ± 2,440
120	79,76 ± 0,56	70,57 ± 4,81*	69,41 ± 3,038*

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

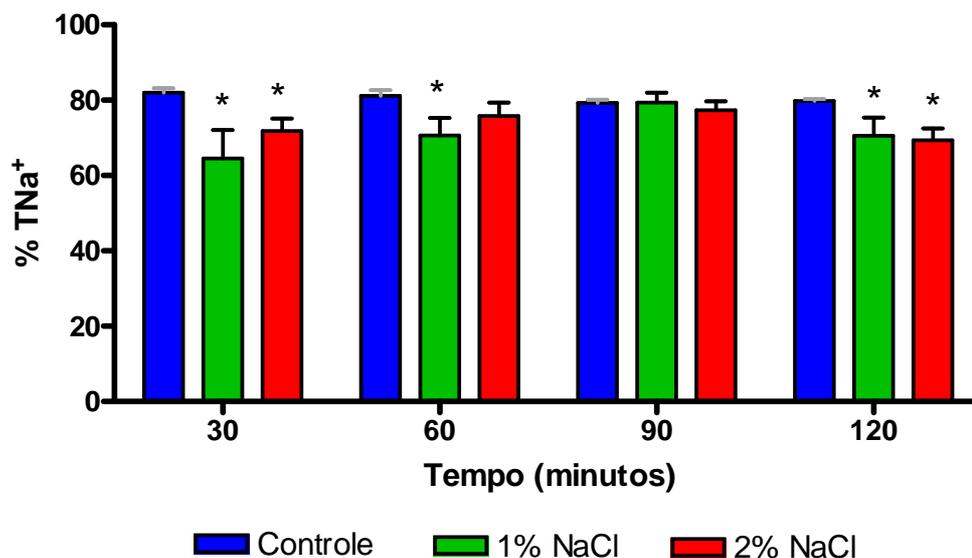


Figura 17 – Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 11 – Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	69,13 ± 4,14	52,77 ± 9,38	45,10 ± 5,40*
60	69,04 ± 5,68	65,15 ± 3,87	45,36 ± 5,87*#
90	71,84 ± 4,21	76,64 ± 1,99	43,34 ± 5,63*#
120	69,94 ± 6,86	69,11 ± 4,24	40,87 ± 5,45*#

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

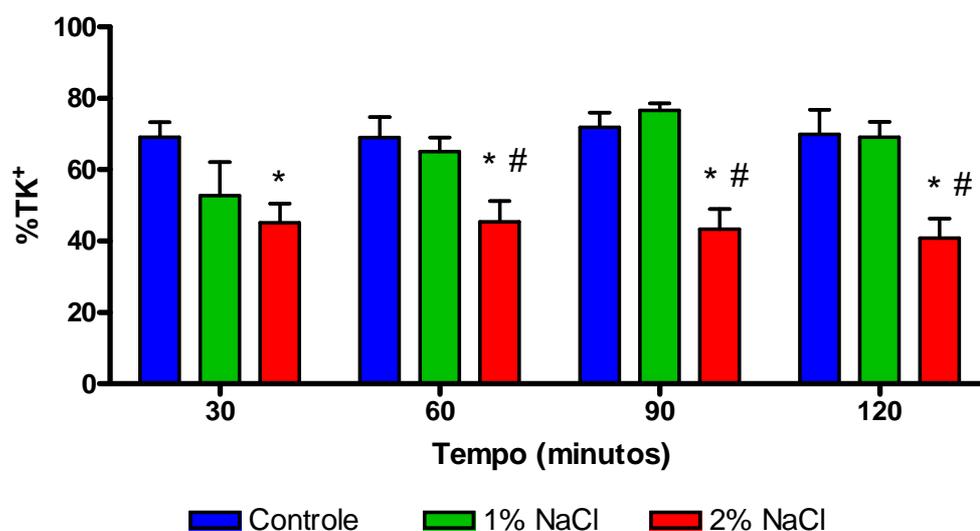


Figura 18 – Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 12 – Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	79,90 ± 0,98	59,38 ± 8,75*	67,30 ± 3,69*
60	81,25 ± 1,06	67,86 ± 4,84*	71,75 ± 4,29
90	77,32 ± 1,12	77,85 ± 2,50	72,81 ± 2,85
120	78,53 ± 0,89	69,42 ± 4,79*	64,19 ± 3,15*

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

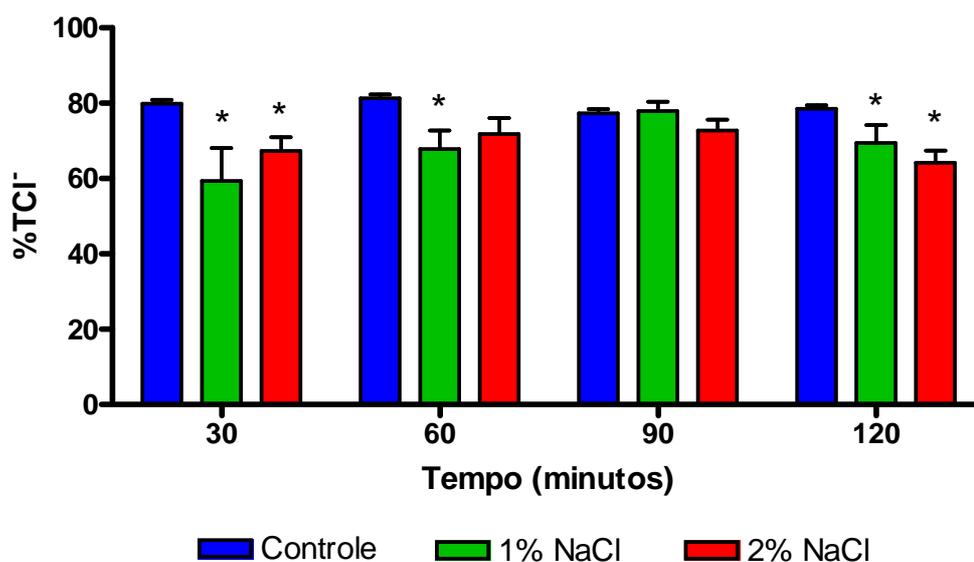


Figura 19 – Percentual de Transporte Tubular de Cloreto (%TCl⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 13 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	75,69 ± 1,68	58,61 ± 8,40*	65,51 ± 4,67*
60	72,59 ± 1,90	65,58 ± 4,41	68,39 ± 4,95
90	74,33 ± 1,33	74,93 ± 2,64	71,84 ± 3,17
120	72,18 ± 1,97	63,66 ± 6,05	64,30 ± 3,88*

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

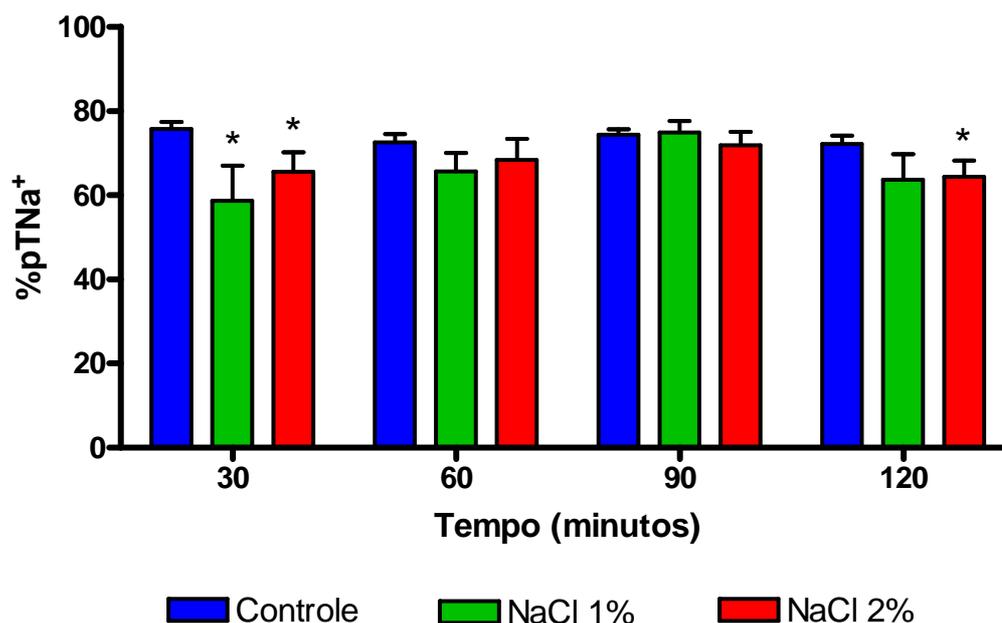


Figura 20 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Sódio (%pTNa⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 14 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pTK⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	59,06 ± 1,10	53,07 ± 9,31	41,88 ± 5,71*
60	63,68 ± 1,19	60,11 ± 3,75	48,63 ± 4,46*#
90	64,68 ± 1,24	72,17 ± 1,94*	40,00 ± 5,47*#
120	63,78 ± 0,73	62,21 ± 5,48	40,64 ± 5,11*#

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

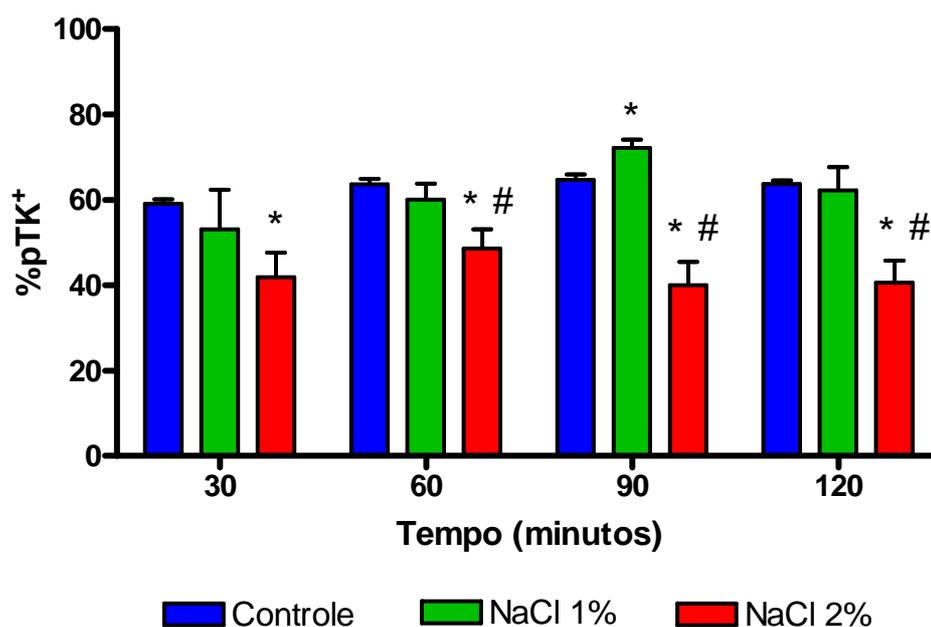


Figura 21 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Potássio (%pTK⁺) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 15 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%pTCl⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	76,81 ± 0,65	53,49 ± 9,61*	61,05 ± 4,94*
60	78,49 ± 1,54	62,82 ± 4,56*	64,37 ± 5,62*
90	76,58 ± 0,35	73,38 ± 2,59	67,40 ± 3,58*
120	76,36 ± 0,78	62,52 ± 6,05*	59,07 ± 4,12*

