

ANDRÉA MARIA ROLIM DA PAZ

EFEITO DE UMA DIETA CARENTE EM ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS DO
DESMAME A IDADE ADULTA SOBRE ASPECTOS ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS
E MOLECULARES RENAIIS

RECIFE/PE
2008

ANDRÉA MARIA ROLIM DA PAZ

EFEITO DE UMA DIETA CARENTE EM ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS DO
DESMAME A IDADE ADULTA SOBRE ASPECTOS ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS
E MOLECULARES RENAIIS

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre, pelo curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas na
área de concentração Fisiologia, do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen de Castro Chaves.

RECIFE/PE
2008

Paz, Andréa Maria Rolim da

Efeito de uma dieta carente em ácidos graxos essenciais do desmame a idade adulta sobre aspectos estruturais, funcionais e moleculares renais / Andréa Maria Rolim da Paz. – Recife : O Autor, 2008.

84 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Função renal – Carência em ácidos graxos essenciais. I. Título.

612
612

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-030

ANDRÉA MARIA ROLIM DA PAZ

EFEITO DE UMA DIETA CARENTE EM ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS DO
DESMAME A IDADE ADULTA SOBRE ASPECTOS ESTRUTURAIS, FUNCIONAIS
E MOLECULARES RENAIIS

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre, pelo curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas na
área de concentração Fisiologia, do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco.

Aprovada em: 30/12/08



Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Anísio Francisco Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Aos meus pais, **Alisson e Ilma**, pelo amor, incentivo e apoio durante toda a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre esteve presente na minha vida e por me sustentar nos momentos mais difíceis. Acredito que sem ele, nada teria sentido.

Aos **meus pais**, pelo amor incondicional, sustento em toda minha educação e por apoiarem os meus sonhos.

Aos meus irmãos, **Alexandre e Adriano**, pelos incentivos e ajuda constante.

À professora **Dra. Carmen de Castro Chaves** por aceitar-me como sua orientanda, pela confiança, apoio, orientação, amizade e ajuda na realização deste trabalho.

Aos professores da UFRJ, **Adalberto Vieyra, Jennifer Lowe, Lucienne Lara, e Marcelo Lamas**, pela ajuda e aprendizado nos experimentos moleculares das ATPases.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, em especial, **José Paulo e Nielson**, pela amizade e ajuda na elaboração das dietas e no manuseio do analisador seletivo de íons.

Ao amigo **Paulo André**, pela ajuda na realização dos experimentos moleculares e agradável convivência no laboratório de biofísica da UFRJ.

Ao amigo **Tiago Franca**, pelo auxílio na contagem de glomérulos e morfometria renal, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do LAFIRE, **Diogo, Geórgia, Filipe, Mateus, Nadyr, Tadeu e Valdilene**, pela colaboração na realização dos experimentos e agradável convívio.

Ao médico patologista, **Dr. Luiz Magnata Filho**, pela análise histológica das lâminas dos animais.

A amiga, **Thais Josy**, pela amizade, ajuda, carinho, incentivo, força e conselhos essenciais nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao amigo **João Henrique**, pela amizade e colaboração no auxílio estatístico.

A **Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos esqueci de agradecer, meu pedido de perdão e sinceros agradecimentos.

RESUMO

Uma dieta equilibrada deve fornecer os nutrientes necessários, inclusive os ácidos graxos essenciais (AGE) ao animal, durante toda a vida. O presente trabalho objetivou estudar aspectos funcionais, estruturais e moleculares renais em ratos no crescimento e adultos, em dieta carente em AGE (CAGE) desde o desmame. Os estudos foram realizados em gaiolas metabólicas. Os resultados, expressos como médias $\pm$ DP, foram corrigidos por 100g de peso e considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Apesar de ingestão de sólido similar, os ratos CAGE pesaram menos desde a 6ª semana até adultos. A ingestão de água e a diurese foram similares entre os grupos em todas as semanas, exceto pela maior diurese dos CAGE na 7ª semana. As excreções de proteína e creatinina não diferiram entre os grupos, no crescimento e adultos. Os animais CAGE apresentaram caliurese aumentada na 7ª ($616,5 \pm 135,2$ vs $414,4 \pm 140,5$ $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) e na 8ª semana ($554,7 \pm 135,1$ vs $367,1 \pm 93,2$ $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$), nesta acompanhada de maior natriurese ($351,1 \pm 90,7$ vs $277,4 \pm 96,1$ $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$), que ocorreu, também, na 13ª semana ($256,8 \pm 54$ vs $203,4 \pm 52,1$ $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) quando houve maior consumo alimentar. Na restrição hídrica de 12h, tanto os animais controles como os CAGE concentraram urina, embora estes com natriurese ($223,6 \pm 16$ vs $166,2 \pm 37,7$ $\mu\text{mol}/100\text{g}/12\text{h}$) e caliurese ($169,9 \pm 16,7$ vs $126,2 \pm 22$ $\mu\text{mol}/100\text{g}/12\text{h}$). Nos animais adultos, a CAGE não alterou a filtração glomerular ($342,8 \pm 121,8$ vs $382,9 \pm 113,1$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$), a função tubular proximal (40 ± 20 vs $42,5 \pm 20,9$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$), o manuseio tubular de Na^+ e a estrutura renal, esta tanto à histologia como à morfometria. Entretanto, a CAGE aumentou a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e diminuiu a da Na^+ -ATPase, que não foi estimulada pela angiotensina II nos animais adultos. A ingestão da CAGE desde o desmame retardou o crescimento, aumentou episodicamente a excreção de Na^+ e K^+ , sem afetar a estrutura e a função no adulto, embora tenham ocorrido alterações da atividade ATPásica no túbulo proximal renal.

Palavras-chave: Carência em ácidos graxos essenciais. Filtração glomerular. Função tubular proximal. Estrutura renal. Na^+ - K^+ -ATPase, Na^+ -ATPase.

ABSTRACT

An equilibrated diet must provide the necessities nutrients including essential fatty acids (EFA) during lifetime, but the EFA deficiency (EFAD) affects more in early life and in aging periods. This work intended to evaluate renal structural, functional and molecular aspects in growing and adult rats in EFAD from weaning, compared to control rats (EFAC). Functional studied were held in freely moving rats in metabolic cages. Results, presented as means $\pm$ DP, were corrected to 100 g/body weight and were considered significant at $p \leq 0.05$. In spite of similar diet ingestion, EFAD rats weighed less from 6th week till adults. Protein and creatinine excretions did not differ at both groups at all weeks. Although H₂O ingestion was similar between EFAD and EFAC rats, EFAD presented diuresis and kaliuresis (616.5 ± 135.2 vs 414.4 ± 140.5 $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) at 7th, kaliuresis (554.7 ± 135.1 vs 367.1 ± 93.2 $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) and natriuresis (351.1 ± 90.7 vs 277.4 ± 96.1 $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) at 8th plus natriuresis (256.8 ± 54 vs 203.4 ± 52.1 $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) at 13th week, which was accompanied by a higher diet ingestion. 12h H₂O deprived EFAC and EFAD young adult rats concentrated urine although EFAD presented kaliuresis (169.9 ± 16.7 vs 126.2 ± 22 $\mu\text{mol}/100\text{g}/12\text{h}$) and natriuresis (223.6 ± 16 vs 166.2 ± 37.7 $\mu\text{mol}/100\text{g}/12\text{h}$). Glomerular filtration (342.8 ± 121.8 vs 382.9 ± 113.1 $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$), proximal tubule function (40 ± 20 vs 42.5 ± 20.9 $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) and renal structure, assessed by histology and morphometry, did not differ between EFAC and EFAD young adult rats. However, Na⁺-K⁺-ATPase activity was increased and Na⁺-ATPase activity was reduced but not stimulated by angiotensin II in EFAD young adults rats. Thus, ingestion of EFAD from weaning retarded growth, slightly affected Na⁺ and K⁺ excretions at growth and adults, renal structure, glomerular filtration and proximal tubule function were unaffected in the young adult, in whom ATPases modifications were found at the renal proximal tubule.

Key-words: Essential fatty acid privation. Glomerular filtration. Proximal tubular function. Renal structure. Na⁺-K⁺-ATPase. Na⁺-ATPase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de metabolização do 18:2n-6 e 18:3n-3 através das p. 21 reações de dessaturação, elongação e β -oxidação, formando seus respectivos ácidos graxos poliinsaturados.

Figura 2 - Cronograma dos experimentos evidenciando o início da p. 35 administração da dieta CAGE (3ª semana), os estudos de GM no crescimento (6ª, 7ª, 8ª) e adulto (12ª e 13ª) e a eutanásia (por decapitação) do animal para os estudos de *clearances*, histológico e morfométrico.

Figura 3 - Material para obtenção de homogenato total e da fração de p. 38 membranas de túbulos proximais de rins de ratos.

Figura 4 - Peso corporal (g) do desmame a 13ª semanas de vida, nos p. 41 animais CON e CAGE.

Figura 5 - Ingestão de sólido em 24h (g/100g/24h) nos animais CON e p. 42 CAGE, nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 6 - Hematócrito (%) nos animais CON e CAGE no crescimento e p. 42 adulto jovem.

Figura 7 - Ingestão de água em 24 horas (mL/100g/24h) nos animais CON p. 43 e CAGE nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 8 - Volume urinário em 24h (mL/100g/24h) nos animais CON e p. 43 CAGE, nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 9 - Balanço hídrico em 24h (mL/100g/24h) nos animais CON e p. 44 CAGE, nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 10 - Densidade urinária em 24h (mg/mL) nos animais CON e CAGE, p. 44
nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 11 - Excreção de Na^+ ($U_{\text{Na}^+}V$ - $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) nos animais CON e p. 45
CAGE, nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 12 - Excreção de K^+ ($U_{\text{K}^+}V$ - $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) nos animais CON e p. 45
CAGE, nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 13 - Excreção de creatinina ($U_{\text{cr}}V$ - $\text{mg}/100\text{g}/24\text{h}$) nos animais CON p. 46
e CAGE, nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 14 - Excreção de proteína ($U_{\text{prot}}V$ - $\text{mg}/100\text{g}/24\text{h}$) nos animais CON p. 46
e CAGE, nas fases de crescimento e adulto jovem.

Figura 15 - Peso úmido relativo de órgãos (g/100g) dos animais CON e p. 49
CAGE, adultos.

Figura 16 - Fotomicrografia de rins adultos na coloração HE demonstrando: p. 50
A = região cortical CON (10x), **B** = região cortical CAGE (10x) **C** = região
medular CON (10x), **D** = região medular CAGE (10x).

Figura 17 - Fotomicrografia de rins adultos na coloração HE demonstrando: **E** = p. 51
glomérulo renal CON (40x) (estrela) e espaço urinário (seta), **F** = glomérulo renal
CAGE (40x) (estrela) e espaço urinário (seta), **G** = túbulo contorcido proximal
CON (40x) com microvilosidades (seta) e **H** = túbulo contorcido proximal CAGE
(40x) com microvilosidades (seta).

Figura 18 - Atividade Na^+ , K^+ -ATPásica no homogenato total e fração de p. 52
membranas do túbulo proximal de ratos adultos jovens CON e CAGE.

Figura 19 - Atividade Na^+ -ATPásica da membrana basolateral do túbulo proximal de animais CON e CAGE, adultos jovens; **a** = atividade Na^+ -ATPásica CON sem Ang II, **b** = atividade Na^+ -ATPásica CAGE sem e com angiotensina II, **c** = atividade Na^+ -ATPásica CON com angiotensina II. p. 52

Figura 20 - Efeito de diferentes doses de angiotensina II sobre a atividade da Na^+ -ATPásica na membrana basolateral do túbulo proximal de ratos adultos CON. p. 53

Figura 21 - Efeito de diferentes doses de angiotensina II sobre a atividade Na^+ -ATPásica na membrana basolateral do túbulo proximal de ratos adultos CAGE. p. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual das dietas CON e CAGE. p. 32

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos das dietas CON e CAGE p. 32

Tabela 3 - Prova de concentração de urina em animais CON e CAGE p. 47
adultos jovens.

Tabela 4 - Valores das concentrações plasmáticas de Na^+ , K^+ , Li^+ e Cr p. 47
em CON e CAGE adultos jovens.

Tabela 5 - Volume urinário (V), *Clearances* de creatinina (C_{cr}), Li^+ (C_{Li^+}), p. 48
 Na^+ (C_{Na^+}) e K^+ (C_{K^+}), em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$, e excreções de Li^+ ($\text{U}_{\text{Li}^+}\text{V}$), Na^+
($\text{U}_{\text{Na}^+}\text{V}$) e K^+ ($\text{U}_{\text{K}^+}\text{V}$), em $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$, em CON e CAGE, adultos

Tabela 6 - Carga filtrada (CF_{Na^+}) e aporte distal de Na^+ (AD_{Na^+}), em p. 48
 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$, reabsorção fracional proximal de Na^+ ($\text{RFRP}_{\text{Na}^+}$) e
reabsorção fracional distal de Na^+ I ($\text{RFRD}_{\text{Na}^+} - \text{I}$), em %, nos animais CON
e CAGE, adultos jovens.