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

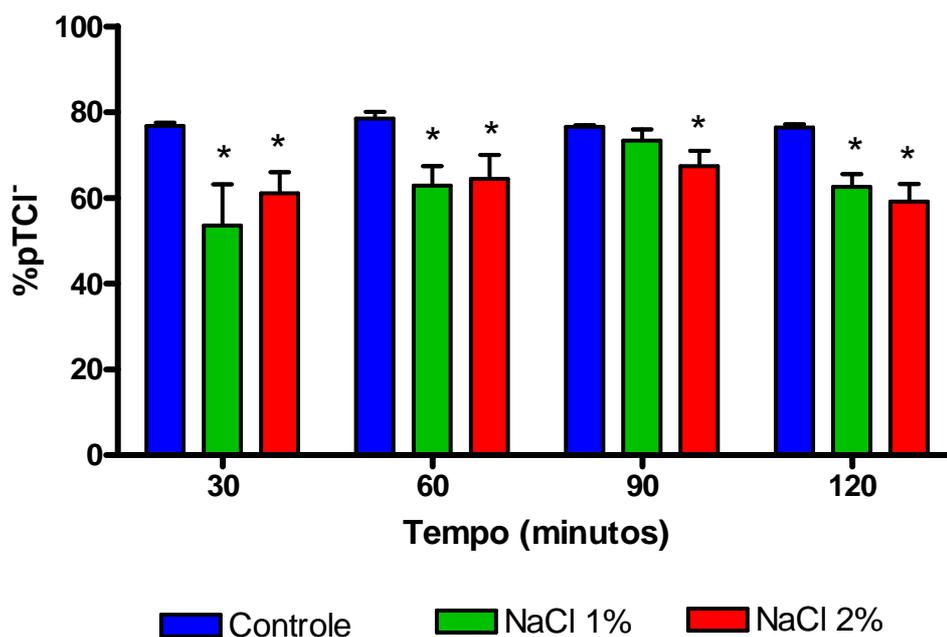


Figura 22 – Percentual de Transporte Tubular Proximal de Cloreto (%pTCl⁻) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 16 – Excreção de Sódio (ENa^+) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	14,84 ± 2,51	19,65 ± 4,42	12,28 ± 0,78
60	14,24 ± 1,72	26,49 ± 4,77*	13,46 ± 0,76 [#]
90	16,87 ± 2,18	27,39 ± 4,20*	11,06 ± 1,16 [#]
120	16,80 ± 2,66	22,70 ± 3,39	14,34 ± 2,34

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

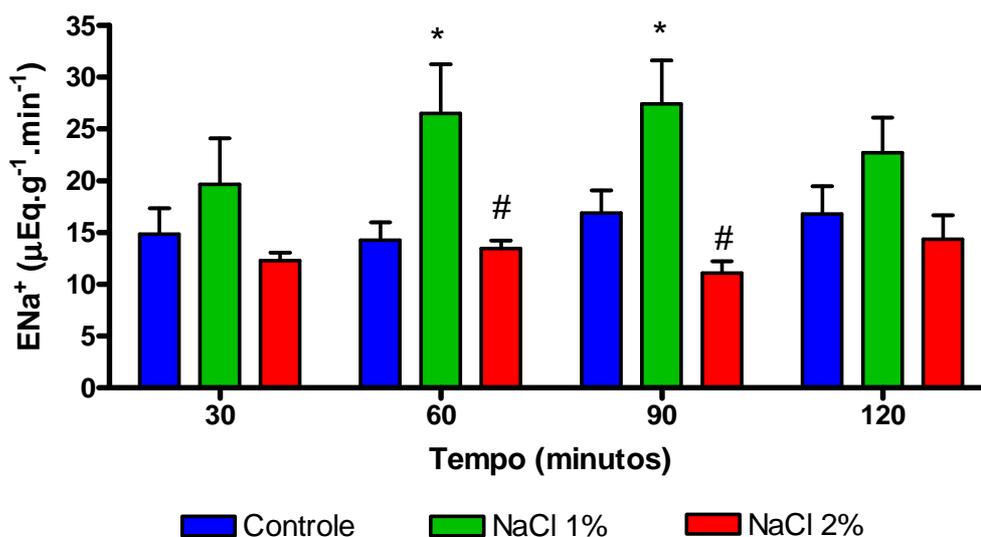


Figura 23 – Excreção de Sódio (ENa^+) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 17 – Excreção de Potássio (EK^+) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	0,90 ± 0,07	1,36 ± 0,41	0,836 ± 0,06
60	0,98 ± 0,06	1,57 ± 0,39	1,033 ± 0,05
90	0,90 ± 0,05	1,39 ± 0,26*	0,827 ± 0,09
120	0,84 ± 0,06	1,06 ± 0,20	0,853 ± 0,12

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

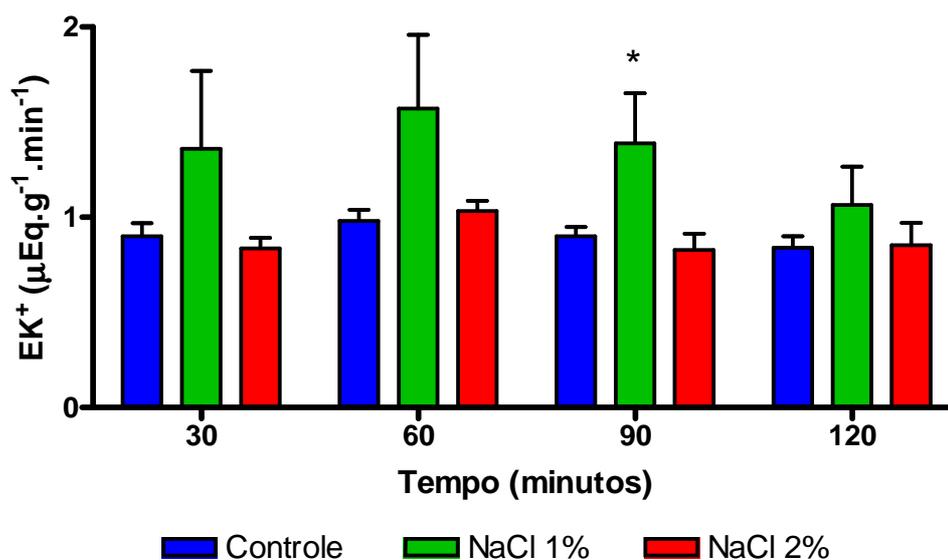


Figura 24 – Excreção de Potássio (EK^+) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 18 – Excreção de Cloreto (ECI^-) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	14,65 ± 3,45	18,80 ± 4,44	11,39 ± 0,75
60	15,28 ± 3,52	24,30 ± 4,64	12,41 ± 0,71 [#]
90	15,44 ± 2,75	24,28 ± 3,88	10,39 ± 1,06 [#]
120	15,42 ± 2,61	19,61 ± 3,17	13,24 ± 2,14

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

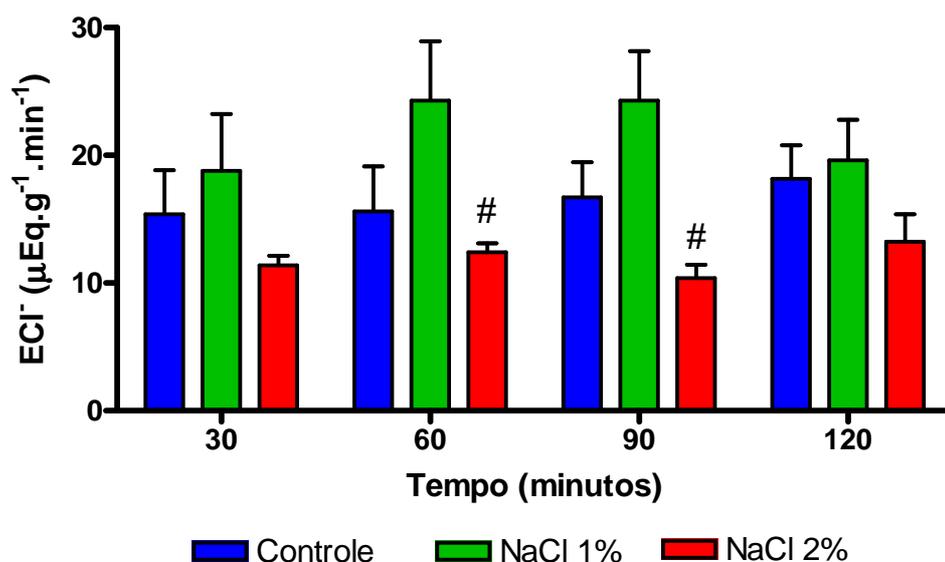


Figura 25 – Excreção de Cloreto (ECI^-) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

Tabela 19 – *Clearance* osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

Tempo (min)	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
30	0,130 ± 0,01	0,124 ± 0,03	0,101 ± 0,01*
60	0,130 ± 0,01	0,151 ± 0,02	0,105 ± 0,01*
90	0,130 ± 0,01	0,151 ± 0,03	0,086 ± 0,01**#
120	0,130 ± 0,01	0,127 ± 0,02	0,109 ± 0,02

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

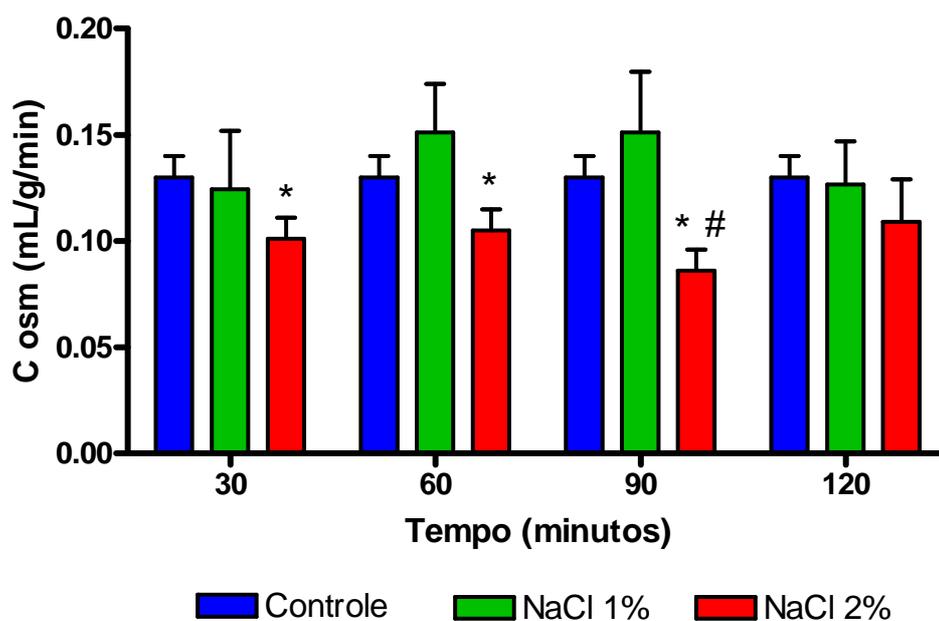


Figura 26 – *Clearance* osmolar (Cosm) nos grupos controle (n=6) e tratados (n=4) com 1% e 2% de NaCl por 10 dias em gaiolas metabólicas.