Tabela 7 - Áreas dos corpúsculos renais (μm^2), glomérulos (μm^2) e p. 51
espaços urinários (μm^2), e número de glomérulos dos animais CON e
CAGE na 13ª semana de vida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - ácido araquidônico

AD_{Na+} - aporte distal de Na⁺

AGE - ácidos graxos essenciais

ATP - trifosfato de adenosina

BH - balanço hídrico

CON - grupo controle e dieta controle

CAGE - grupo carente e dieta carente

C_{cr} - *clearance* de creatinina

CF_{Na+} - carga filtrada de Na⁺

CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

C_{Li+} - *clearance* de lítio

D - densidade urinária

DHA - ácido docosahexaenóico

DPA - ácido docosapentaenóico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EPA - ácido eicosapentaenóico

FE_{K+} - fração de excreção de K⁺

FE_{Li+} - fração de excreção de Li⁺

FE_{Na+} - fração de excreção de Na⁺

GMI - gaiola metabólica individual

HDL - lipoproteína de alta densidade

IL - ingestão de água

IS - ingestão de sólido

LA - ácido linoléico

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LNA - ácido linolênico

MDCK - Madin Darby canine kidney

NZB - New Zealand Black

NZW F1 - New Zealand White F₁

Pi - fosfato inorgânico

RD - rim direito

RE - rim esquerdo

RFG - ritmo de filtração glomerular

RFrD_{Na+} -I - reabsorção fracional distal de Na⁺ I

RFrP_{Na+} - reabsorção fracional proximal de Na⁺

rpm - rotação por minuto

SPSS - *Statistical Program for Social Sciences*

TD - testículo direito

TE - testículo esquerdo

U_{cr}V - excreção urinária de creatinina

U_{K+}V - excreção urinária de K⁺

U_{Li+}V - excreção urinária de Li⁺

U_{Na+}V - excreção urinária de Na⁺

U_{prot}V - excreção urinária de proteína

V - diurese

VLDL - lipoproteína de muita baixa densidade

Vs - *versus*

LISTA DE SÍMBOLOS

Å - angstrom

$[X]_u$ - concentração urinária

$[X]_p$ - concentração plasmática

Cl^- - cloro

g - grama

HCl - cloreto de hidrogênio

HCO_3^- - bicarbonato

K^+ - potássio

KCl - cloreto de potássio

Li^+ - lítio

LiCl - cloreto de lítio

$MgCl_2$ - cloreto de magnésio

Na^+ - sódio

NaCl - cloreto de sódio

pH - potencial hidrogeniônico

$[Prot]_u$ - concentração urinária de proteína

^{32}Pi - fósforo radioativo

$^{\circ}C$ - graus Celsius

Δ - delta

μ - micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	p. 17
1.1 OS QUATRO PROCESSOS RENAIIS BÁSICOS: FILTRAÇÃO GLOMERULAR, REABSORÇÃO, SECREÇÃO E METABOLISMO TUBULARES.....	p. 17
1.2 FUNÇÃO E ESTRUTURA DAS MEMBRANAS CELULARES.....	p. 18
1.3 OS AGE E SEUS METABÓLITOS.....	p. 19
1.4 FONTES DE AGE E A RELAÇÃO N-6/N-3.....	p. 24
1.5 RELAÇÕES ENTRE FIBROSE CÍSTICA, INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E CAGE.....	p. 24
1.6 Na ⁺ , K ⁺ -ATPASE, Na ⁺ -ATPASE E AÇÃO RENAL DA ANGIOTENSINA II....	p. 26
1.7 JUSTIFICATIVA.....	p. 28
1.8 OBJETIVOS.....	p. 29
1.8.1 Geral.....	p. 29
1.8.2 Específicos.....	p. 29
2. METODOLOGIA.....	p. 31
2.1 MATERIAL.....	p. 31
2.1.1 Animais.....	p. 31
2.1.2 Dieta.....	p. 31
2.1.2.1 Dieta controle.....	p. 31
2.1.2.2 Dieta carente em AGE.....	p. 32
2.2 MÉTODOS.....	p. 33
2.2.1 Grupos experimentais.....	p. 33
2.2.2 Protocolos experimentais.....	p. 33
2.2.2.1 Protocolo 1 - Seguimento do peso e hematócrito.....	p. 33
2.2.2.2 Protocolo 2 - Medida da ingestão de sólido e água, das excreções urinárias de Na ⁺ , K ⁺ , creatinina e proteína em 24h, em ratos acordados não restritos em crescimento e adultos, e prova de concentração de urina no adulto.....	p. 33
2.2.2.3 Protocolo 3 - Medida da função glomerular e tubular proximal e do transporte tubular de Na ⁺ durante 3h, em ratos adultos, acordados e não restritos.....	p. 34

2.2.2.4 Protocolo 4 - Peso de órgãos, histologia e morfometria renal do rato adulto.....	p. 36
2.2.2.5 Protocolo 5 - Obtenção de homogenato total e da fração de membranas de túbulos proximais de rins de ratos adultos.....	p. 36
2.2.2.6 Protocolo 6 - Mensuração da atividade da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase nas membranas basolaterais de túbulos proximais de rins de ratos adultos.....	p. 38
2.2.2.7 Protocolo 7 - Mensuração da atividade da Na ⁺ -ATPase nas membranas basolaterais de túbulos proximais de rins de ratos adultos.....	p. 39
2.2.3 Análise estatística.....	p. 40
2.2.4 Aspectos éticos.....	p. 40
3. RESULTADOS.....	p. 41
3.1 DETERMINAÇÕES DO PESO CORPORAL, INGESTÃO DE SÓLIDO E HEMATÓCRITO.....	p. 41
3.2 MEDIDAS DA INGESTÃO DE ÁGUA, VOLUME E EXCREÇÕES URINÁRIAS DE Na ⁺ , K ⁺ , CREATININA, E PROTEÍNA, NAS FASES DE CRESCIMENTO E ADULTO.....	p. 43
3.3 VOLUME, DENSIDADE E EXCREÇÕES URINÁRIAS DE Na ⁺ E K ⁺ COM 12H DE RESTRIÇÃO HÍDRICA: PROVA DE CONCENTRAÇÃO DE URINA.....	p. 47
3.4 AVALIAÇÕES DA FUNÇÃO GLOMERULAR E TUBULAR PROXIMAL E DO TRANSPORTE TUBULAR DE Na ⁺	p. 47
3.5 PESOS ÚMIDOS RELATIVOS DE ÓRGÃOS.....	p. 49
3.6 ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO RENAL.....	p. 49
3.7 ESTUDO DA ATIVIDADE DA Na ⁺ , K ⁺ - ATPASE E Na ⁺ - ATPASE NO HOMOGENATO E FRAÇÃO DE MEMBRANAS DO TÚBULO PROXIMAL DO RATO.....	p. 52
4. DISCUSSÃO.....	p. 54
5. CONCLUSÃO.....	p. 63
REFERÊNCIAS.....	p. 64
ANEXOS.....	p. 79

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS RINS

Os rins realizam funções essenciais à vida dos animais: regula o equilíbrio hídrico e eletrolítico, excreta restos metabólicos, controla a pressão arterial tanto via controle do volume como gerando substâncias vasoativas, produz eritropoetina e vitamina D e faz gliconeogênese durante o jejum prolongado (EATON; POOLER, 2006). Os quatro processos renais básicos são: filtração glomerular, reabsorção, secreção e metabolismo tubulares (AIRES, 2008).

A filtração glomerular depende do coeficiente de ultrafiltração e da pressão efetiva de ultrafiltração, que impulsionam o fluido para o espaço de Bowman. A composição do filtrado é determinada pela passagem do fluido através do endotélio capilar glomerular, membrana basal e fendas de filtração entre os podócitos. A filtração glomerular pode ser modificada por mudanças na pressão efetiva ou no coeficiente de ultrafiltração (KOEPPEN; STANTON, 2001).

O rim, entre pressões arteriais médias de 80-180 mmHg, possui dois mecanismos de autoregulação, a resposta miogênica e o *feedback* tubuloglomerular e, habitualmente, mantém a filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal em níveis adequados. A primeira consiste no estiramento ou relaxamento do músculo liso das arteríolas face à alterações nas pressões. No *feedback* túbuloglomerular, a contração das arteríolas é modificada pela variação na concentração de Na^+ e Cl^- do fluido tubular que banha as células da mácula densa (EATON; POOLER, 2006).

Reabsorção, secreção e metabolismo tubulares são processos renais que modificam a composição do fluido que chega ao túbulo. A passagem de solutos do epitélio tubular para o interstício e vice-versa, envolve transportes passivos, ativos primários e secundários. Resumidamente: na reabsorção os solutos retornam à circulação sistêmica atraídos pela elevada pressão oncótica dos capilares peritubulares; na secreção, substâncias endógenas e drogas difundem dos capilares peritubulares para a luz tubular, para serem excretadas na urina (AIRES, 2008); no metabolismo, células tubulares degradam substâncias por endocitose e sintetizam outras (EATON; POOLER, 2006).

O túbulo proximal é o segmento mais ativo do rim: reabsorve 66% da água, Na^+ , Cl^- e K^+ e 100% da glicose, aminoácidos e HCO_3^- filtrados; secreta ânions e cátions endógenos e exógenos; e metaboliza substâncias. As microvilosidades da borda-em-escova luminal aumentam a área de transporte e seus transportadores específicos, proporcionam a alta capacidade de transporte deste epitélio (AIRES, 2008; KOEPPEN; STANTON, 2001).

1.2 FUNÇÃO E ESTRUTURA DAS MEMBRANAS CELULARES

A membrana celular envolve a célula, separa-a e comunica-a com o meio extracelular via receptores, enzimas e antígenos, os quais interagem com a matriz, hormônios e outros membros de cascata de sinalização. Além disto, a membrana celular delimita organelas, atua como barreira de permeabilidade, regula as trocas de solutos entre os meios intra e extracelular e, ainda, fornece suporte estrutural através não só da ancoragem de proteínas do citoesqueleto às proteínas da membrana como da criação de junções especializadas (BERNE et al, 2004; SILVERTHORN et al, 2003).

Os principais constituintes da membrana celular são lipídios, proteínas e glicídios, estes em menor proporção. Os lipídios são moléculas anfipáticas com regiões hidrofílica polar e hidrofóbica apolar (AIRES, 2008), agrupadas em bicamadas, contendo proteínas integrais ou periféricas que se movimentam livremente no plano da bicamada - modelo do mosaico fluido (SINGER; NICOLSON, 1972). Recentemente, foi demonstrada a existência de microdomínios regulatórios chamados *rafts* lipídicos, que concentram várias proteínas com importantes funções na transdução do sinal hormonal (VEREB et al, 2003).

Os fosfolipídios são os lipídios mais abundantes da membrana celular, sua região polar contém um glicerol ligado a um fosfato conectado a grupos colina, etanolamina e serina, e originam os principais fosfolipídios de membranas dos mamíferos: fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. Os fosfolipídios são derivados do glicerol, exceto a esfingomielina que é derivada da serina. Na membrana celular há fosfatidilinositol, porém em menor quantidade e, quando clivado, gera moléculas que agem como sinalizadoras intracelulares IP3 e

diacilglicerol. Entretanto, a região apolar dos fosfolípidios contém duas cadeias hidrocarbônicas com ácidos graxos, que diferem pelo comprimento e pela presença ou ausência de dupla ligação resultando em ácido graxo insaturado ou saturado, respectivamente. Essas diferenças influem diretamente na fluidez da membrana e alteram a interação das cadeias dos ácidos graxos entre os fosfolípidios (ALBERTS et al, 2002).

A composição dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, diferentemente das proteínas, depende de sua ingestão na dieta (SIMOPOULOS, 2002). Então, variação no aporte lipídico dietético pode modificar a composição de ácidos graxos dos fosfolípidios, alterando a fluidez da membrana celular e funções a ela associadas, inclusive atividade de enzimas e receptores (MCMURCHIE, 1985). "Mudanças na composição lipídica da membrana são formas convenientes de alterar as propriedades físicas da membrana" (ESCUDERO et al, 1998, p.65). Assim, a dieta carente em ácidos graxos essenciais (CAGE) altera a composição lipídica e a fluidez da membrana, diminui a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membranas microssomais hepáticas (CHRISTON et al, 1988) e da fração microssomal da glândula submandibular (YOKOYAMA; MATSUKAWA, 1991) além de reduzir as atividades da adenilato ciclase e da proteína cinase dependente de monofosfato cíclico de adenosina no coração (ALAM et al, 1995).

1.3 OS AGE E SEUS METABÓLITOS

Os ácidos linoléico (LA) e linolênico (LNA) são ácidos graxos poliinsaturados fundamentais à integridade da pele (WILLIARD et al, 2001), às funções cardiovascular (WIJENDRAN; HAYES, 2004) e reprodutora (RETTSTØL et al, 2001), à fluidez da membrana, à homeostase lipídica, ao crescimento, ao desenvolvimento do sistema nervoso central (PERETTI et al, 2005) e à resposta imune (CALDER; GRIMBLE, 2002). Eles são classificados como ácidos graxos essenciais (AGE) devido à ausência das enzimas $\Delta 12$ e $\Delta 15$, responsáveis pela inserção de dupla ligação na posição n-6 e n-3 da cadeia carbônica do ácido graxo (INNIS, 2003). Os AGE não são sintetizados *de novo* pelos mamíferos e devem ser adquiridos na dieta (AL-TURKMANI; FREEDMAN; LAPOSATA, 2007; DAS, 2006). O

nemátodo *Caenorhabditis elegans* é capaz de sintetizar LA e LNA (MORIMOTO et al, 2005).

O aporte lipídico adequado é fundamental à vida, sobretudo nos seus momentos iniciais e finais. Assim, os AGE são incorporados ao feto no último trimestre da gravidez e têm grande impacto sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central (UAUY; DANGOUR, 2006). Nos períodos fetal e de desenvolvimento infantil, os ácidos docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA) são acumulados no cérebro e retina e a redução nos níveis de DHA resulta em déficits de aprendizado e visual (INNIS, 2003). A velhice, em contrapartida, está associada à redução nos níveis de DHA tanto no cérebro de humanos (SÖDERBERG et al, 1990) quanto no córtex frontal e hipocampo de ratos com dezoito meses de idade (FAVRELIÈRE et al, 2000). A redução nos níveis de DHA no hipocampo está envolvida com déficits de memória da doença de Alzheimer (FAROOQUI; RAPOPORT; HORROCKS, 1997). O consumo elevado de pescado diminui a incidência dessa doença (MORRIS et al, 2003) e da demência (BARBERGER-GATEAU et al, 2002). A diminuição da atividade da $\Delta 6$ -dessaturase no tecido cerebral tem sido sugerida como um mecanismo para tais alterações observadas na velhice (BOURRE; PICIOTTI; DUMONT, 1990).

São sintomas clássicos da CAGE a dermatite, o retardo no crescimento e a infertilidade (LAURITZEN et al, 2001), podendo ocorrer esteatose hepática (WERNER et al, 2005), fragilidade eritrocitária, suscetibilidade à infecção (AHMAD; DASGUPTA; KENNY, 1989; DASGUPTA; KENNY; AHMAD, 1990) e alterações no desenvolvimento e integridade funcional do tecido linfóide (DVORAK; STEPANKOVA, 1992).

Assim, os AGE e seus derivados poliinsaturados atuam nos processos fisiológicos e metabólicos através de três mecanismos: influenciando as propriedades das membranas e, conseqüentemente, dos receptores, sistemas de transportes e canais iônicos; atuando sobre a sinalização, como precursores de eicosanóides (INNIS, 1996; JUMP et al, 1996); e afetando diretamente a transcrição gênica, através da interação com receptores nucleares (BENATTI et al, 2004).

O LA e o LNA, através de reações de dessaturação e alongação, no retículo endoplasmático hepático, são metabolizados em seus respectivos ácidos graxos poliinsaturados. O LA sofre ação da $\Delta 6$ -dessaturase, alongação e posterior dessaturação pela $\Delta 5$ resultando no AA, importante precursor dos eicosanóides.

Adicionalmente, o AA pode ser alongado duas vezes, dessaturado pela $\Delta 6$ e β -oxidado originando o ácido docosapentaenóico (DPA), esquematizado na Figura 1. O LNA, através da ação da $\Delta 6$ -dessaturase, posterior alongação e dessaturação pela $\Delta 5$ origina o EPA, também precursor de eicosanóides. Este ainda pode ser alongado, dessaturado pela $\Delta 6$ e β -oxidado resultando no DHA, conforme Figura 1 (AL-TURKMANI; FREEDMAN; LAPOSATA, 2007).

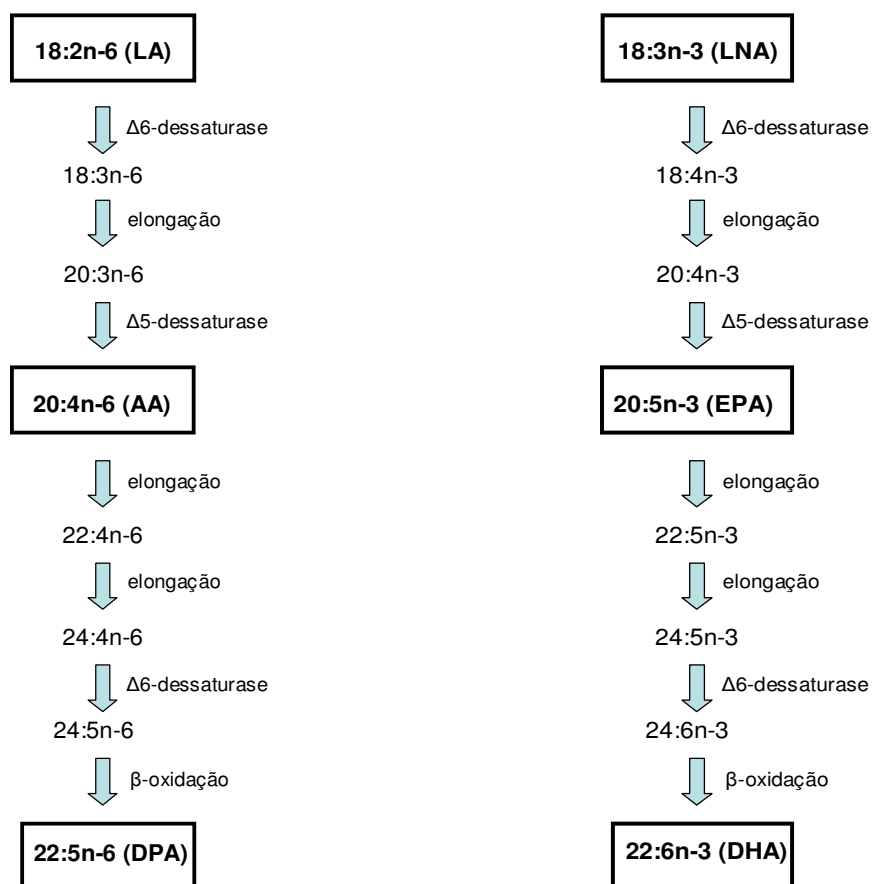


Figura 1 - Esquema de metabolização do 18:2n-6 e 18:2n-3 através de reações de dessaturação, alongação e β -oxidação, formando seus respectivos ácidos graxos poliinsaturados. Fonte: AL-TURKMANI; FREEDMAN; LAPOSATA, 2007.

Os ácidos graxos poliinsaturados derivados do LA alteram os níveis de lipídios do plasma, reduzem o colesterol total e suas frações - lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), embora sem

afetar os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), havendo poucos estudos sobre a redução nos níveis de triglicerídeos totais (BARCELLI, 1991). Portanto, o LA reduz os fatores de risco para a doença coronariana, uma vez que o elevado teor de LA no tecido adiposo de homens saudáveis foi correlacionado com menor mortalidade decorrente de doença coronariana (RIEMERSMA et al, 1986).

O consumo de LNA também protege contra a doença coronariana, pois o aumento desse ácido graxo no tecido adiposo reduz o risco de infarto do miocárdio (BAYLIN et al, 2003). Os efeitos protetores do LNA estão relacionados à menor incidência de arritmias (MCLENNAN; DALLIMORE, 1995), maior complacência arterial (NESTEL et al, 1997) e menor produção de marcadores inflamatórios envolvidos na aterogênese (RALLIDIS et al, 2003). Os ácidos graxos poliinsaturados derivados do LNA também alteram lipídios do plasma: exercem maior efeito sobre a redução de triglicerídeos totais, aumentam os níveis de HDL, mas diminuem pouco o de colesterol total e VLDL (BARCELLI, 1991). Além desses efeitos, os ácidos graxos poliinsaturados derivados do LNA reduzem a viscosidade sanguínea e a agregação plaquetária, têm efeitos antitrombótico e antiinflamatório (KRIS-ETHERTON et al, 2001).

O LA, LNA e ácido oléico competem pelas mesmas dessaturases e elongases para serem metabolizados, as quais preferem o LNA à LA e o LA ao ácido oléico. O aumento de concentração deste último indica deficiência em AGE (DAS, 2007). A atividade das $\Delta 6$ e $\Delta 5$ são inibidas pela ingestão de gorduras saturadas e trans, álcool e colesterol, mas diminui no *diabetes mellitus* e na hipertensão arterial (DAS, 2006). Dietas ricas em gorduras saturadas e trans modificam o metabolismo dos AGE, reduzindo o número de metabólitos com ações antiinflamatórias, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias, iniciando e acelerando, assim, a aterosclerose devido à inflamação persistente (DAS, 2007). Por sua vez, a menor ingestão protéica reduziu a atividade da $\Delta 6$ dessaturase (DAS, 2007) em ratas grávidas, acarretando menor teor de DHA nos fosfolipídios hepáticos da prole no desmame (DE THOMAS; MERCURI; SERRES, 1983).

Tem sido dada grande atenção ao efeito dos ácidos graxos trans sobre o metabolismo dos AGE nos períodos pré e pós-natal. Os ácidos graxos trans são gorduras insaturadas de alimentos industrializados (MOZAFFARIAN et al, 2004), sendo transferidos da mãe para o feto (CRAIG-SCHMIDT, 2001; ELIAS; INNIS, 2001), no qual inibem as dessaturações do LA à AA e do LNA à DHA (INNIS, 2006).

Assim, a exposição da mãe aos ácidos graxos trans pode interferir no crescimento e desenvolvimento da criança (TINOCO et al, 2007).

A ação da fosfolipase A_2 cliva fosfolipídios de membrana e gera AA (THERIEN; BLOSTEIN, 2000) que, dependendo da via enzimática ativada, pode ser convertido a eicosanóides, com importante participação em processos celulares, na regulação da função renal bem como na patogênese de doenças renais. Através da via ciclooxigenase são formados os prostanóides: prostaglandina E_2 , prostaciclina, prostaglandina $F_{2\alpha}$, prostaglandina D_2 e tromboxano A_2 (HAO; BREYER, 2007). Eles modulam o fluxo sanguíneo renal e o ritmo de filtração glomerular principalmente nas condições de reduções do volume circulatório efetivo (MZAIL; NOBLE, 1986; YARED; KON; ICHIKAWA, 1985) e mantêm a pressão arterial pela modulação da excreção renal de Na^+ (ANDERSON et al, 1976; DANIELS et al, 1967).

A via da lipooxigenase forma leucotrienos, ácidos hidróxieicosatetraenóicos e lipoxinas, envolvidos em reações inflamatórias e alérgicas, além de ter efeito vasoconstritor renal (IMIG, 2006), reduzindo o fluxo sanguíneo renal e o ritmo de filtração glomerular (KATOH et al, 1992).

O rim é um dos órgãos com maior atividade citocromo P450 (IMIG, 1999), formando os ácidos 20-hidróxieicosatetraenóico, dihidróxieicosatetraenóico e epóxieicosatetraenóico, os quais funcionam como segundos mensageiros na regulação da função vascular e tubular renal (MAIER; ROMAN, 2001). O 20-hidróxieicosatetraenóico causa vasoconstrição nas arteríolas aferentes associada ao *feedback* tubuloglomerular (ZOU et al, 1994) e à resposta miogênica (IMIG et al, 1996), além de induzir natriurese através da inibição da Na^+ , K^+ -ATPase no túbulo proximal e do co-transportador Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ no ramo ascendente espesso da alça de Henle (ROMAN et al, 2000). Ao contrário, o ácido epóxieicosatetraenóico é vasodilatador (IMIG, 2006) e promove natriurese via inibição do canal epitelial de Na^+ no túbulo distal (NAKAGAWA et al, 2006).

O AA é o principal, mas não o único precursor da síntese de eicosanóides (CALDER; GRIMBLE, 2002), pois os ácidos dihomogama-linolênico e EPA formam essas moléculas com importantes funções homeostáticas (DAS, 2007).

1.4 FONTES DE AGE E A RELAÇÃO N-6/N-3

O LA é encontrado principalmente em óleos vegetais (LEITZMANN et al, 2004), estando acima de 80% dos ácidos graxos encontrados nos óleos de milho, girassol, cártamo e soja (CALDER; GRIMBLE, 2002). O LNA também está presente em alguns óleos vegetais como soja, canola, linhaça e milho, além de nozes, feijão, brócolis e vegetais verdes frondosos (HUNTER, 1990; SIMOPOULOS, 1999). Entretanto, a maior fonte de LNA é o óleo de linhaça, onde chega a corresponder a mais de 60% dos ácidos graxos (CALDER; GRIMBLE, 2002). O EPA e DHA são encontrados em peixes oleosos como sardinha, arenque, atum e cavala e, ainda, em óleo de fígado de bacalhau (CALDER; GRIMBLE, 2002). A concentração do LNA é variável nos óleos vegetais e, por exemplo, 100g de óleo de soja contém 6,8g do LNA e 100g de óleo de milho contém apenas 1,0g do LNA (HUNTER, 1990).

As quantidades recomendadas de LA e LNA variam: 6,4% de LA para homens consumindo 2.400kcal/d e para mulheres com dieta de 1.700kcal/d e 0,6% de LNA para homens e mulheres resultando na proporção n-6:n-3 de 10:1 (TRUMBO et al, 2002). Outra recomendação é 5-8% de LA, 0,75% de LNA e 0,25% de EPA+DHA para adultos consumindo 2.000kcal/d, numa proporção n-6:n-3 de 6:1 (WIJENDRAN; HAYES, 2004).