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

p < 0,05 para comparação em relação ao grupo de 1% de NaCl.

5.3 BIOLOGIA MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DE cGMP

5.3.1 Isolamento de RNA

As amostras testadas obtiveram ótima quantidade e qualidade dos RNA totais isolados como demonstra a tabela 20 abaixo. A tabela 20.1 mostra também a quantidade e qualidade dos RNA totais isolados dos rins de ratos também submetidos a gaiola metabólica mas que foram em seguida perfundidos em sistema de rim isolado de ratos.

Tabela 20 - Quantificação e qualidade do RNA total isolado dos rins de ratos Wistar tratados ou não em gaiola metabólica com solução salina de 1 ou 2%.

Amostra de RNA	Quantificação ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)*	Qualidade (A260nm/A280nm**)
Controle 1	5,967	2,05
Controle 2	8,097	2,03
Controle 3	9,167	2,04
Controle 4	8,086	2,06
Salina (1%) 1	5,643	2,07
Salina (1%) 2	10,944	1,95
Salina (1%) 3	7,618	2,05
Salina (1%) 4	9,830	2,00
Salina (2%) 1	3,055	1,97
Salina (2%) 2	4,161	2,00
Salina (2%) 3	9,765	2,00
Salina (2%) 4	7,995	1,96
Intestino	1,147	2,06
Aorta	0,310	2,05

* quantificação obtida através de cálculo baseado na absorvância de RNA em 260 nm

** razão da absorvância espectrofotométrica em 260nm e 280nm

Tabela 20.1 - Quantificação e qualidade do RNA total isolado dos rins de ratos Wistar tratados em gaiola metabólica com solução salina de 1 ou 2% seguidos de perfusão renal.

Amostra de RNA	Quantificação ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)*	Qualidade (A260nm/A280nm**)
Controle 1	4,281	2,07
Controle 2	4,060	2,07
Controle 3	2,801	2,05
Controle 4	2,782	2,07
Salina (1%) 1	11,697	2,01
Salina (1%) 2	5,379	2,07
Salina (1%) 3	5,899	2,00
Salina (1%) 4	8,582	2,08
Salina (2%) 1	9,537	2,08
Salina (2%) 2	12,088	1,99
Salina (2%) 3	7,139	2,06
Salina (2%) 4	12,228	2,04

* quantificação obtida através de cálculo baseado na absorbância de RNA em 260 nm

** razão da absorbância espectrofotométrica em 260nm e 280nm

5.3.2 Reação de PCR em Tempo Real

Os iniciadores dos genes investigados apresentaram boa eficiência demonstradas pelas curvas padrões obtidas através do software iQ5 Optical System Software (Version 2.0). Os iniciadores do gene de referência para a cadeia 18S do rRNA obteve eficiência de 95% com coeficiente de correlação da reta $R = 0,998$ e inclinação da reta em -3.449 descrito na figura 27. Os iniciadores do gene do receptor GC-A demonstraram eficiência de 101,3 %, coeficiente de correlação da reta de $R = 0,997$ e inclinação da reta de -3.291 (Figura 27.1). Já os iniciadores do receptor GC-C apresentaram eficiência de 96,7%, coeficiente de correlação da reta $R = 0.982$ e inclinação da reta de $-3,403$ (Figura 27.2).

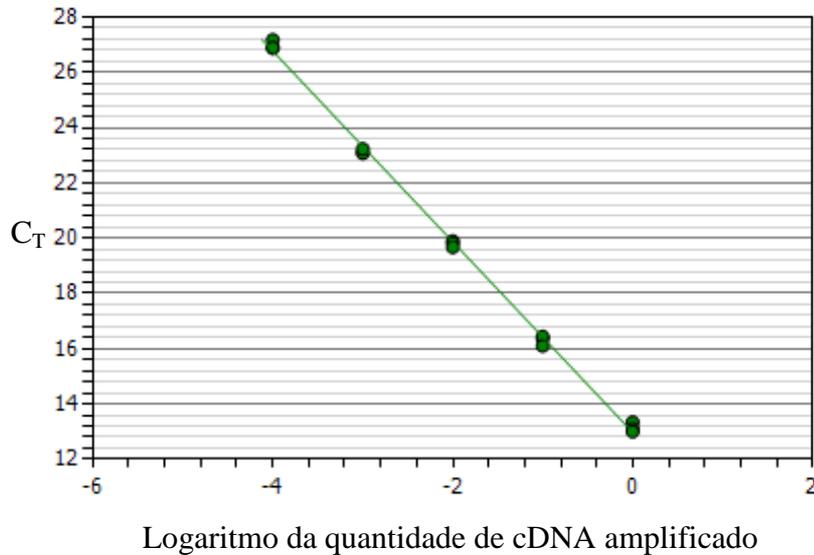


Figura 27 – Curva da eficiência da amplificação do gene iniciador da cadeia 18S do RNA ribossômico (18S rRNA) utilizando cDNA sintetizado a partir 2 μ g de RNA isolado de rim de rato com 4 diluições utilizando entre os pontos um fator intercalar de 5. C_T = números de ciclos necessários para a amplificação de cada diluição.

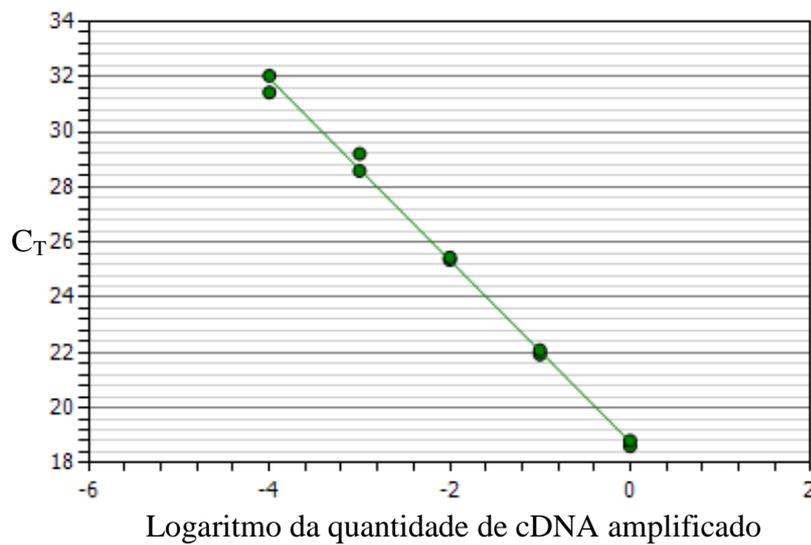


Figura 27.1 – Curva da eficiência da amplificação do gene iniciador para o receptor de guanilato ciclase A (GC-A) utilizando cDNA sintetizado a partir 2 μ g de RNA isolado de aorta de rato com 4 diluições utilizando entre os pontos um fator intercalar de 5. C_T = números de ciclos necessários para a amplificação de cada diluição.

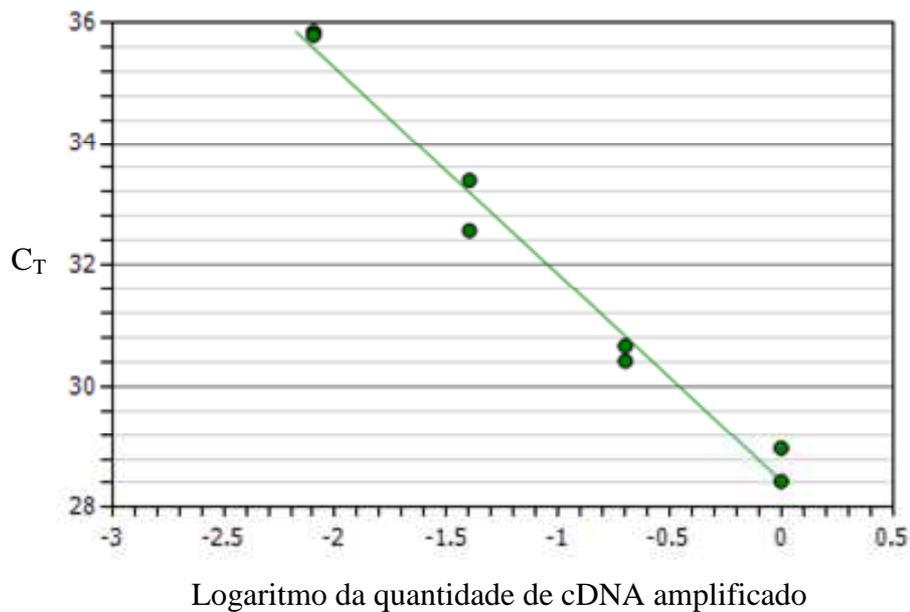


Figura 27.2 – Curva da eficiência da amplificação do gene iniciador para o receptor de guanilato ciclase C (GC-C) utilizando cDNA sintetizado a partir 2 µg de RNA isolado de intestino de rato com 4 diluições utilizando entre os pontos um fator intercalar de 5. C_T = números de ciclos necessários para a amplificação de cada diluição.