1.5 RELAÇÕES ENTRE FIBROSE CÍSTICA, INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E CAGE

A fibrose cística, doença hereditária que afeta 1: 2.500 recém-nascidos brancos, é causada por mutação no gene que codifica a proteína de membrana *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), a qual funciona como um canal de cloro. A doença caracteriza-se por secreções viscosas no pâncreas, pulmões, intestinos e trato genito-urinário, que resultam em insuficiência pancreática, má-absorção e freqüentes infecções pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa* (AL-TURKMANI; FREEDMAN; LAPOSATA, 2007). Pacientes com fibrose cística tem aumento da filtração glomerular, aumento das reabsorções

proximal e distal de Na^+ (STENVINKEL et al, 1991) e menor excreção urinária de sódio tanto basal como em sobrecarga (BERG; KUSOFFSKY; STRANDVIK, 1982). Aproximadamente 85% dos pacientes com fibrose cística apresentam CAGE (FARRELL et al, 1985; LEPAGE et al, 1989). Em crianças, a CAGE, caracteriza-se por lesões na pele, maior susceptibilidade a infecções, trombocitopenia e retardo no crescimento (WOOD et al, 2003). Adultos com fibrose cística apresentam redução nos níveis de LA, AA e DHA, bem como níveis plasmáticos elevados dos ácidos eicosatrienóico, oléico e palmitoléico, aumentando a relação trieno/tetraeno, um índice seguro da presença de CAGE (PERETTI et al, 2005). Um dos mecanismos propostos para o surgimento da CAGE é a mudança no metabolismo dos AGE, alterando sua incorporação nos fosfolipídios da membrana celular e a redução na atividade das dessaturases (FARRELL et al, 1985; LEVY et al, 1993). Tem sido observada uma relação entre o CFTR e o metabolismo de AGE, pois o canal defeituoso reduz a incorporação de LA nos fosfolipídios dos tecidos acometidos por fibrose cística (BHURA-BANDALI et al, 2000). Assim, é importante monitorar os níveis de AGE nos pacientes com fibrose cística, pois a CAGE pode contribuir para a sua patofisiologia, afetando o transporte lipídico intestinal e, conseqüentemente, a evolução clínica da doença (PERETTI et al, 2005). A suplementação com DHA e EPA durante oito meses reduziu a inflamação e melhorou a função pulmonar de pacientes com fibrose cística (DE VIZIA et al, 2003).

Pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise também apresentavam CAGE: redução no conteúdo total de ácidos graxos poliinsaturados e aumento no conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados e saturados nas membranas dos eritrócitos. Esta CAGE pode ser decorrente do processo inflamatório crônico, com ativação da resposta imune acionada pela passagem do sangue na circulação extracorpórea (KOORTS; VILJOEN; KRUGER, 2002). Pacientes nas mesmas condições acima tinham CAGE com menores concentrações do ácido eicosatrienóico, EPA e AA, e maior do oléico (PECK et al, 1997).

Na nefrectomia 3/4, a ingestão de dieta tendo 27% de LA aumentou a produção de prostaglandina E_2 no córtex e reduziu a proteinúria e a esclerose glomerular renal (BARCELLI et al, 1986). Na nefrectomia 1/4, a dieta com teor elevado de LA reduziu os dois últimos parâmetros e, também, aumentou o ritmo de filtração glomerular, o fluxo sanguíneo renal e o LA nos fosfolipídios renais (HEIFETS et al, 1987). Na nefrectomia 5/6, a suplementação com óleo de peixe

diminuiu a albuminúria (CLARK et al, 1990a), a esclerose glomerular e a deposição de fibrina no glomérulo, minimizando a redução no ritmo de filtração glomerular (CLARK et al, 1990b), enquanto a suplementação com óleo de linhaça reduziu a injúria glomerular e o declínio no ritmo de filtração glomerular (INGRAM et al, 1995).

1.6 Na^+ , K^+ -ATPASE, Na^+ -ATPASE E AÇÃO RENAL DA ANGIOTENSINA II

A Na^+ , K^+ -ATPase, enzima presente na membrana basolateral das células tubulares renais, transporta três íons Na^+ para o meio intersticial/extracelular e dois íons K^+ para o intracelular, mantendo o elevado gradiente de Na^+ e K^+ através da membrana celular (THERIEN; BLOSTEIN, 2000). Esta enzima está envolvida na regulação do volume extracelular, da pressão arterial (BELTOWSKI et al, 2004), do pH citoplasmático e dos níveis de Ca^{2+} , além de co ou contra transportar, no túbulo proximal, substâncias essenciais como glicose e aminoácidos (THERIEN; BLOSTEIN, 2000). A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase pode ser modulada por hormônios como dopamina, aldosterona e angiotensina II, cujos mecanismos de sinalização ocorrem pela proteína cinase C (FERAILLE; DOUCET, 2001) e, também, por mudanças no aporte lipídico da dieta (THERIEN; BLOSTEIN, 2000).

A Na^+ -ATPase é outra enzima importante na homeostase do Na^+ , também localizada na membrana basolateral das células do túbulo proximal, sendo responsável pelo ajuste fino da reabsorção de Na^+ , enquanto a Na^+ , K^+ -ATPase é responsável pela maior parte da reabsorção de Na^+ no túbulo proximal (LARA et al, 2002). As atividades da Na^+ , K^+ -ATPase e da Na^+ -ATPase são reguladas pelo sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, especificamente pelos peptídeos angiotensina II e Ang (1-7), que aumentam a atividade da Na^+ -ATPase (CARUSO NEVES et al, 2001).

A angiotensina II é um hormônio do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, o qual atua na regulação da pressão sanguínea e homeostase cardiovascular (CARUSO NEVES et al, 2001). Além da angiotensina II, outros peptídeos atuam no sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona: angiotensina III, angiotensina IV e angiotensina 1-7 (SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000). A angiotensina II, dependendo da concentração, exerce efeito

inibitório (10^{-7} - 10^{-5} M) ou estimulatório (10^{-12} - 10^{-10}) sobre a reabsorção de Na^+ no túbulo proximal (HARRIS; YOUNG, 1977). A angiotensina II mantém o volume do extracelular, agindo diretamente sobre a arteríola eferente, promovendo vasoconstrição e sobre o túbulo proximal, aumentando a reabsorção de Na^+ (ICHIKAWA; HARRIS, 1991) via elevação nas atividades do antiporte Na^+/H^+ , cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ e Na^+ , K^+ -ATPase. (HARRIS et al, 1996). A angiotensina II também mantém o volume do extracelular, indiretamente, através da estimulação simpática (HALL, 1986) e do aumento da liberação de aldosterona (ICHIKAWA; HARRIS, 1991). As ações renais da angiotensina II ocorrem através dos receptores AT_1 e AT_2 , distribuídos nas membranas luminal e basolateral do túbulo proximal (BURNS; INAGAMI; HARRIS, 1993), onde o AT_1 é o principal responsável pela reabsorção de Na^+ (BURNS; INAGAMI; HARRIS, 1993; MUJAIS; KAUFFMAN; KATZ, 1986).

1.7 JUSTIFICATIVA

A nutrição é o fator ambiental mais importante para determinar doenças nos indivíduos susceptíveis geneticamente (SIMOPOULOS, 2002). Uma dieta equilibrada é importante durante toda a vida, fornecendo os lipídios necessários para manter níveis adequados dos AGE. Assim, dietas com baixo teor lipídico, obesidade, regimes inadequados, pós-operatório e outras patologias podem acarretar CAGE.

Numerosos estudos com dietas severamente deficientes em ALA no período perinatal encontraram alteração na função visual e problemas comportamentais, evidenciando a sensibilidade do tecido nervoso a CAGE nesta fase da vida. Entretanto, efeitos da CAGE pós-desmame sobre o rim têm sido pouco estudados, apesar de sua importância para a homeostase e o balanço hidro-eletrolítico.

A CAGE ocorre na fibrose cística e em pacientes em terapia renal substitutiva. Assim, estudos que determinem suas consequências sobre o desenvolvimento do rim são relevantes visando caracterizar as alterações funcionais, estruturais e moleculares dessa deficiência lipídica. A perda de sua função - insuficiência renal crônica - resulta em terapia renal substitutiva como a hemodiálise e diálise peritoneal ambulatorial contínua, as quais são extremamente onerosas aos cofres públicos. Conhecer e ajudar a prevenir a perda dessa importante função resulta numa substancial economia para o Estado e a sociedade.

Dessa forma, este estudo, utilizando dieta desde o desmame com óleo de soja como fonte de AGE e empregando ratos certificados no estado vígil em gaiolas metabólicas de qualidade, deverá fornecer subsídios para uma melhor compreensão da CAGE e suas repercussões funcionais, estruturais e moleculares sobre o rim.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Geral

Avaliar as repercussões da ingestão de uma dieta carente em AGE desde o desmame, sobre aspectos estruturais, funcionais e moleculares renais em ratos no crescimento e adulto jovem.

1.8.2 Específicos

1.8.2.1 Acompanhar o desenvolvimento ponderal até adulto jovem.

1.8.2.2 Seguir o hematócrito até adulto jovem.

1.8.2.3 Medir a ingestão diária de sólido e o balanço hídrico até adulto jovem.

1.8.2.4 Avaliar a excreção urinária diária de Na^+ , K^+ , proteína e creatinina até adulto jovem.

1.8.2.5 Medir função glomerular, tubular proximal e transporte tubular de Na^+ no adulto jovem.

1.8.2.6 Determinar os pesos úmidos relativos do baço, coração, fígado, pulmão, rim direito (RD), rim esquerdo (RE), testículo D (TD) e testículo E (TE) no adulto jovem.

1.8.2.7 Avaliar as atividades da Na^+ , K^+ -ATPase e da Na^+ -ATPase no homogenato total e nas frações de membrana de córtex renal do túbulo proximal de rim de rato adulto jovem .

1.8.2.8 Analisar a histologia renal no animal adulto jovem.

1.8.2.9 Determinar o número de glomérulos, as áreas corpusculares, glomerulares e o espaço urinário no adulto jovem.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAL

2.1.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar certificados, descendentes de reprodutores e matrizes do biotério da UNIFESP-EPM. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura variável entre $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclos claro-escuro de 12/12h, umidade de $55\pm 5\%$ com água e ração comercial (Anexos A e B) *ad libitum* no Laboratório de Fisiologia Renal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram acasalados segundo o regime poligâmico temporário (VALERO, 1990) e as gestantes permaneceram em gaiolas individuais até o desmame. Um dia após o parto, as lactentes foram descartadas, sendo mantidos oito machos por mãe. Os animais foram marcados no 21º dia de vida e desmamados no 22º, quando foram pesados e alocados aleatoriamente para o grupo controle ou experimental, conforme a dieta recebida, sendo dispostos em quatro animais por gaiola até adultos jovens.

Foram utilizados dois grupos de 12 animais controles e experimentais, totalizando 48 animais empregados nos estudos funcionais e 24 nos estudos moleculares.

2.1.2 Dieta

2.1.2.1 Dieta controle (CON), com aporte lipídico proveniente do óleo de soja, rica em AGE, contendo cerca de 2,7% de LA (18:2n-6) e 0,05% de LNA (18:3n-3), dados sumarizados nas Tabelas 1, 2 e Anexo C.

2.1.2.2 Dieta carente em AGE (CAGE), com aporte lipídico proveniente do óleo hidrogenado de côco, contendo 0,01% de LA e sendo praticamente isenta de LNA (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1- Composição percentual das dietas CON e CAGE.

COMPOSIÇÃO	DIETAS	
	CON	CAGE
Caseína	20,7	20,7
Óleo de soja	5,0	-
Óleo de côco	-	5,0
Sacarose	21,0	21,0
Celulose	1,8	1,8
Amido de milho	46,8	46,8
Complexo mineral ¹	3,7	3,7
Complexo vitamínico	0,9	0,9
DL-metionina	0,1	0,1

Fonte: Arfi, 1987

Tabela 2- Composição de ácidos graxos das dietas CON e CAGE

ÁCIDOS GRAXOS	APORTE LIPÍDICO DA DIETA			
	CON		CAGE	
	% de AG	% da dieta	% de AG	% da dieta
8:00	-	-	6,4	0,32
10:00	-	-	7,4	0,37
12:00	-	-	51,0	2,55
14:00	1,4	0,07	18,0	0,90
16:00	11,4	0,57	8,4	0,42
18:00	2,9	0,15	8,0	0,40
18:1n-9	26,2	1,31	0,5	0,02
18:2n-6	54,0	2,70	0,2	0,01
18:3n-3	1,0	0,05	-	-
20:00	0,2	0,01	-	-
20:1n-9	0,1	0,01	-	-
22:00	0,2	0,01	-	-
24:00	0,2	0,01	-	-

Fonte: Soares, M.C. et al, 1995 modificado

¹Composição percentual: CaHPO₄.2H₂O (38); K₂HPO₄ (24); CaCO₃ (18,1); NaCl (7); MgO (2); MgSO₄.7H₂O (9); Na₂SeO₃.5H₂O (0,001); FeSO₄.7H₂O (0,7); ZnSO₄.H₂O (0,5); MnSO₄.H₂O (0,5); CuSO₄.5H₂O (0,1); NaF (0,1); Al₂(SO₄)₃.K₂SO₄.24H₂O (0,02); KI (0,008).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Grupos experimentais

Grupo controle (CON), no qual os ratos receberam a dieta CON, e grupo carente em AGE (CAGE), cujos ratos receberam a dieta CAGE.

2.2.2 Protocolos experimentais

2.2.2.1 Protocolo 1 - Seguimento do peso e hematócrito.

Todos os animais foram pesados a cada sete dias. Nas 4^a, 8^a e 12^a semanas de vida foram coletadas amostras de sangue em tubos capilares heparinizados, centrifugados durante 3 minutos em microcentrífuga e realizada a medida do hematócrito em régua padrão.

2.2.2.2 Protocolo 2 - Medida da ingestão de sólido e água e da excreção urinária de Na⁺, K⁺, creatinina e proteína em 24h no crescimento e adultos, e prova de concentração de urina no adulto.