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 na presença ou ausência da administração de soluções salina de 1 e 2% e que foram submetidos ou não ao método de perfusão de rim isolado. Neste método, valores acima de 1,0 são considerados aumento da expressão e números abaixo de 1,0 a expressão dos genes estudados estão diminuídas. De acordo com as tabela 21 e 21.1 podemos notar que houve um leve aumento da expressão do gene GC-C após o tratamento com a solução salina a 1%, mas esse aumento foi um pouco mais proeminente com o tratamento de solução salina a 2%. Observamos isto tanto para os animais que foram submetidos somente à gaiola metabólica assim como para os rins que foram ainda perfundidos após período em gaiola metabólica. Um efeito oposto foi observado para o gene GC-A, onde observamos um leve decréscimo na sua expressão em ambos os tratamentos.

Tabela 21 – Valores da expressão relativa dos genes de GC-A e GC-C em referência a amplificação do gene 18S rRNA para animais tratados na presença ou ausência de solução salina de 1 e 2% em gaiola metabólica.

Tratamento	GC-A	GC-C
Solução salina 1%	0,86	1,11
Solução salina 2%	0,68	3,15

Tabela 21.1 – Valores da expressão relativa dos genes de GC-A e GC-C em referência a amplificação do gene 18S rRNA para rins perfundidos após tratamento na presença ou ausência de solução salina de 1 e 2% em gaiola metabólica.

Tratamento	GC-A	GC-C
Solução salina 1%	0,53	1,61
Solução salina 2%	0,13	3,54

5.3.3 Determinação de cGMP

A determinação do GMP cíclico urinário demonstrou um aumento significativo em relação ao controle nos ratos submetidos à dieta hipersódica. Observa-se um aumento da excreção urinária de GMPc, em ambos os tratamentos salinos, de urinas obtidas de gaiolas metabólicas; sendo esse aumento bem mais pronunciado no grupo de 2% de NaCl (tabela 22/figura 28).

A excreção urinária de GMPc de rins perfundidos demonstrou também um aumento bastante significativo desde os 30 minutos iniciais, apresentando um pico aos 90 minutos no grupo de 2% de NaCl em relação ao controle. Para maiores detalhes ver tabela 23/figura 29.

Tabela 22 – Dosagem de GMPc (pmol/mL) em amostras de urina de ratos mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas, nos grupos controle e tratados (1% e 2% de NaCl). Os dados foram avaliados em três períodos: Inicial (dias 1-4), Intermediário (dias 5-7) e Final (8-10).

Dias	Controle	NaCl 1%	NaCl 2%
1-4	79,53 ± 7,36	125,17 ± 19,94*	292,76 ± 57,17*
5-7	42,75 ± 7,07	146,07 ± 17,99*	313,87 ± 65,16*
8-10	53,16 ± 10,97	135,90 ± 10,86*	300,70 ± 40,27*

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

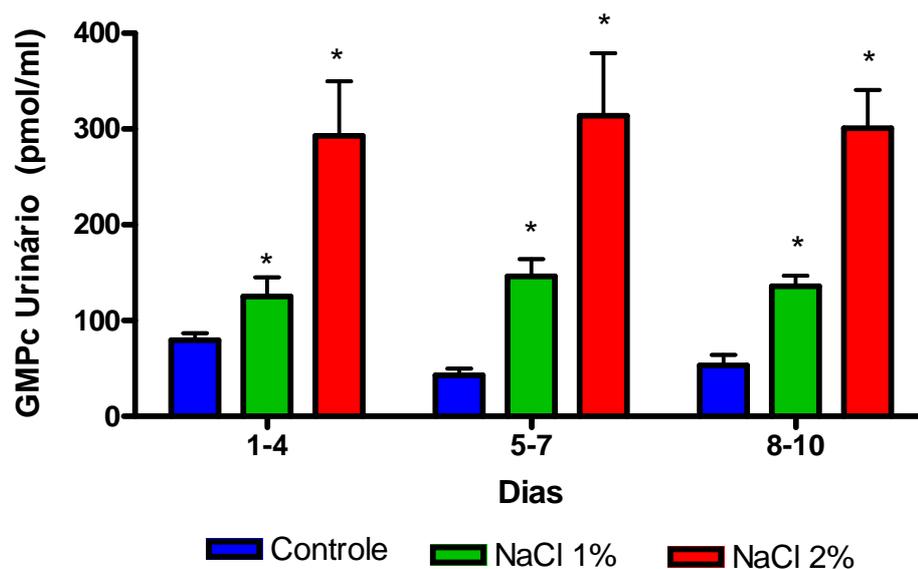


Figura 28 – Determinação de GMPc urinário de ratos mantidos por 10 dias em gaiolas metabólicas, nos grupos controle e tratados (1% e 2% de NaCl).

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

Tabela 23 – Dosagem de GMPc (pmol/mL) em amostras controle e tratado com 2% de NaCl de urina de rins de ratos perfundidos após permanência por 10 dias em gaiolas metabólicas, nos grupos controle e tratado (2% de NaCl).

Tempo (min)	Controle	NaCl 2%
30	0,317 ± 0,10	3,300 ± 1,220*
60	0,210 ± 0,05	3,690 ± 1,420*
90	0,206 ± 0,04	9,620 ± 2,340*
120	0,206 ± 0,06	2,400 ± 0,420*

Resultados expressos em Média ± EPM,

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

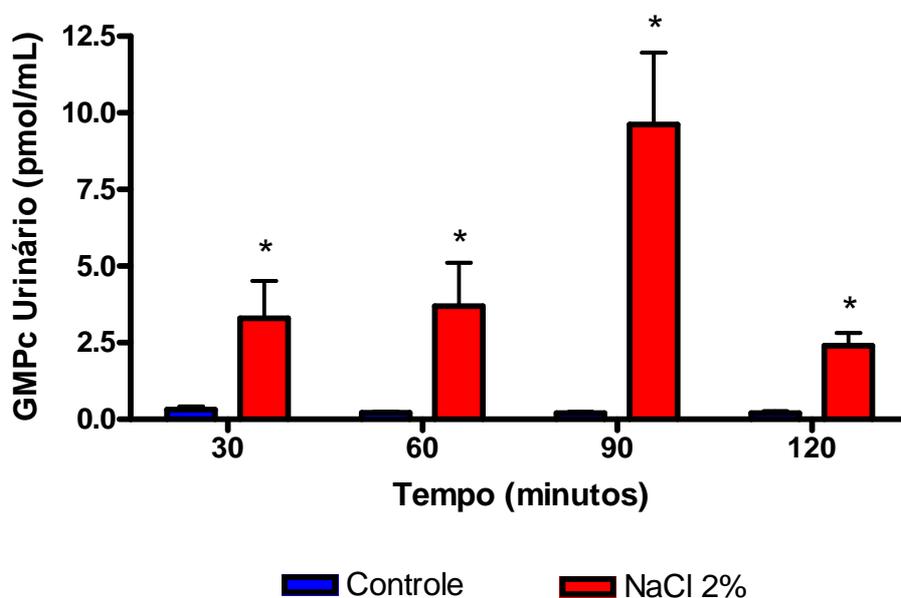


Figura 29 – Determinação de GMPc urinário de rins de ratos submetidos à perfusão renal após manutenção crônica de 10 dias em gaiola metabólica na ausência e presença de solução salina a 2%.

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

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os resultados do metabolismo diário, avaliados através de gaiolas metabólicas, mostraram que o aumento da ingestão de NaCl altera os diversos parâmetros analisados. O aumento da concentração de NaCl promove uma redução do peso corpóreo e da quantidade de alimento ingerido, e ao mesmo tempo aumenta o volume urinário e a ingestão de água..

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um dos principais sistemas hormonais que regula a quantidade de sódio. A sua ação fisiológica consiste principalmente estimular a reabsorção de Na^+ através dos rins, quando há uma redução do volume (Mangrum *et al.*, 2002). Quando há uma ingestão acentuada de água e sal haverá uma expansão do volume corporal. Desta forma, o sistema renina-angiotensina-aldosterona estará inibido, aumentando a excreção desse excesso de Na^+ (Hall, 1986).

Deloof e colaboradores (2000), demonstraram que a concentração de aldosterona plasmática apresenta uma significativa redução em ratos fetais e ratas grávidas, após 10 dias consecutivos ingerido 1% de NaCl na água de beber. Outros estudos também mostraram uma significativa supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona após uma dieta rica em sal em ratos adultos (Wolf & Kurtz, 1997) e mulheres grávidas (Lowe *et al.*, 1992).

A ingestão de grande quantidade de água e NaCl promove a expansão do volume, estimulando a liberação do peptídeo natriurético (ANP) pelo coração, produzindo como efeito final a inibição da reabsorção tubular de NaCl e água nos rins (Melo *et al.*, 2000). Peptídeos natriuréticos apresentam limitações, visto que sua ativação é dependente de uma alteração considerável no conteúdo corpóreo de NaCl. As alterações fisiológicas necessárias para estimular a liberação de ANP são tão grandes que foi determinado que este peptídeo não desempenha um papel significativo na homeostase diária do NaCl (Cogan, 1990).

Outros estudos demonstraram que o sistema gastrointestinal também está envolvido na regulação de sódio ingerido através da dieta, sendo os peptídeos guanilina (GN) e uroguanilina (UGN) os principais candidatos a atuarem como “hormônios natriuréticos intestinais”. Essa denominação refere-se ao fato de que evidências mostraram que uma dieta alterada de sódio influencia na produção de ambos os peptídeos GN e UGN pelas células da mucosa intestinal (Li *et al.*, 1996).

As respostas natriuréticas do rim ao aumento da carga de sódio, ocorrem mais rapidamente quando essa carga é ingerida oralmente do que por via intravenosa (Li *et al.*, 1996). Esse fato sugere que o intestino é capaz de sinalizar ao rim acerca da ingestão dietética de sal, porém a natureza do sinal ainda permanece desconhecida. GN e UGN são sintetizados pelo intestino e são capazes de induzir natriurese no rim, tornando-se fortes candidatos a essa sinalização entero-renal (Forte *et al.*, 1999).

Potthast e colaboradores (2001) mostraram que camundongos submetidos por 3 dias a ingestão de 1% de NaCl na água de beber apresentaram redução da ingestão alimentar e do peso corpóreo, além disso estes autores mostraram através de RT-PCR um aumento na expressão do mRNA para o peptídeo uroguanilina. Mangrum *et al.* (2002) submeteram camundongos a uma dieta rica em sal na ração (3,14g de NaCl/100g de dieta) por 2 dias em gaiolas metabólicas, demonstrando um aumento na ingestão de água, no volume urinário e na excreção de sódio urinário.

Estudos com ratos recebendo alta quantidade de sal no alimento por um período de 4 dias, demonstraram um aumento na excreção de sódio e da expressão do mRNA para GN e UGN no intestino (Carrithers *et al.*, 2002). Uma exposição crônica (7 dias) de ratos a uma grande concentração de sal (1% e 4% de NaCl na ração), também revelou um aumento da expressão do mRNA para os peptídeos GN e UGN no intestino (Li *et al.*, 1996). Observa-se que a sobrecarga salina induz efeitos renais que se mantêm, possivelmente devido à ativação de diversos genes que promovem à adaptação as novas condições adversas.