Os animais foram previamente adaptados às GMI até nelas permanecerem durante 24h sem apresentarem sinais de estresse (MILLS et al, 1994). A partir do 36º dia de vida (início da 6ª semana), os animais foram colocados nas GMI durante 24h para os estudos de função renal no crescimento (6ª, 7ª e 8ª semanas) e no adulto (12ª e 13ª semanas), conforme Figura 2. A água e ração foram medidas antes do início e ao fim de cada experimento e a urina foi coletada continuamente sob camada de óleo mineral, sendo avaliados os seguintes parâmetros:

- a) A ingestão de sólido (IS), em g/100g/24h, foi determinada em balança mecânica pela diferença entre o peso inicial e o final, para obter o consumo do animal em 24h;
- b) A ingestão de água (IL), em mL/100g/24h, foi avaliada por método volumétrico, igualmente subtraindo o valor final do inicial para obter o consumo em 24h;
- c) O volume urinário (V), em mL/100g/24h, também foi medida por método volumétrico;
- d) O balanço hídrico (BH), em mL/100g/24h, foi calculado pela fórmula: $IL - V$;
- e) A densidade urinária (D), em mg/mL, foi avaliada em refratômetro para urina;
- f) As concentrações urinárias de Na^+ ($[Na^+]_u$) e K^+ ($[K^+]_u$), em $\mu\text{mol/mL}$, foram determinadas em analisador seletivo de íons;
- g) As excreções urinárias de Na^+ ($U_{Na^+}V$) e K^+ ($U_{K^+}V$), em $\mu\text{mol/100g/24h}$, foram calculadas pela fórmula: $V \times ([X^+]_u)$;
- h) A concentração urinária de proteína ($[Prot]_u$) foi mensurada pela precipitação com ácido sulfossalicílico a 3% (BRADLEY; SCHUMANN; WARD, 1979);
- i) A excreção urinária de proteína ($U_{prot}V$), em mg/100g/24h, foi calculada pela fórmula: $V \times ([Prot]_u)$;
- j) A concentração urinária de creatinina ($[Cr]_u$) foi determinada por reagentes comerciais padronizados (kit) baseada na reação de Jaffé (BARTELS; BOHMER, 1973);
- k) A excreção urinária de creatinina ($U_{cr}V$), em mg/100g/24h, foi calculada pela fórmula: $V \times ([Cr]_u)$;
- l) A prova de concentração de urina foi realizada na 13ª semana de vida, em animais com restrição hídrica e livre acesso às rações durante 12h nas GMI, quando foram medidos o V, D, $U_{Na^+}V$ e $U_{K^+}V$.

2.2.2.3 Protocolo 3 - Medida da filtração glomerular e função tubular proximal e do transporte tubular de Na^+ durante 3h, em ratos adultos, acordados e não restritos.

A filtração glomerular e a função tubular proximal foram avaliadas, respectivamente, pelos *clearances* simultâneos de creatinina (C_{cr}) e de Li^+ (C_{Li^+}), em

ratos adultos jovens (13ª semana de vida) acordados segundo protocolos modificados (AMARO et al, 1997; GARCIA; GONTIJO; FIGUEIREDO, 1991). Doze horas antes de serem dispostos nas GMI, os ratos receberam 0,06 mEq/100 g de peso corporal de LiCl por via orogástrica, sendo mantidos em jejum de sólido e com livre acesso à água. Na manhã seguinte, os ratos receberam uma expansão com água a 5% dos seus pesos respectivos, via orogástrica, em duas etapas: 3 e 2 mL/100g, respectivamente 60 e 20 min antes de serem dispostos nas GMI, visando obter um grande fluxo urinário e inibir o hormônio antidiurético (GARCIA; GONTIJO; FIGUEIREDO, 1991; THOMSEN, 1990). Os ratos foram dispostos nas GMI durante 3h, com coleta contínua de urina e em jejum de líquido e de sólido. Nas amostras de urina foram medidos o volume, a densidade, o pH e as concentrações de Na^+ , K^+ , Li^+ e Cr para calcular as respectivas excreções. Amostras de sangue foram coletadas por decapitação (Figura 2), centrifugadas durante 20 min para obtenção do soro e, em seguida, foram determinadas as concentrações de Na^+ , K^+ , Li^+ e Cr, para possibilitar o cálculo dos respectivos *clearances*. O V foi corrigido para mL/100 g de peso dos ratos. Foram calculadas, ainda, a carga filtrada de Na^+ (CF_{Na^+}) e o manuseio tubular de Na^+ através do aporte distal (AD_{Na^+}), reabsorção fracional proximal ($\text{RFRP}_{\text{Na}^+}$) e reabsorção fracional distal I de Na^+ ($\text{RFRD}_{\text{Na}^+ - \text{I}}$) segundo as equações no Anexo D.

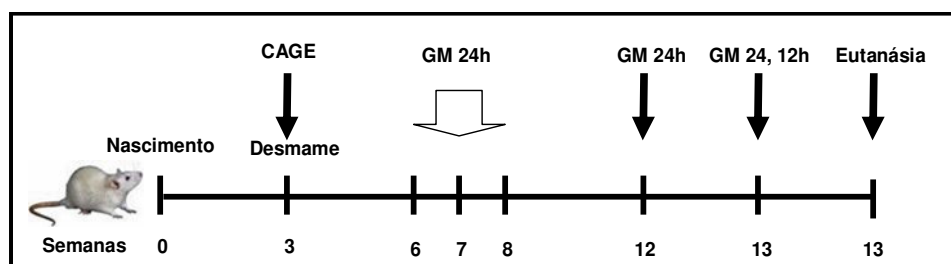


Figura 2 - Cronograma dos experimentos evidenciando o início da administração da dieta CAGE (3ª semana), os estudos de GM no crescimento (6ª, 7ª, 8ª) e adulto (12ª e 13ª) e a eutanásia (por decapitação) do animal para os estudos de *clearance*, histológico e morfométrico.

2.2.2.4 Protocolo 4 - Peso de órgãos, histologia e morfometria renal do rato adulto.

Após o *clearance*, foram imediatamente retirados e pesados (peso úmido) o coração, pulmões, fígado, baço, rins e testículos. O rim esquerdo foi seccionado longitudinalmente e imerso em formol a 10% até ser processado para o estudo histológico, quando sofreu desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina. O rim foi então cortado com 5µm de espessura e corado pela técnica Hematoxilina Eosina (MICHALANY, 1980), para avaliar a estrutura organizacional do tecido renal.

Após a análise histológica, sete lâminas de cada grupo foram selecionadas para a contagem de glomérulos, medida das áreas corpusculares, glomerulares e do espaço urinário. Foram pesquisados cinquenta campos de cada lâmina com um microscópio óptico, e um contador manual determinou o número de glomérulos por campo. As áreas dos corpúsculos e glomérulos renais foram medidas com o microscópio óptico, acoplado a um microcomputador com o programa para captação de imagem, VCR III. Foram obtidas 50 imagens de corpúsculos renais por lâmina e, através do programa *Scion Image-Beta 4.0:2*, as imagens foram submetidas à análise morfométrica. A partir dos valores médios obtidos, foi calculada a diferença entre a área dos corpúsculos e glomérulos renais para medir os espaços urinários.

2.2.2.5 Protocolo 5 - Obtenção de homogenato total e da fração de membranas de túbulos proximais de rins de ratos adultos.

Os estudos de aspectos moleculares da função tubular proximal foram viabilizados através da cooperação com o Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da UFRJ (PROCAD 8052) em 24 ratos machos adultos jovens, sendo 12 em dieta CON e 12 em CAGE. Após adaptados, os animais foram sacrificados por decapitação, os rins foram retirados e imediatamente colocados em solução isotônica tamponada contendo sacarose 250 mM, Hepes-tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM e inibidor de tripsina (tipo II-S) 0,15 mg/mL, a 4 °C.

As preparações de homogenato total de córtex renal de rim e da fração de membranas foram obtidas segundo o protocolo vigente (VIEYRA et al, 1986; COKA-GUEVARA et al, 1999), modificado. Ainda nesta solução, os rins foram decapsulados, finas fatias de córtex foram removidas com bisturi e, posteriormente, com um micrótomo com navalha de aço, para retirar apenas a porção mais externa do córtex, composta principalmente de túbulos proximais (BOUMENDIL-PODEVIN; PODEVIN, 1983). As fatias foram pesadas e foi adicionada a solução acima, em volume superior a quatro vezes a massa das fatias (1g/4 mL). As fatias foram picadas e homogeneizadas 20 vezes a 2000 rpm em homogeneizador de vidro e bastão de teflon. A suspensão foi, então, centrifugada a $1000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C , numa centrífuga SORVALL RC-5B, empregando um rotor SS-34. O sobrenadante foi centrifugado a $15000 \times g$ durante 20 minutos em condições similares às anteriores, para sedimentar as mitocôndrias e os ribossomos. O sobrenadante, contendo fragmentos de membranas e fragmentos de retículo endoplasmático, foi novamente centrifugado numa ultracentrífuga BECKMAN L5-50B, utilizando um rotor 70 Ti a $35000 \times g$ durante 45 minutos.

Nesta centrifugação foram sedimentadas as membranas luminal e basolateral, em parte resseladas em vesículas (~10 % do total) (BOUMENDIL-PODEVIN; PODEVIN, 1983). O sedimento foi ressuspensionado e homogeneizado suavemente em solução isotônica de sacarose 250 mM, dividido em tubos *eppendorf* e estocados a -20°C . Finda a preparação, a concentração de proteína da fração de membranas e do homogenato total foi dosada por método que emprega o reagente de Folin (LOWRY et al, 1951), colocando SDS 2,5 % (p/v) para solubilizar adequadamente as proteínas integrais das membranas.

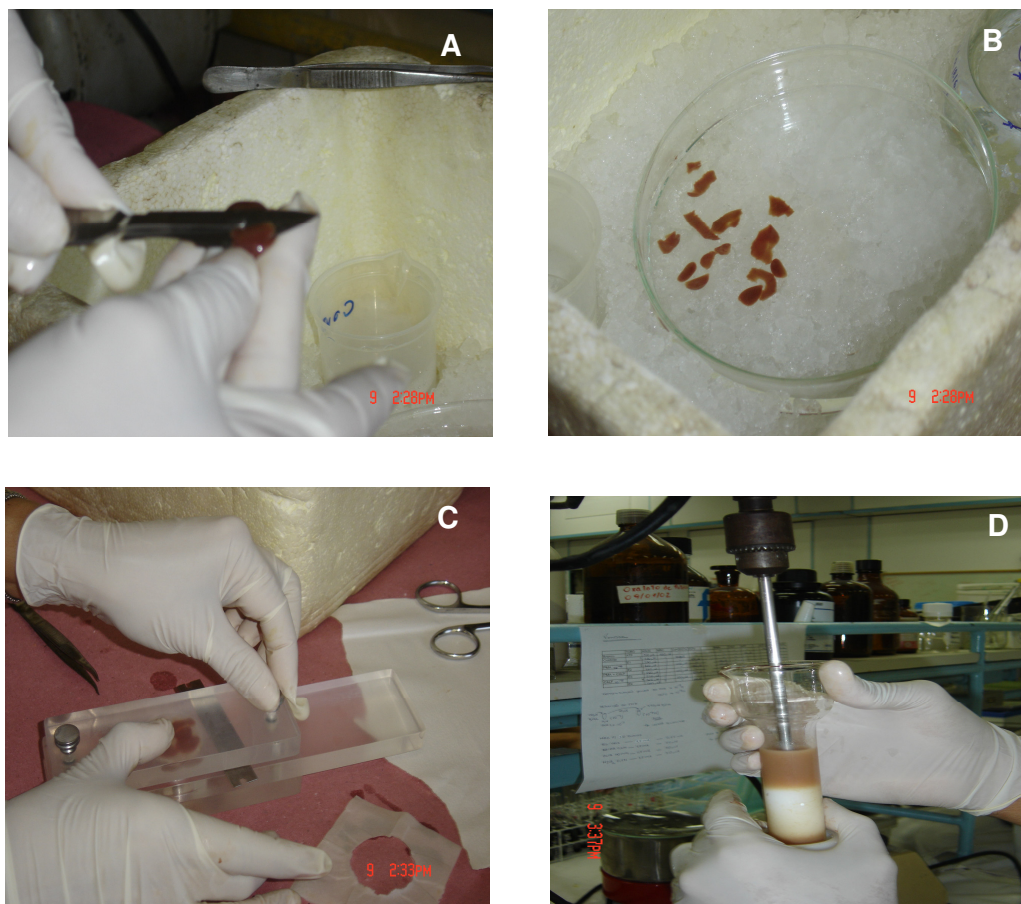


Figura 3 - Material para obtenção de homogenato total e da fração de membranas de túbulos proximais de rins de ratos. **A)** Dissecção do córtex, **B)** Córtex isolado e imerso em sacarose tamponada, **C)** Isolamento do córtex em micrótomo, **D)** Córtex homogeneizado em homogeneizador de vidro e bastão de teflon, 20 vezes ,a 2000 rpm.

2.2.2.6 Protocolo 6 - Mensuração da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas membranas basolaterais de túbulos proximais de rins de ratos adultos.

A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase foi determinada por método colorimétrico, medindo o fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP (TAUSSKY; SHORR, 1953). A atividade foi calculada pela diferença entre as determinações na ausência e na presença de 2 mM de ouabaína. O meio de reação continha 50 mM Bis-Tris-propano (pH 7,4), 0,2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 120 mM NaCl e 0,05 mg/mL de proteína. As membranas foram pré-incubadas neste meio durante 10 minutos e a

37 °C para, no caso dos tubos contendo ouabaína, assegurar uma completa inativação da Na⁺, K⁺-ATPase. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de uma mistura de ATP (5 mM final) e KCl (24 mM final) e parada após 10 minutos pela adição de 750µl de carvão ativado em HCl 0,1 N, sendo posteriormente centrifugada a 2000rpm durante 20 minutos e a 5°C. Então, o sobrenadante foi adicionado ao reagente de cor e, decorridos 30 minutos, a absorbância foi lida em 660nm no espectro Hitachi U-2001.