Ratas no período tardio da gestação foram submetidas à ingestão de 1% de NaCl na água de beber por 10 dias consecutivos, mostrando um aumento na ingestão de água e excreção urinária de água e sódio em relação ao controle (Deloof *et al.*, 2000). Ratos recebendo uma dieta multideficiente suplementada com cloreto de sódio (0,37g/g%) apresentaram uma redução do peso corpóreo e um aumento do fluxo urinário, excreção urinária de sódio e da pressão arterial média em relação ao controle (Paixão *et al.*, 2003).

Esses achados corroboram os nossos resultados de metabolismo diário, demonstrando que altas quantidades de sal quando ingeridos principalmente por via oral através da água de beber, promovem um aumento no volume urinário e na ingestão de água. A redução do peso corpóreo pode estar associada a menor ingestão de alimento observada, além da acentuada diurese que pode levar a desidratação.

Os estudos *in vivo* são importantes para compreensão da interação entre os órgãos na regulação do sódio ingerido através da dieta. Porém, certos mecanismos não podem ser explicados devido a grande complexidade de mediadores e órgãos que são envolvidos em uma resposta fisiológica. Portanto, se faz necessário o estudo de órgão isolado com o objetivo de entender as alterações fisiológicas promovidas no órgão que se quer estudar. Em nosso estudo se fez uso de rim isolado de rato para compreender as alterações promovidas pela exposição crônica de NaCl na dieta.

Magalhães *et al.* (2006), demonstraram em estudos de hemodinâmica renal em ratos sujeitos a ingestão crônica de 1% de NaCl na água de beber, um aumento da pressão arterial média e do ritmo de filtração glomerular em relação ao controle, nenhuma alteração no fluxo urinário, fluxo sanguíneo renal, fluxo plasmático renal e resistência vascular renal foram significativas.

Os grupos salinos não apresentaram diferenças significativas em relação à pressão de perfusão que se manteve constante e igual durante todo o experimento. Observou-se uma redução da resistência vascular renal e no

ritmo de filtração glomerular no grupo de 2% em relação ao controle. Em relação ao fluxo urinário observou-se uma discreta redução no grupo de 2% comparado ao de 1% de NaCl, diferente do que foi observado no estudo in vivo. A diferença no fluxo urinário observada in vivo pode estar relacionada à sinalização entre o intestino e o rim que se encontra ausente no modelo de estudo in vitro. Em relação ao transporte de eletrólitos os resultados demonstram um aumento da excreção total e proximal de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em ambos os tratamentos. No entanto o *clearance osmolar* foi alterado somente pela concentração de 2% de NaCl.

A grande quantidade de NaCl que chega ao intestino pode estar estimulando a liberação de GN que atua no rim produzindo aumento do cGMP intracelular. Estudos com linhagem de células renais de gambá (OK) demonstraram que GN aumentava a concentração intracelular de cGMP em células de túbulo proximal (London *et al.*, 1999). Sindic e colaboradores (2002) mostraram um aumento na concentração de cGMP induzida pela GN em linhagem de células de túbulos proximais de humanos (IHKE1), através da ativação de GC-C.

A determinação de cGMP nas urinas dos animais controle e tratados com dieta hipersódica revelou um aumento de sua excreção urinária, demonstrando então a participação das enzimas guanilato ciclase na sinalização renal, após a ingestão crônica de NaCl. GC-C possivelmente seria o principal receptor envolvido nesse processo, através de sua ativação pela UGN (Sindic *et al.*, 2006).

A alta ingestão de sal na água aumenta a expressão de mRNA do peptídeo UGN em células renais e não afeta a expressão de GN (Potthast *et al.*, 2001). Esse estudo também demonstrou que o padrão de expressão renal para esses peptídeos varia de acordo com a região, sendo a UGN mais amplamente distribuída em células do túbulo proximal e a GN predominante em células do ducto coletor.

Potthast *et al.* (2001) no mesmo estudo citado anteriormente, também mostrou que a modulação na expressão gênica para UGN renal é mais acentuada quando a ingestão de altas quantidades de sal se faz através da água e não do alimento. Esse mecanismo pode ser explicado através de regulação fisiológica, pois quando há um aumento na quantidade de sal ingerido através do alimento observa-se um proporcional aumento da ingestão de água, induzindo um aumento na produção de urina e na excreção urinário desse excesso de sódio. Por outro lado, quando o sal é ingerido através da água, há uma voluntária redução da ingestão de alimento com conseqüente perda de peso corpóreo, isso permite conservar a razão massa hídrica por massa corporal (Collier *et al.*, 1991).

Esse fato é interessante, pois os animais submetidos a uma ingestão de altas quantidades de sal através da água são incapazes de compensar esse excesso de NaCl por ingestão de mais água, como o observado nos animais ingerindo sal através da dieta (Latta *et al.*, 1983).

O emprego da técnica de RT-PCR permitiu determinar a distribuição do mRNA do receptor GC-C em segmentos do néfron de rato. A expressão do mRNA para GC-C foi bem maior no ducto coletor cortical, seguido de túbulo contorcido proximal e por fim na alça de Henle (Carrithers *et al.*, 2000). O mesmo estudo também mostrou que existe uma síntese renal de GN e UGN, podendo então contribuir para a regulação do transporte tubular renal.

Carrithers *et al.* (2004) demonstraram a expressão de mRNA para GC-C em todos os segmentos de néfron de rato. Potthast *et al.* (2001) também estudando a localização de GC-C, demonstrou a sua presença em glomérulos e túbulos proximais de camundongos. Outro estudo feitos em rim de humanos mostrou a expressão de mRNA para GC-C na medula, mas não no córtex (Kinoshita *et al.*, 1997). Porém, estudos posteriores em tecidos humanos, GC-C foi encontrado em córtex renal e túbulos proximais (Sindic *et al.*; 2002 e 2005). Em vista disso observa-se a localização específica da expressão de GC-C ao longo do néfron varia de espécie para espécie.

Dieta hipersódica continua a induzir um aumento nas concentrações urinárias de UGN e cGMP mesmo em camundongos deficientes do receptor GC-C, ao mesmo tempo que o peptídeo UGN continua a induzir natriurese, caliurese e diurese, sugerindo a existência de outras vias de sinalização renal independentes de GC-C (Carrithers *et al.*, 2004; Sindic *et al.*, 2004).

Os peptídeos da família das guanilinas podem atuar em diversos locais do rim. Foi comprovada a sua ação através de receptores GC-C, porém a existência de receptores órfãos de guanilato ciclase sugere outros possíveis candidatos a serem ativados pelas guanilinas (Sindic *et al.*, 2006). Foi descoberto também que os peptídeos da família das guanilinas atuam por outras vias independentes de GCs, tais como a regulação de canais de potássio Kcn1 (Yao *et al.*, 1996), o receptor CFTR (Forte *et al.*, 2000) e os canais de potássio do tipo ROMK (Michell *et al.*, 2008). A interação dessas vias ativadas pelas GNs ainda não se encontra elucidada.

Outros estudos também mostraram a expressão de mRNA do peptídeo UGN em átrios e ventrículos do coração, esse achado então demonstrou também a participação do miocárdio na sinalização renal via UGN no controle da regulação de sal presente em excesso na circulação (Fan *et al.*, 1996).

Em nossos resultados utilizando RT-PCR foi possível verificar o aumento da expressão do gene do receptor de guanilato ciclase C (GC-C) tanto em rins submetidos ao tratamento salino em gaiolas metabólicas, quanto em rins posteriormente perfundidos, em ambos os tratamentos. Esse resultado demonstra que o aumento da carga salina por via oral está relacionado ao aumento da expressão de GC-C em tecido renal, possivelmente através da sinalização entero-renal que participa os peptídeos da família das guanilinas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- O presente estudo mostrou que o tratamento de 1% e 2% de NaCl promove alterações significativas no metabolismo diário de ratos.
- O tratamento salino evidencia que a concentração de 2% altera mais pronunciadamente a RVR, o FU e o RFG do que o tratamento com 1% de NaCl;
- O transporte de eletrólitos foi alterado por ambos os tratamentos, demonstrando o aumento da excreção de sódio, potássio e cloreto;
- O aumento da expressão do gene para GC-C demonstra a sua participação na sinalização renal, após a ingestão crônica de 1% e 2% de NaCl de ratos em gaiolas metabólicas;
- O aumento da excreção urinária de cGMP juntamente com o aumento da expressão de GC-C, demonstra a participação da guanilato ciclase atuando na sinalização renal no aumento da carga salina;
- O mecanismo de ação possivelmente esteja relacionado com a participação dos peptídeos da família das guanilinas, que atuam no rim ativando o receptor GC-C e aumentando a excreção renal de cGMP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BLACKBURN, H.; PRINEAS R. (1983) Diet and hypertension: anthropology, epidemiology, and public health implications. *Prog Biochem Pharmacol* 19: 31–79.

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.

BURNS K.D.; HOMMA T.; HARRIS R.C. (1993) The intrarenal reninangiotensin system. *Semin Nephrol* 13: 13–30.

CAREY, R.M.; MCGRATH, H.E.; PENTZ, E.S.; GOMEZ, R.A.; BARRETT, P.Q. (1997) Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J. Clin. Invest.*, 100:1566-1574.

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.; TAYLOR, B.; CAI, W.Y.; JOHNSON, B.R.; OTT, C.E.; GREENBERG, R.N.; JACKSON, B.A. (2000) Guanylyl cyclase-C receptor mRNA distribution along the rat nephron. *Regulatory Peptides* 95:65-74.

CARRITHERS, S.L.; JACKSON, B.A.; CAI, W.Y.; GREENBERG, R.N.; OTT, C.E. (2002) Site-specific effects of dietary salt intake on guanylin and uroguanylin mRNA expression in rat intestine. *Regulatory Peptides* v. 107, p. 87-95.

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.

CHANG, M.S.; LOWE, D.G.; LEWIS, M.; HELLMISS, R.; CHEN, E.; GOEDDEL, D.V. (1989) Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature (Lond)* 341:68–72.

COGAN, M.G. (1990) Atrial natriuretic peptide. *Kidney Int*, 37, 1148.

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.

COLLIER, G.; JOHNSON, D.F.; STANZIOLA, C. (1991) The economics of water and salt balance. *Physiol. Behav.* v. 50, p. 1221-1226.

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.

DELOOF, S.; SEZE, C.D.; MONTEL, V. AND CHATELAIN, A. (2000) 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. *European Journal of Endocrinology*, 142, 524–532.

DINA, R.; JAFARI M. (2000) Angiotensin II-receptor antagonists: an overview. *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, 57:1231.

DRUMMER, C.; FRANCK, W.; HEER, M.; FORSMANN, W.-G.; GERZER, R.; GOETZ, K. (1996) Postprandial natriuresis in humans: further evidence that urodilatin, not ANP modulates sodium excretion. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 270: F301–F310.

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

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.

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 actions 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.

FORTE, L.R. & FONTELES, M.C. (2007) Uroguanylin and Guanylin: Endocrine link connecting the intestine and kidney for regulation of sodium balance. *The Kidney*.

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. 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 actions of guanylin induces

intestinal secretion and natriuresis in the isolated perfused kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:267-271.

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

GREGER, R. (2000) Physiology of renal sodium transport, *Am J Med Sci* 319:51.

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.

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.

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

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.

JACKSON, E.K.; ZACHARIA, L.C.; ZHANG, M.; GILLESPIE, C.G.; ZHU, C.; DUBEY, R.K. (2006) cAMP – adenosine pathway in the proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther.*, 317, n. 3, p. 1219-29.

JOO, N. S.; LONDON, R. M.; KIM, H. D.; FORTE, L. R.; CLARKE, L. L. (1998) Regulation of intestinal Cl⁻ and HCO₃⁻ secretion by uroguanylin. *Am J Physiol* 274, G633–G644.

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.

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.

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

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

KWON, T.H.; NIELSEN, J.; KIM, J.H.; KNEPPER, M.A.; FRØKIÆR, J.; NIELSEN, S. (2003) Regulation of sodium transporters in the thick ascending limb of rat kidney: response to angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: 152–165.

LATTA, H.; LEE, T.C. (1983) Effects of excessive sodium chloride on the juxtaglomerular apparatus and blood pressure of uninephrectomized rats. *Lab. Invest.* v. 49, p. 99-106.

LI, Z.; KNOWLES, J.W.; GOYEAU, D.; PRABHAKAR, S.; SHORT, D.B.; PERKINS, A.G.; GOY, M.F. (1996) Low salt intake down-regulates the guanylin signaling pathway in rat distal colon. *Gastroenterology* v. 111, p. 1714–1721.

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.

LIMA, A.A.M.; MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.C. (1992) The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol. Toxicol.* 70:163-167.

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

LOWE, S.A.; MACDONALD, G.J. & BROWN, M.A. (1992) Atrial natriuretic peptide in pregnancy: response to oral sodium supplementation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 19, 607–612.

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.

LUMBERS E.R. (1999) Angiotensin and aldosterone. *Regul Pept* 80:91.

MAGALHÃES, J.C.G.; SILVEIRA, A.B.; MOTA, D.L.; PAIXÃO, A.D.O. (2006) Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Experimental Physiology* 91, 611-619.

MANGRUM, A.J.; GOMEZ, R.A.; NORWOOD, V.F. (2002) Effects of AT1A receptor deletion on blood pressure and sodium excretion during altered dietary salt intake. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 283, F447-453

MANN, E.A.; JUMP, M.L.; WU, J.; YEE, E.; GIANNELLA, R.A. (1997) Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem – Biophys. Res. Commun.* V. 239, p. 463-6.

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.

MENETON, P.; JEUNEMAITRE, X.; WARDENER, H.E.; MACGREGOR, G.A. (2005) Links Between Dietary Salt Intake, Renal Salt Handling, Blood Pressure, and Cardiovascular Diseases. *Physiol Rev* 85: 679–715.

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.

MORALES, M. M.; CARROLL, T. P.; MORITA, T.; SCHWIEBERT, E. M.; DEVUYST, O.; WILSON, P. D.; LOPES, A. G.; STANTON, B. A.; DIETZ, H. C.; CUTTING, G. R.; GUGGINO, W. B. (1996) Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 270: F1038–F1048.

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

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.

NAKAZATO, M.; YAMAGUCHI, H.; KINOSHITA, H.; KANGAWA, K.; MATSUO, H.; CHINO, N. (1996) Identification of biologically active and inactive human uroguanylin in plasma and urine and their increases in renal insufficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 586– 593.

PAIXÃO, A.D.O.; NUNES, F.A.; MONTEIRO, J.C.; MACIEL, C.R. (2003) Low sodium chloride content in a multideficient diet induces renal vasodilatation in rats. *Nutrition Research* 23, 85-89.

PFAFFL, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29: 2002-2007.

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

PITARI, G. M.; DIGUGLIELMO, M. D.; PARK, J.; SCHULZ, S.; WALDMAN, S. A. (2001) Guanylyl cyclase C agonists regulate progression through the cell cycle of human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7846–7851.

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

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

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

SAVILLE, M. A.; GEER, P. G.; WANG, B. C.; LEADLY, R. J. JR.; GOETZ, K. L. (1988) A high salt meal produces natriuresis in humans without elevating plasma atriopeptin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188: 389–393.

SCHEVING, L. A., RUSSELL W. E., CHONG K. (1996) Structure, glycosylation, and localization of rat intestinal guanylyl cyclase C: modulation by fasting. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 271: G959–G968.

SCHMIDT-NIELSEN, K. (2002) *Animal Physiology – Adaptation and Environment*. Cambridge University Press. 5 ed. p. 301-356.

SCHULZ-KNAPPE P.; FORSSMANN K.; HERBST F. (1988) Isolation and structural analysis of 'urodilatin', a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr*, 66:752–759.

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

SCHULZ, S.; LOPEZ, M.J.; KUHN, M.; GARBERS, D.L. (1997) Disruption of the guanylyl cyclase-A gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* v. 100, p. 1590-1595.

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

SHAILUBHAI, K.; YU, H. H.; KARUNANANDAA, K.; WANG, J. Y.; EBER, S. L.; WANG, Y.; (2000) Uroguanylin suppresses polyp formation in the APCMin+ mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *Cancer Res* 60, 5149– 5155.

SINDICE, A.; BASOGLU, C.; CERCI, A.; HIRSCH, J. R.; POTTHAST, R.; KUHN, M. (2002) Guanylin, uroguanylin, and heat-stable enterotoxin activate guanylate cyclase C and a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem* 277, 17758– 17764.

SINDIC, A.; VELIC, A.; HIRSCH, J.R.; KUHN, M.; SCHLATTER, E. (2004) Guanylin peptides regulate K⁺ conductance via phospholipase A2 and arachidonic acid in principal cells of mouse CCD. *Pflügers Arch* 447:S55.

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.

SOUSA, T.M. (2005) Ações farmacológicas da ser-thr-lys-guanilina em sistema de perfusão de rim isolado de rato. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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

VAANDRAGER, A. B.; SMOLENSKI, A.; TILLY, B. C.; HOUTSMULLER, A. B.; EHLERT, E. M.; BOT, A. G. (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1466–1471.

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

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.

WOLF K & KURTZ A. (1997) Influence of salt intake on atrial natriuretic peptide gene expression in rats. *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology* 433 809–816.

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

YAO, X.; LIU, Y.; TUNG, F.; DESIR, G.V. (1996) Genomic structure and regulation of *Kcn1*, a cyclic GMP-gated potassium channel. *Am. J. Physiol.* v. 271, p. F37-41.

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

39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS E BLOQUEIO COM INDOMETACINA DO EXTRATO BRUTO DA ANÊMOMA MARINHA *Bunodosoma caissarum* EM RIM ISOLADO DE RATO E LEITO VASCULAR MESENTÉRICO Martins RD¹; Alves RS¹; Jorge ARC¹; Araujo Lima ALGC¹; Aragao FOF¹; Studart Neto A¹; Havt A¹; Toyama MH²; Barbosa PSF¹; Monteiro HSA¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UNICAMP - Instituto de Biologia

INTRODUÇÃO: A *Bunodosoma caissarum* (VBc) possui uma variedade de compostos biologicamente ativos incluindo algumas toxinas potentes. O objeto deste trabalho foi estudar as alterações funcionais causadas por doses crescentes de 1 µg/mL (VBc¹), 3 µg/mL (VBc³) e 10 µg/mL (VBc¹⁰) em rim isolado de rato e leito vascular mesentérico, além de promover o bloqueio farmacológico da dose mais efetiva utilizando indometacina (10 µg/mL). **MÉTODOS:** Os rins de ratos Wistar machos (n=6) foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g/dL de albumina por 120min, sendo os 30 min iniciais controle interno. O controle externo (CE) foi perfundido somente com a solução de Krebs-Henseleit. Os dados foram analisados por ANOVA e *t* de Student (*p<0,05). O leito vascular mesentérico foi perfundido por 80 minutos em um sistema aberto com solução de Krebs, sendo os 20 minutos iniciais controle interno. **RESULTADOS:** VBc³ e VBc¹⁰ elevaram a pressão de perfusão (PP) - (ECPP=104,2±3,7; VBc³PP=127,7±5,8*; VBc¹⁰PP=134,7±7,4*mmHg) e resistência vascular renal (RVR) - (CE RVR= 4,9±0,16; VBc³RVR= 6,48±0,47*; VBc¹⁰RVR= 5,79±0,42* mmHg/ mL/g) aos 60min., VBc³ aos 90min PP -(CEPP=104,7±4,2; VBc³PP=126,1±5,2* mmHg); RVR - (CE RVR=4,47±0,2; VBc³RVR= 6,36±0,37* mmHg /mL/g/min) e com VBc¹ e VBc³ aos 120min, PP - (ECPP =107.6±3,15; VBc¹PP= 122.3±5.2* mmHg; VBc³PP= 140,1±6,5* mmHg) e RVR (EC RVR = 4,71±0,18; VBc¹RVR=5,82±0,44*; VBc³RVR= 7,04±0,39* mmHg/mL/g/ min). Houve aumento do fluxo urinário por VBc³ e VBc¹⁰ aos 90min e 120min e alteração do ritmo de filtração glomerular aos 120 min pelas três doses. A adição de indometacina ocorreu com a dose de 0,3 µg/mL do extrato bruto e bloqueou a ocorrência dos efeitos sobre pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular. VBc não apresentou efeitos no leito vascular mesentérico. **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:** Estes achados sugerem que o extrato bruto de *B. caissarum* não apresenta um comportamento dose resposta, exercendo ação indireta sobre os rins com participação dos mediadores inflamatórios.