2.2.2.7 Protocolo 7 - Mensuração da atividade da Na⁺-ATPase nas membranas basolaterais de túbulos proximais de rins de ratos adultos.

A atividade da Na⁺-ATPase foi medida pela quantificação do ³²Pi liberado resultante da hidrólise do [γ -³²P]ATP (CARUSO-NEVES et al, 2000). A atividade foi calculada pela diferença entre as determinações na ausência e na presença de furosemide 2 mM. O meio de reação continha 20 mM Hepes-Tris (pH 7,0), 10 mM MgCl₂, 120 mM NaCl e 0,2 mg/mL de proteína. A reação foi iniciada pela adição de 5 mM de [γ -³²P]ATP ($\sim 1,7 \times 10^6$ cpm/nmol de ATP) e parada após 10 minutos, pela adição de carvão ativado em HCl 0,1 N. O ³²Pi liberado foi medido no contador de cintilação líquida.

As reações de atividade Na⁺, K⁺-ATPase e Na⁺-ATPase, na presença de angiotensina II, foram iniciadas pela adição de proteína, previamente incubada por 10 minutos com ouabaína.

2.2.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias aritméticas e respectivos desvios padrões. Foi empregado o *Statistical Program for Social Sciences* (SPSS), versão 11.0.1 para Windows e o teste “t” de Student para duas amostras independentes com variâncias iguais ou desiguais. O teste de *Levene* foi utilizado para verificar a hipótese de igualdade das variâncias. A sensibilidade da Na⁺-ATPase a angiotensina II foi verificada pela análise da variância (ANOVA) e Teste de *Tukey*. A significância foi considerada aceitando-se a margem de erro de 5% ($p \leq 0,05$).

2.2.4 Aspectos éticos

O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), ofício nº 50/05.

3 RESULTADOS

3.1 DETERMINAÇÕES DO PESO CORPORAL, INGESTÃO DE SÓLIDO E HEMATÓCRITO

Os pesos dos animais CON e CAGE foram semelhantes da 3^a à 5^a semana de vida. Entretanto, a partir da 6^a e até a 13^a semana, os animais CAGE pesaram menos que os CON (Figura 4).

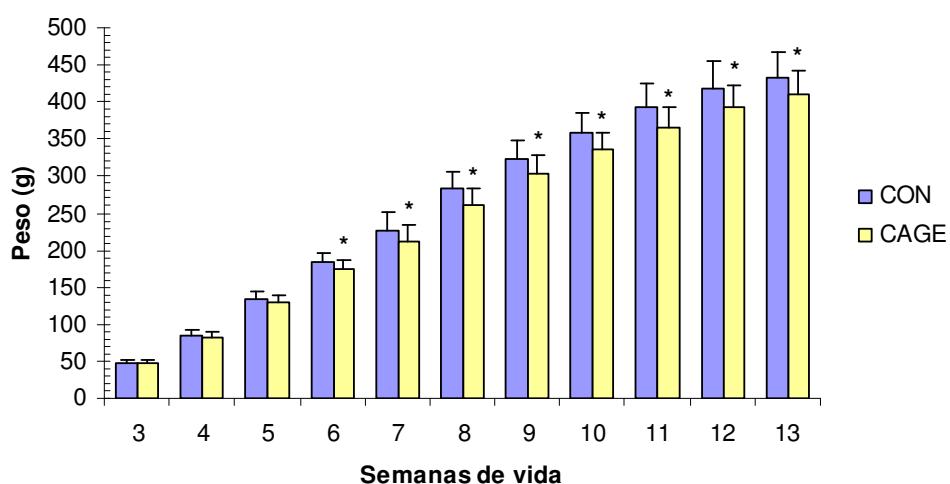


Figura 4 - Peso corporal (g) do desmame a 13^a semanas de vida, nos animais CON (n=24) e CAGE (n=24); *p<0,05.

As ingestões de sólido (IS) em 24h foram similares da 6^a a 12^a semana, sendo maior nos animais CAGE ($5,46 \pm 0,65$ vs $4,29 \pm 0,69$) apenas na 13^a semana de vida (Figura 5).

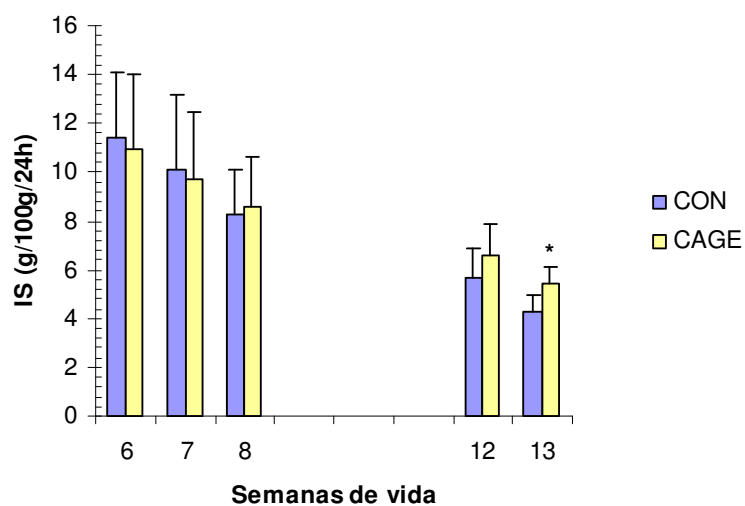


Figura 5 - Ingestão de sólido em 24h (g/100g/24h) nos animais CON (n=24) e CAGE (n=24), nas fases de crescimento e adulto jovem; *p≤0,05.

Os valores do hematócrito (%), medidos na 4^a, 8^a e 12^a semanas, foram menores nos animais CAGE (41,50±4,29 vs 44,74±2,78) apenas na 8^a semana (Figura 6).

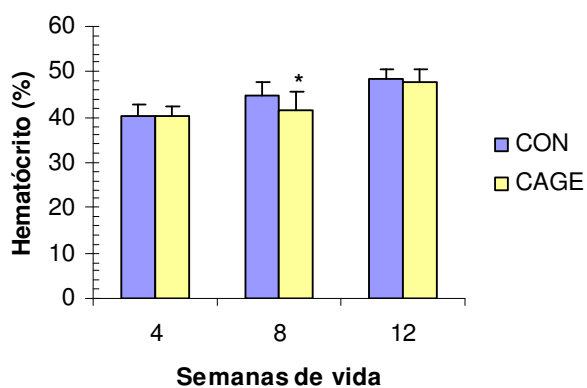


Figura 6 - Hematócrito (%) nos animais CON (n=23) e CAGE (n=19) no crescimento e adulto jovem; *p≤0,05.

3.2 MEDIDAS DA INGESTÃO DE ÁGUA, VOLUME E EXCREÇÕES URINÁRIAS DE Na^+ , K^+ , CREATININA E PROTEÍNA, NAS FASES DE CRESCIMENTO E ADULTO.

As ingestões de água (IL) foram semelhantes entre os animais CON e CAGE nas fases de crescimento e adulto (Figura 7), enquanto o volume urinário foi maior nos CAGE ($5,11 \pm 1,13$ vs $2,96 \pm 0,85$) apenas na 7ª semana de vida (Figura 8).

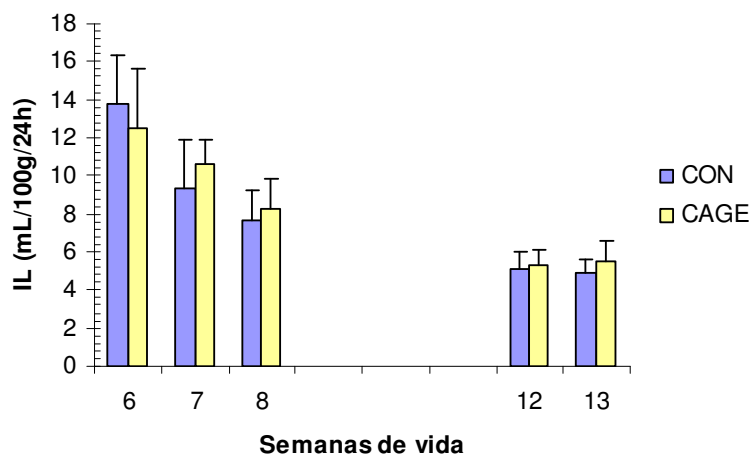


Figura 7 - Ingestão de água em 24 horas (mL/100g/24h) nos animais CON (n=24) e CAGE (n=24) nas fases de crescimento e adulto jovem.

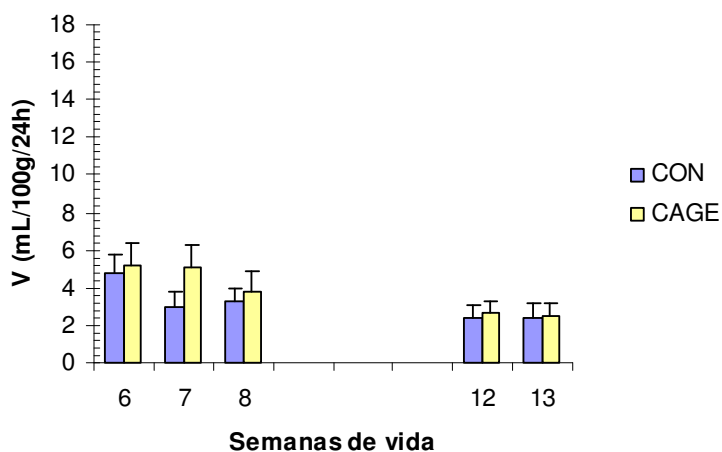


Figura 8 - Volume urinário em 24h (mL/100g/24h) nos animais CON (n=24) e CAGE (n=24) nas fases de crescimento e adulto jovem; * $p \leq 0,05$.

O balanço hídrico (BH), determinado pela diferença entre a ingestão de água e o volume urinário nas GMI em 24h, foi similar entre os animais CON e CAGE, nas fases de crescimento e adulto (Figura 9).

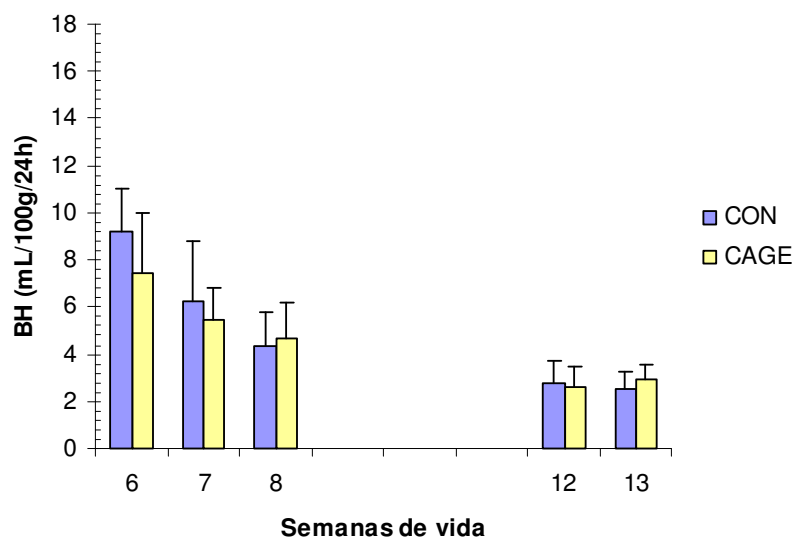


Figura 9 - Balanço hídrico em 24h (mL/100g/24h) nos animais CON (n=24) e CAGE (n=24) nas fases de crescimento e adulto jovem.

Os valores da densidade urinária (D), expressos em mg/mL, foram menores nos animais CAGE ($1,038 \pm 0,009$ vs $1,024 \pm 0,009$) apenas na 7ª semana (Figura 10).

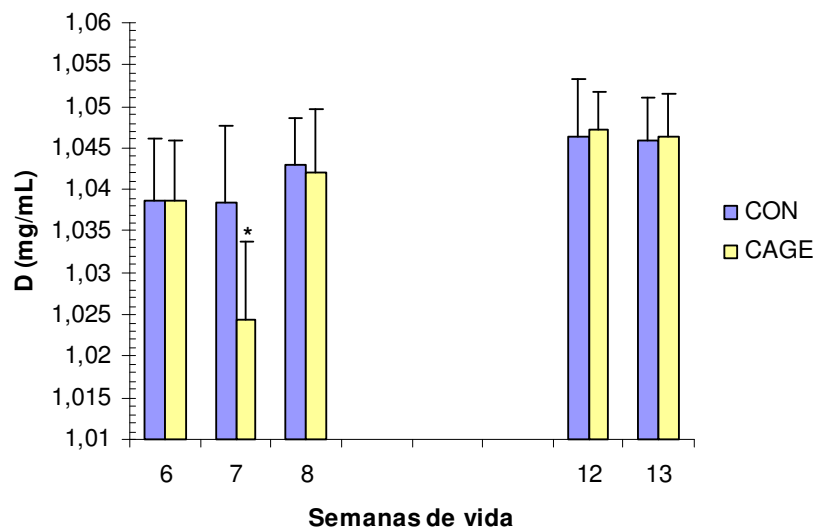


Figura 10 - Densidade urinária em 24h (mg/mL) nos animais CON (n=24) e CAGE (n=24) nas fases de crescimento e adulto jovem; * $p \leq 0,05$.