Apoio Financeiro: CNPq

39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

BLOQUEIO DOS EFEITOS RENAIIS DO EXTRATO BRUTO DA ANÊMOMA MARINHA *Bunodosoma caissarum* PELO TEZOSENTAN. Martins RD¹; Alves RS¹; Jorge ARC¹; Araujo Pereira CDM¹; Oliveira IMS¹; Santos JVA¹; Toyama MH²; Barbosa PSF¹; Fonteles MC¹; Monteiro HSA¹ - ¹UFC - Fisiologia e Farmacologia; ²UNICAMP - Instituto de Biologia

Introdução: A anêmona marinha *Bunodosoma caissarum*, pertencente à classe Cnidária, é endêmica no litoral do sudeste brasileiro e a avaliação toxicológica da peçonha de *B. caissarum* revelou peptídios neurotóxicos e citotóxicos. O objetivo deste trabalho é investigar as alterações produzidas pelo extrato bruto de *Bunodosoma caissarum* (EBBc) na presença do inibidor de endotelina tezosentan, em perfusão de rim isolado. **Métodos e Resultados:** Foram utilizados ratos Wistar com peso entre 250-300g (n = 6). Fez-se uso da técnica descrita por Fonteles et al (Am. J. Physiol., 244, p. 235, 1983) para perfusão de rim isolado de rato. A solução de Krebs-Hanseleit modificada com 6g/dL de albumina foi empregada para perfusão renal nos grupos controle (C) e tratado com PLA₂ do extrato bruto da *Bunodosoma caissarum* na dose de 3µg/mL. O experimento apresentou duração de 120min e o bloqueio com tezosentan (TZN) ocorreu no tempo 0min, sendo o veneno adicionado no tempo 30min. Os dados foram analisados através do teste ANOVA, com *p<0,05. De acordo com os resultados TZN inibiu os efeitos biológicos do EBBc na pressão de perfusão - PP (60min: PP_c=104,17±3,72, PP_{EBBc}=127,7±5,8 e PP_{EBBc+TZN}=106,5±2,9*mmHg; 90min: PP_c=104,73±4,23, PP_{EBBc}=126,1±5,2 e PP_{EBBc+TZN}=106,2±1,6*mmHg; 120min: PP_c=107,62±3,15, PP_{EBBc}=140,1 ± 6,5 e PP_{EBBc+TZN}=119,1 ± 3,5* mmHg), na resistência vascular renal - RVR (60min: RVR_c=4,9 ± 0,16, RVR_{EBBc}=6,48 ± 0,47 e RVR_{EBBc+TZN}= 4,54 ± 0,13* mmHg/mL/g/min; 90min: RVR_c=4,47 ± 0,2, RVR_{EBBc}=6,36 ± 0,37 e RVR_{EBBc+TZN}= 4,53 ± 0,08* mmHg/mL/g/min; 120min: RVR_c=4,71 ± 0,18, RVR_{EBBc}=7,04 ± 0,39 e RVR_{EBBc+TZN}=5,08 ± 0,13* mmHg/mL/g/min) e no fluxo urinário - FU (90min: FU_c=0,195 ± 0,016, FU_{EBBc}=0,27 ± 0,03 e FU_{EBBc + TZN}=0,19 ± 0,02*; 120min: FU_c=0,206 ± 0,019, FU_{EBBc}=0,35 ± 0,05 e FU_{EBBc + TZN}=0,25 ± 0,04* mL/g/min). O TZN interferiu no ritmo de filtração glomerular, não revertendo o efeito apresentado pelo EBBc aos 120min. **Discussão e Conclusão:** De acordo com os resultados observados conclui-se que o tezosentan exerceu importante ação na manutenção da hemodinâmica renal, pois inibiu a ocorrência de efeitos biológicos apresentados pelo extrato bruto de *Bunodosoma caissarum*, como pressão de perfusão, resistência vascular renal e fluxo urinário.

Apoio Financeiro: CNPq

40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

TOXICIDADE AGUDA ORAL DE *Bredemeyera floribunda* Willd. E *Harpalyce brasiliiana* Benth. EM CAMUNDONGOS. Ximenes RM¹; Norões TBS²; ALVES RS²; SOUSA DF²; Jorge ARC³; Santos JVA¹; Araujo RM⁴; Silveira ER⁵; MATOS FJA⁶; Monteiro HSA⁷ - ¹Universidade Federal do Ceará - Departamento de Fisiologia e Farmacologia; ²Universidade Federal do Ceará - Fisiologia e Farmacologia; ³Universidade Federal do Ceará - Farmacologia e Fisiologia; ⁴UFC - Química Orgânica e Inorgânica; ⁵UFC - Química; ⁶Universidade Federal do Ceará - Horto de Plantas Medicinais; ⁷UFC - Fisiologia e Farmacologia

Introdução: A medicina popular utiliza algumas plantas no tratamento de acidentes ofídicos, dentre elas, *Bredemeyera floribunda* e *Harpalyce brasiliiana*, conhecidas no Ceará por “raiz-de-cobra”. O Bredemeyerosídeo D, substância isolada do extrato etanólico das raízes de *B. floribunda*, foi ativo contra o veneno de *Bothrops jararaca* (PARENTE. *Phyto Res*, v.10, p.666, 1996). O extrato etanólico das raízes de *H. brasiliiana* é citado na literatura como fonte de pterocarpanos prenilados, inclusive de cabenegrinas A-I e A-II (MILITÃO. *Bioorg & Med Chem*, v.15, p.6687, 2007), que foram primeiramente isolados do fitoterápico “Específico Pessoa”, ativas contra veneno de *Bothrops atrox* (NAKAGAWA. *Tetrahedron Lett*, v.23, p.3855, 1987). Este trabalho objetivou determinar a toxicidade aguda oral destes dois extratos para início dos estudos farmacológicos.

Métodos: Para o teste de dose limite de 2000mg/kg foram utilizados cinco camundongos Swiss, fêmeas, 35-45 gramas, dispostos em gaiolas e mantidos no local do estudo para aclimatização, com água e comida a vontade. Antes da administração do extrato, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas. O primeiro animal recebeu a dose de 2000mg/kg e foi observado por 14 dias, ao fim dos quais foi sacrificado por deslocamento cervical e os órgãos (cérebro, coração, pulmões, fígado e rins) retirados para análises histopatológicas. Os quatro animais restantes foram submetidos ao mesmo procedimento, dois a dois (STOKES. *Rev. Up-and-Down Proc.*, v. 1, p. 2, 2001).

Resultados: Nenhum dos animais testados com a dose limite morreu nos grupos tratados com extrato hidroalcoólico de *B. floribunda* e de *H. brasiliiana*. Nos órgãos retirados para análise não foram observadas alterações histopatológicas.

Discussão: Extratos de plantas, frações destes e substâncias puras, capazes de reverter efeitos sistêmicos e periféricos de venenos de serpentes são de grande interesse para a farmacologia e para a população que vive em contato com esses animais. Neste aspecto, informações etnobotânicas são importantíssimas na escolha de que espécies estudar. Por se tratarem de plantas utilizadas na medicina popular brasileira de forma aguda, o teste de dose limite de 2000mg/kg foi importante para avaliar a toxicidade aguda oral desses extratos, servindo de parâmetro para as doses que serão utilizadas nos estudos posteriores. Como ambos os extratos tiveram DL₅₀ > 2000mg/kg, eles serão testados no tratamento e reversão dos efeitos dos venenos, assim como suas frações, na tentativa de obter moléculas que possam ser eventuais protótipos para síntese de agentes anti-veneno mais efetivos.

Apoio Financeiro: CNPq, PRONEX, PADCT, CAPES, FUNCAP

40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops lutzi* EM RIM ISOLADO DE RATO Jorge ARC¹; ALVES RS¹; Norões TBS²; SOUSA DF²; Ximenes RM¹; Oliveira IMS³; Silva Neto AG²; Araujo Lima ALGC³; Nojosa DMB⁴; Monteiro HSA¹ - ¹Universidade Federal do Ceará - Departamento de Fisiologia e Farmacologia; ²Universidade Federal do Ceará - Fisiologia e Farmacologia; ³UFC - Departamento de Fisiologia e Farmacologia; ⁴UFC - Departamento de Biologia

INTRODUÇÃO: O acidente ofídico com serpentes do gênero *Bothrops* constitui 87,5% dos casos notificados no Brasil (FUNASA,2001), estudos anteriores com o veneno de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops insularis* em rim isolado de rato mostraram alterações nos parâmetros renais, sugerindo necrose tubular direta em rim. *Bothrops lutzi* apesar de sua ampla distribuição no nordeste brasileiro, não há registro na literatura caracterizando seu veneno e seus principais efeitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos causados pelo veneno da serpente *B. lutzi* em rim isolado de rato. **MÉTODOS:** Os rins de ratos Wistar (n=6) foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6g/dL de albumina por 120 minutos, o veneno bruto da serpente *B. lutzi* (VBI) - 10µg/ml - foi fornecido pela Profa. Dra. Diva Borges-Nojosa das serpentes obtidas do Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF-UFC) liofilizado, sendo resuspendido em solução de Krebs e adicionado aos 30 minutos após o início do experimento. O controle interno (CI) corresponde aos 30 minutos iniciais. Os dados foram analisados por ANOVA e *t* de Student (**p*<0,05). **RESULTADOS:** O veneno de *B. lutzi* diminuiu a pressão de perfusão (PP) - (CI^{PP}=111,5±2,5; v_BI^{PP}⁶⁰=81,0±5,2* mmHg/ mL/g); o fluxo urinário (FU) - (CI^{FU}=0,159±0,019; v_BI^{FU}⁶⁰=0,091±0,022* mL/g/min) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) - (CI^{RFG}=0,754±0,089; v_BI^{RFG}⁶⁰=0,457±0,105* mL/g/min) aos 60 minutos, porém o veneno aumentou o fluxo urinário (FU) - (CI^{FU}=0,159±0,019; v_BI^{FU}⁹⁰=0,466±0,093*; v_BI^{FU}¹²⁰=0,981±0,103 mL/g/min) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) - (CI^{RFG}=0,754±0,089; v_BI^{RFG}⁹⁰=1,804±0,347*; v_BI^{RFG}¹²⁰=3,152±0,342* mL/g/min) aos 90 e 120 minutos. O veneno também interfere no transporte de eletrólitos, pois se observa uma redução do percentual de sódio transportado (%TNa⁺) - (CI^{%TNa}⁺=85,41±1,17; v_BI^{%TNa}⁺⁹⁰=73,85±2,07*; v_BI^{%TNa}⁺¹²⁰=67,64±3,60*) e do percentual de cloreto transportado (%TCl⁻) - (CI^{%TCl}⁻=81,65±1,46; v_BI^{%TCl}⁻⁹⁰=73,82±2,11*; v_BI^{%TCl}⁻¹²⁰=67,30±3,70*) aos 90 e 120 minutos. O percentual de potássio transportado aumentou aos 90 minutos (CI^{%TK}⁺=63,59±1,73; v_BI^{%TK}⁺⁹⁰=73,80±2,09*). **DISCUSSÃO:** O veneno de *B. lutzi* apresentou efeitos semelhantes aos da *B. jararacussu*, porém com um efeito diurético bem mais pronunciado, sugerindo nefrotoxicidade tubular direta em rim isolado.