As $U_{Na^+}V$, expressas em $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$, foram maiores nos animais CAGE respectivamente na 8ª ($351,13 \pm 90,74$ vs $277,36 \pm 96,12$) e na 13ª ($256,77 \pm 53,98$ vs $203,37 \pm 52,14$) semanas de vida (Figura 11).

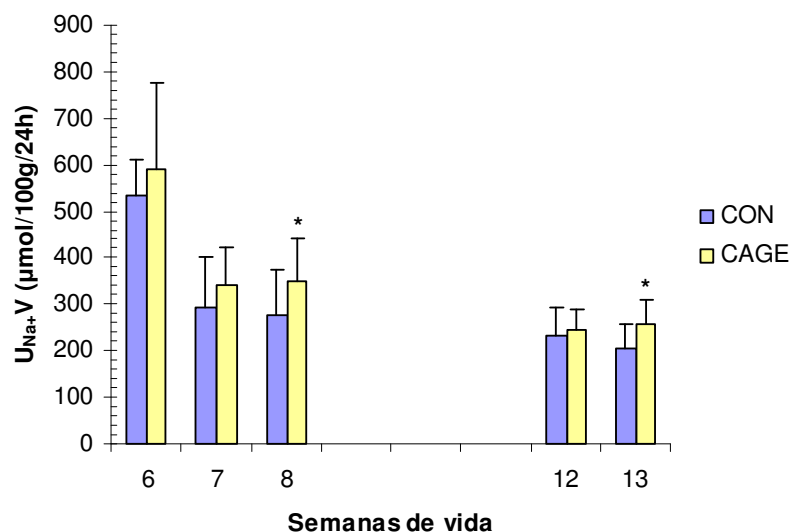


Figura 11 - Excreção de Na^+ ($U_{Na^+}V$ - $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) nos animais CON ($n=24$) e CAGE ($n=24$) nas fases de crescimento e adulto jovem; * $p \leq 0,05$.

As $U_{K^+}V$ foram maiores nos animais CAGE na 7ª ($616,45 \pm 135,19$ vs $414,40 \pm 140,50$) e 8ª ($554,68 \pm 135,07$ vs $367,06 \pm 93,24$) semanas de vida (Figura 12).

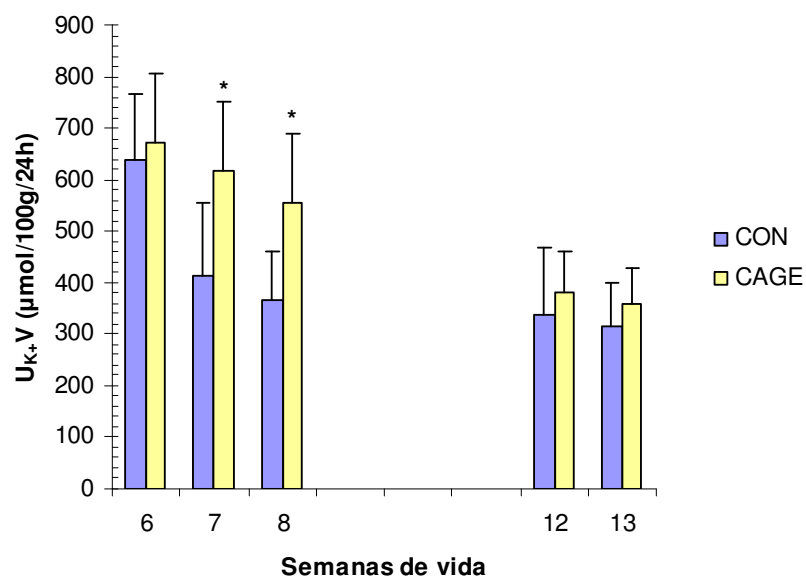


Figura 12 - Excreção de K^+ ($U_{K^+}V$ - $\mu\text{mol}/100\text{g}/24\text{h}$) nos animais CON ($n=24$) e CAGE ($n=24$) nas fases de crescimento e adulto jovem; * $p \leq 0,05$.

As excreções de creatinina (Figura 13) e de proteína em 24h não diferiram durante o período de estudo, exceto pela menor excreção de proteína (Figura 14) nos animais CAGE ($2,58 \pm 1,19$ vs $4,03 \pm 1,86$) na 8ª semana de vida.

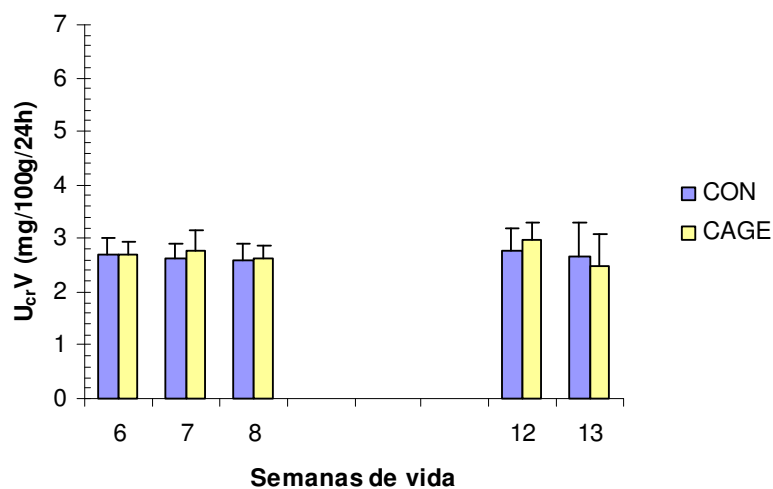


Figura 13 - Excreção de creatinina ($U_{cr}V$, mg/100g/24h) nos animais CON (n=20) e CAGE (n=18) nas fases de crescimento e adulto jovem.

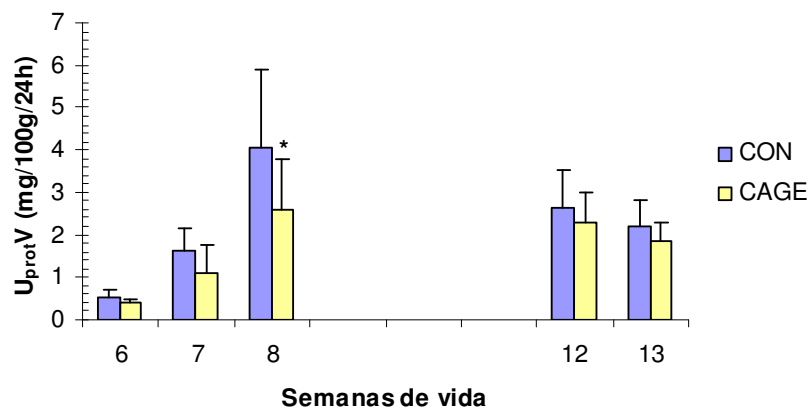


Figura 14 - Excreção de proteína ($U_{prot}V$, mg/100g/24h) nos animais CON (n=18) e CAGE (n=19) nas fases de crescimento e adulto jovem. * $p \leq 0,05$.

3.3 VOLUME, DENSIDADE E EXCREÇÕES URINÁRIAS DE Na^+ E K^+ COM 12h DE RESTRIÇÃO HÍDRICA: PROVA DE CONCENTRAÇÃO DE URINA

Nas 12h de restrição hídrica realizada na 13ª semana, o volume e a densidade urinária dos animais adultos CON e CAGE não diferiram, enquanto as $\text{U}_{\text{Na}^+}\text{V}$ e $\text{U}_{\text{K}^+}\text{V}$ foram maiores nos animais CAGE (Tabela 3).

Tabela 3 - Prova de concentração de urina em animais CON e CAGE adultos jovens.

PARÂMETRO	CON (n=8)	CAGE (n=9)
V (mL/100g/12h)	0,8±0,2	0,9±0,1
D (mg/mL)	1,0498±0,00071	1,0498±0,00067
$\text{U}_{\text{Na}^+}\text{V}$ (μmol/100g/12h)	166,2±37,7	223,6±16*
$\text{U}_{\text{K}^+}\text{V}$ (μmol/100g/12h)	126,2±22	169,9±16,7*

Valores expressos em média ± DP; * p ≤ 0,05

3.4 AVALIAÇÕES DAS FUNÇÕES GLOMERULAR E TUBULAR PROXIMAL E DO TRANSPORTE TUBULAR DE Na^+

As concentrações plasmáticas de Na^+ , K^+ , Li^+ e creatinina ao fim do experimento foram semelhantes nos animais adultos CON e CAGE (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações plasmáticas de Na^+ , K^+ , Li^+ e creatinina em animais CON e CAGE adultos jovens.

PARÂMETRO	CON (n=12)	CAGE (n=12)
[Na^+] (μmol/mL)	142,05±0,91	142,84±1,31
[K^+] (μmol/mL)	6,52±0,35	6,49±0,57
[Li^+] (μmol/mL)	0,24±0,09	0,23±0,13
[Cr] (mg/dl)	0,52±0,08	0,47±0,07

Valores expressos em média ± DP

A função glomerular e a tubular proximal, avaliadas respectivamente pelos C_{cr} e C_{Li^+} ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$), bem como os C_{Na^+} e C_{K^+} ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) e as excreções urinárias de Li^+ , Na^+ e K^+ não diferiram entre os animais CON e CAGE (Tabela 5).

Tabela 5 - Volume urinário (V), *Clearances* de creatinina (C_{cr}), Li^+ (C_{Li^+}), Na^+ (C_{Na^+}) e K^+ (C_{K^+}), em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ e excreções de Li^+ ($U_{Li^+}V$), Na^+ ($U_{Na^+}V$) e K^+ ($U_{K^+}V$), em $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$, em animais CON e CAGE, adultos jovens.

PARÂMETRO	CON (n=12)	CAGE (n=12)
V ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)	19,4 $\pm$ 3,3	19,6 $\pm$ 3,5
C_{cr} ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)	382,9 $\pm$ 113,1	342,8 $\pm$ 121,8
C_{Li^+} ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)	42,5 $\pm$ 20,9	40 $\pm$ 20
C_{Na^+} ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)	0,13 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,03
C_{K^+} ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)	14,91 $\pm$ 6,29	14,20 $\pm$ 7,14
$U_{Li^+}V$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$)	1,2 $\pm$ 0,7 $\times 10^{-2}$	1,0 $\pm$ 0,4 $\times 10^{-2}$
$U_{Na^+}V$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$)	1,9 $\pm$ 0,3 $\times 10^{-2}$	2,1 $\pm$ 0,4 $\times 10^{-2}$
$U_{K^+}V$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$)	9,3 $\pm$ 3,4 $\times 10^{-2}$	9,1 $\pm$ 4,4 $\times 10^{-2}$

Valores expressos em média $\pm$ DP

A carga filtrada de Na^+ e o manuseio tubular de Na^+ expresso pelo aporte distal e pelas reabsorções fracionais proximal e distal I de Na^+ foram semelhantes entre os ratos CON e CAGE adultos (Tabela 6).

Tabela 6 - Carga filtrada (CF_{Na^+}) e aporte distal de Na^+ (AD_{Na^+}), em $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$, reabsorção fracional proximal de Na^+ ($RFrP_{Na^+}$) e reabsorção fracional distal de Na^+ I ($RFrD_{Na^+} - I$), em %, nos animais CON e CAGE, adultos jovens.

PARÂMETRO	CON (n=9)	CAGE (n=10)
CF_{Na^+} ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$)	44,9 $\pm$ 9,7	39,6 $\pm$ 6,4
AD_{Na^+} ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$)	3,9 $\pm$ 1,4	4,0 $\pm$ 1,9
$RFrP_{Na^+}$ (%)	91,4 $\pm$ 1,5	92,4 $\pm$ 4,4
$RFrD_{Na^+} - I$ (%)	99,5 $\pm$ 0,2	99,6 $\pm$ 0,1

Valores expressos em média $\pm$ DP

3.5 PESOS ÚMIDOS RELATIVOS DE ÓRGÃOS

Os pesos úmidos relativos de órgãos dos animais adultos (g/100g de peso corporal) não diferiram entre os animais CON e CAGE (Figura 15).

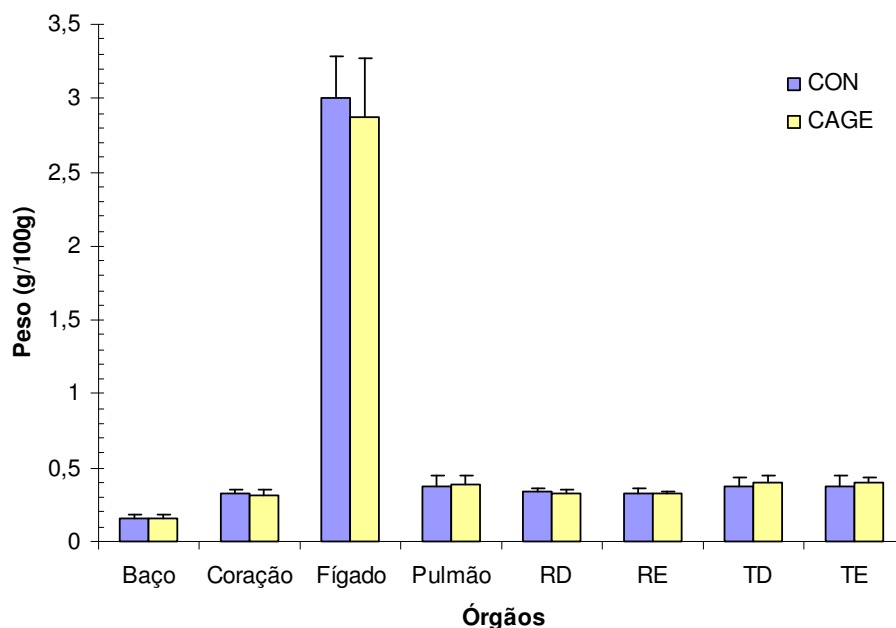


Figura 15 - Peso úmido relativo de órgãos (g/100g de peso corporal) dos animais CON e CAGE, adultos jovens.