Apoio Financeiro: CNPq

40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

NOVO PEPTÍDEO ISOLADO DO VENENO DE *Tityus serrulatus* EM MODELO DE RIM ISOLADO: UM ESTUDO PRELIMINAR. ALVES RS¹; Martins RD²; Jorge ARC³; Ximenes RM³; Norões TBS⁴; SOUSA DF¹; Leite CAVG¹; Queiroz MGR⁵; Toyama MH⁶; Monteiro HSA⁷ - ¹UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA; ²UFPE - CAv - Nucleo de Nutrição; ³Universidade Federal do Ceará - Farmacologia e Fisiologia; ⁴Universidade Federal do Ceará - Fisiologia e Farmacologia; ⁵UFC - Análises Clínicas; ⁶UNICAMP - Instituto de Biologia; ⁷UFC - Fisiologia e Farmacologia

INTRODUÇÃO: O veneno de *T. serrulatus* (TsV) ocasiona diversos acidentes em todo o país, com maior severidade em crianças. O veneno deste escorpião demonstrou elevação na pressão de perfusão em modelo de rim isolado de rato, sem alteração significativa de eletrólitos (Alves *et al.*, Toxicon 46, p. 271, 2005). O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos renais de um novo peptídeo de 3kDa, natriurético, isolado do veneno de *Tityus serrulatus*, na investigação de seu potencial na excreção de eletrólitos.

MÉTODOS: Seguindo a técnica descrita por Fonteles *et al.*, Am. J. Physiol. 244, p. 235, 1983, foram utilizados ratos Wistar machos (250-280g; n=6). O grupo foi tratado com o peptídeo isolado do veneno (TsP 0,1mg/mL) que foi adicionado aos 30 minutos de perfusão. Os resultados foram analisados por ANOVA e teste *t* de student.

RESULTADOS: Os resultados demonstraram ação máxima do peptídeo sobre a pressão de perfusão (TsP₃₀ = 107,8±0,99; TsP₁₂₀ = 157,3±10,23* mmHg), resistência vascular renal (TsP₃₀ = 4,57±0,08; TsP₁₂₀ = 6,71±0,52* mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹), fluxo urinário (TsP₃₀ = 0,12±0,01; TsP₁₂₀ = 0,50±0,05* mL.g⁻¹.min⁻¹) e ritmo de filtração glomerular (TsP₃₀ = 0,76±0,12; TsP₁₂₀ = 1,70±0,31* mL.g⁻¹.min⁻¹) aos 120 minutos. Em relação ao transporte de eletrólitos houve alteração na reabsorção de sódio (TsP₃₀ = 87,77±1,42; TsP₆₀ = 79,88±2,22*; TsP₉₀ = 79,72 ± 2,04*; TsP₁₂₀ = 71,84 ± 2,90*), potássio (TsP₃₀ = 76,04 ± 3,27; TsP₆₀ = 55,68 ± 7,24*; TsP₉₀ = 53,60 ± 9,03*; TsP₁₂₀ = 56,81 ± 6,46*) e cloreto (TsP₃₀ = 81,90 ± 3,68; TsP₁₂₀ = 69,02 ± 4,64*) durante a perfusão.

DISCUSSÃO: Diversas frações tóxicas vêm sendo isoladas do veneno de *Tityus serrulatus*, entretanto, menos de 1% dos peptídeos presentes no veneno são conhecidos (Possani *et al.*, Eur. J. Biochem 264(2), p. 287, 1999). Algumas destas toxinas já têm estabelecidas ações sobre canais iônicos de sódio (Kalapothakis & Chávez-Olortegui, Toxicon 35, p. 1523, 1997) e potássio (Marangoni *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, p. 1243, 1995). O peptídeo estudado neste trabalho foi isolado da tityustoxina, um polipeptídeo largamente estudado e principal constituinte do veneno escorpiônico. Os resultados com o veneno total não revelaram alteração eletrolítica significativa, entretanto, o peptídeo demonstrou potente ação na excreção de eletrólitos, além de efeitos pressóricos e glomerulares (contribuindo para os efeitos gerais induzidos pelo veneno de *T. serrulatus*), indicando que outros peptídeos presentes podem ter mascarado esse efeito no estudo anterior.

Apoio Financeiro: CNPq

XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología XXX Reunión Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile XXIII Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. III Congreso Iberoamericano de Farmacología

AVALIATION OF DAILY METABOLISM OF RATS UNDER HIGH ORAL INGESTION OF SODIUM CHLORIDE. Jorge, A.R.C.¹; Alves, R.S.¹; Ximenes, R.M.¹; Sousa, D.F. de¹; Havt, A.¹; Silva Neto, A.G.¹; Martins, A.M.C.¹; Fonteles, M.C.¹; Monteiro, H.S.A¹.

¹ UFC – Department of Physiology and Pharmacology.

Introduction: High sodium chloride ingestion activates many physiological pathways to excrete the excess of salt in the body. Peptides produced in intestine control homeostasis of salt and water under high salt ingestion. The aim of this study was showing changes on daily metabolism of rat under high sodium chloride ingestion. **Methods:** Wistar rats, weighing 240 to 280g (n=6), were maintained ten days in metabolic cages. Control group received only water (W), two more groups received 1% and 2% solutions of sodium chloride. We daily analyzed urinary volume, weigh, and food and water consume. All data were analyzed by ANOVA and Student *t*-test with level of significance set at *p<0,05. **Results:** Rat's weights of 2% group decreased after eighth day, compared with control group, while 1% group did not show significative weight lost, ($W_{D8}=301\pm9.7$ g, $2\%_{D8}=260\pm6.8$ g*; $W_{D9}=301\pm10.8$ g, $2\%_{D9}=255\pm9.2$ g* ; $W_{D10}=302\pm11.5$ g, $2\%_{D10}=251\pm10$ g*). Urinary volume and water consume increased, in both treatments, from second day (Urinary volume - $W_{D2}=2.90\pm0.73$ mL, $1\%_{D2}=17.5\pm3.52$ mL*, $2\%_{D2}=34.0\pm1.96$ mL*; $W_{D4}=1.40\pm0.30$ mL, $1\%_{D4}=14.28\pm1.76$ mL*, $2\%_{D4}=78.7\pm7.0$ mL*; $W_{D7}=2.93\pm0.70$ mL, $1\%_{D7}=22.43\pm4.60$ mL*, $2\%_{D7}=74.75\pm7.74$ mL*; $W_{D10}=4.05\pm0.59$ mL, $1\%_{D10}=23.03\pm5.32$ mL*, $2\%_{D10}=81.0\pm8.36$ mL*; Water consume - $W_{D2}=24.0\pm2.45$ mL, $1\%_{D2}=46.0\pm4.30$ mL*, $2\%_{D2}=96.4\pm1.86$ mL*; $W_{D4}=26.0\pm2.45$ mL, $1\%_{D4}=49.0\pm1.88$ mL*, $2\%_{D4}=106.6\pm4.12$ mL*; $W_{D7}=28.0\pm4.89$ mL, $1\%_{D7}=43.0\pm4.40$ mL*, $2\%_{D7}=117.2\pm10.21$ mL*; $W_{D10}=32.0\pm3.39$ mL, $1\%_{D10}=42.0\pm4.64$ mL*, $2\%_{D10}=125.6\pm10.20$ mL* we showed more significative values). Food consume did not show significative among groups. **Conclusion:** These results suggest that a high salt ingestion on diet promote significative changes on daily metabolism of rats.

Financial Support: CNPq

XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología XXX Reunión Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile XXIII Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. III Congreso Iberoamericano de Farmacología

EFFECTS OF HIGH ORAL INGESTION OF SODIUM CHLORIDE IN RENAL FUNCTION OF RATS. Ximenes, R.M.¹; Jorge, A.R.C.¹; Alves, R.S.¹; Norões, T.B.S.¹; Freire, D.S.¹; Santos, J.V.A.¹; Fonteles, M.C.¹; Monteiro, H.S.A.¹.

¹ UFC – Department of Physiology and Pharmacology.

Introduction: Link between intestine and kidneys in regulation of ingested salt on diet is implied in guanilins as signaling; however these ways are complex and still not completed elucidated. The aim of this study was to show renal alterations produced in rats under high ingestion of salt on diet. Methods: Wistar rats, weighing 240 to 280g (n=6), were maintained ten days in metabolic cages. Control group (C) was under water ingestion and another group was under 1% of sodium chloride ingestion (S). After this time, isolated kidneys were perfused with Krebs-Henseleit solution, containing 6g% of previously dialyzed bovine serum albumin, at 37°C and oxygenated with 5% of CO₂ for 120 minutes. All data were analyzed by ANOVA and Student t-test with level of significance set at *p<0,05. Results: Rats, under salt ingestion, kidneys (S) showed an increase, compared with control group, in perfusion pressure (PP_{C30}=106,6±2,2; PP_{S30}=119,4±3,9; PP_{C60}=104,2±3,7; PP_{S60}=136,6±7,6; PP_{C90}=104,7±4,2; PP_{S90}=152,7±10,4; PP_{C120}=107,6±3,1; PP_{S120}=167,7±12,5 mmHg), in renal vascular resistance (RVR_{C30}=4,8±0,2; RVR_{S30}=6,2±0,5; RVR_{C60}=4,9±0,2; RVR_{S60}=6,9±0,5; RVR_{C90}=4,5±0,2; RVR_{S90}=7,6±0,6; RVR_{C120}=4,7±0,2; RVR_{S120}=8,3±0,6 mmHg/mL/g/min), in urinary flow (FU_{C60}=0,16±0,02; FU_{S60}=0,31±0,04; FU_{C90}=0,16±0,2; FU_{S90}=0,40±0,05; FU_{C120}=0,16±0,2; FU_{S120}=0,46±0,06 mL/g/min) and glomerular filtration rate (RFG_{C30}=0,70±0,07; RFG_{S30}=1,04±0,11; RFG_{C60}=0,71±0,05; RFG_{S60}=1,35±0,14; RFG_{C90}=0,63±0,05; RFG_{S90}=1,82±0,18; RFG_{C120}=0,69±0,08; RFG_{S120}=1,96±0,23 mL/g/min). Electrolyte transport did not show significative changes. Conclusion: These finds implies in high sodium chloride ingestion on diet cause diuretic effects in isolated kidneys.

Financial Support: CNPq