3.6 ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO RENAL

A coloração hematoxilina-eosina revelou um córtex renal com distribuição regular de corpúsculos de Malpighi, compostos por tufo de capilares glomerulares envolvidos por cápsulas de Bowman, revestidas pelos folhetos visceral e parietal. Este último era composto por epitélio pavimentoso simples, sem alterações tróficas significativas e com espaço de Bowman preservado entre os dois folhetos. O segmento contorcido do túbulo proximal possuía epitélio cúbico simples, com citoplasma fortemente acidófilo e borda luminal espessada devido à presença de microvilosidades na superfície, enquanto o túbulo contorcido distal era constituído por epitélio cúbico simples, sem microvilosidades, com células menores e citoplasma menos acidófilo.

que as do túbulo proximal. Na região medular renal, foram observadas alças de Henle formadas por uma porção delgada, cuja parede era um epitélio achatado à semelhança dos capilares sanguíneos em volta, e por uma porção espessa, cuja morfologia era semelhante a do túbulo contorcido distal. Os túbulos coletores, também presentes na medula renal, tornaram-se cada vez mais calibrosos à medida que se dirigiram às papilas renais. Eles eram revestidos por um epitélio variando de cúbico a cilíndrico, os menos calibrosos com um epitélio cúbico simples e suas células apresentando citoplasma fracamente eosinófilo.

Não foram evidenciadas alterações na estrutura renal com a coloração hematoxilina-eosina (Figuras 16 e 17), nem houve diferença no tamanho do espaço urinário e no número de glomérulos (Tabela 7) nos animais adultos CON comparados aos CAGE.

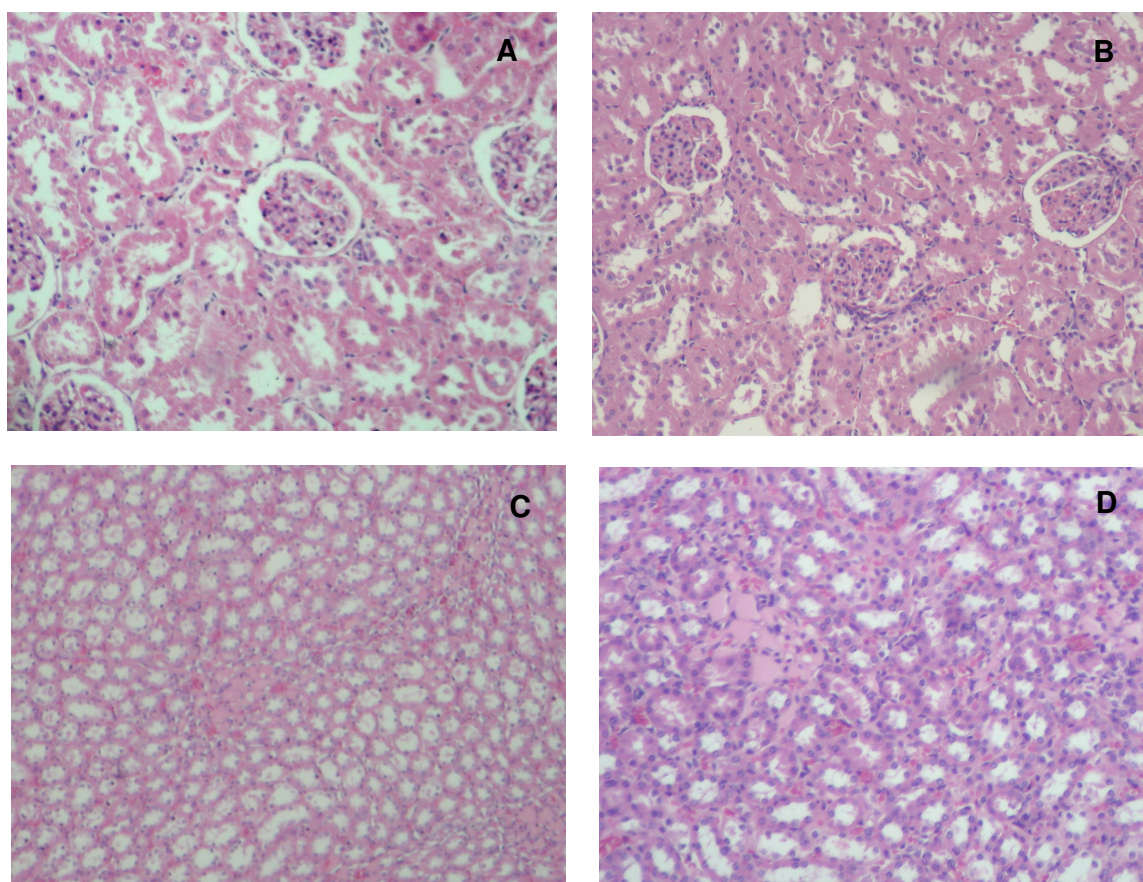


Figura 16 - Fotomicrografia de rins adultos demonstrando na coloração HE: **A** = região cortical CON (10x), **B** = região cortical CAGE (10x), **C** = região medular CON (10x) e **D** = região medular CAGE (10x).

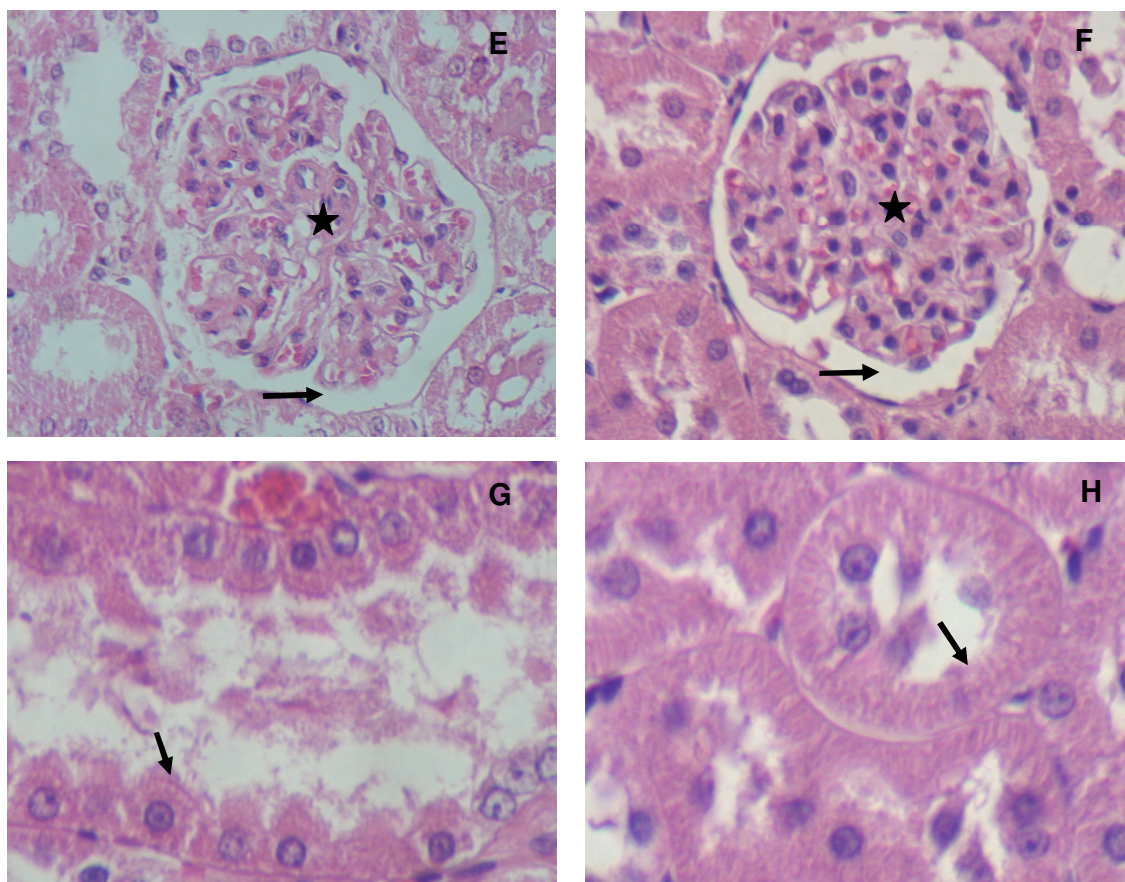


Figura 17 - Fotomicrografia de rins adultos demonstrando na coloração HE: **E** = glomérulo renal CON (40x) (estrela) e espaço urinário (seta), **F** = glomérulo renal CAGE (40x) (estrela) e espaço urinário (seta), **G** = túbulo contorcido proximal CON (40x) com microvilosidades (seta), **H** = túbulo contorcido proximal CAGE (40x) com microvilosidades (seta).

Tabela 7 – Áreas dos corpúsculos renais, glomérulos e espaços urinários, e número de glomérulos dos animais CON e CAGE adultos jovens.

PARÂMETRO	CON	CAGE
Corpúsculo renal (μm^2)	9657,7 $\pm$ 512,8	9493,3 $\pm$ 895,3
Glomérulo renal (μm^2)	6847,8 $\pm$ 540,9	6593,9 $\pm$ 609,0
Espaço urinário (μm^2)	2809,9 $\pm$ 761,8	2899,3 $\pm$ 799,3
Número de glomérulos	105,0 $\pm$ 2,0	93,3 $\pm$ 5,8

Valores expressos em média $\pm$ DP

3.7 ESTUDO DA ATIVIDADE DA Na^+ - K^+ - ATPASE E Na^+ - ATPASE NO HOMOGENATO E FRAÇÃO DE MEMBRANAS DO TÚBULO PROXIMAL DO RATO

A alimentação exclusiva com a dieta CAGE desde o desmame induziu alterações moleculares no túbulo proximal do rato no animal adulto jovem, aumentando a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase (Figura 18) e diminuindo a da Na^+ -ATPase que, diferente do que ocorreu com os animais CON (Figura 19), não foi estimulada pela angiotensina II (Figuras 20 e 21).

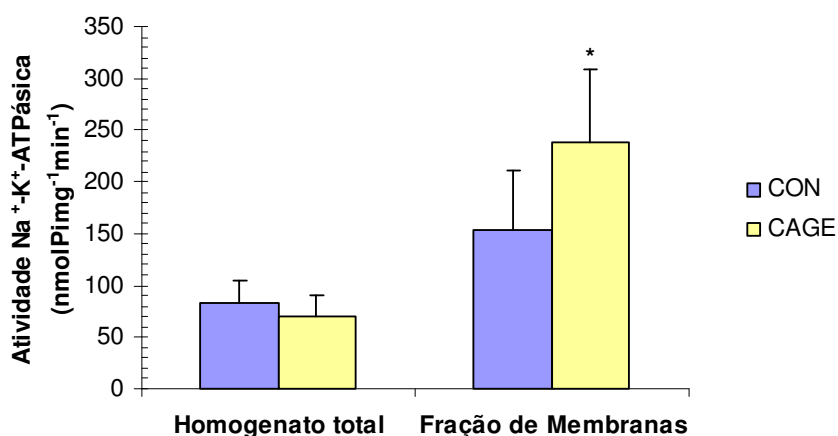


Figura 18 - Atividade Na^+ - K^+ -ATPásica no homogenato total e fração de membranas do túbulo proximal de ratos adultos jovens CON e CAGE; * $p \leq 0,05$

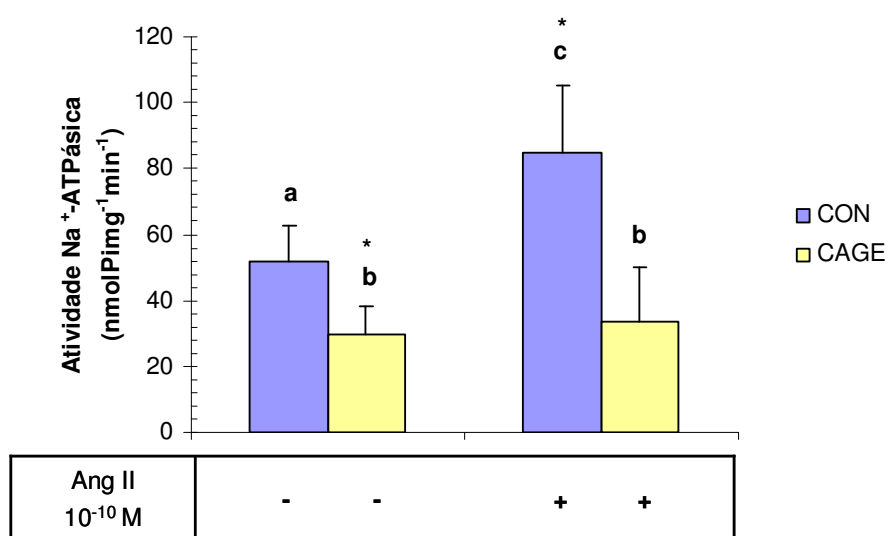


Figura 19 - Atividade Na^+ -ATPásica da membrana basolateral do túbulo proximal de animais CON e CAGE, adultos; **a** = atividade Na^+ -ATPásica CON sem angiotensina II, **b** = atividade Na^+ -ATPásica CAGE sem e com angiotensina II, **c** = atividade Na^+ -ATPásica CON com angiotensina II; * $p \leq 0,05$.

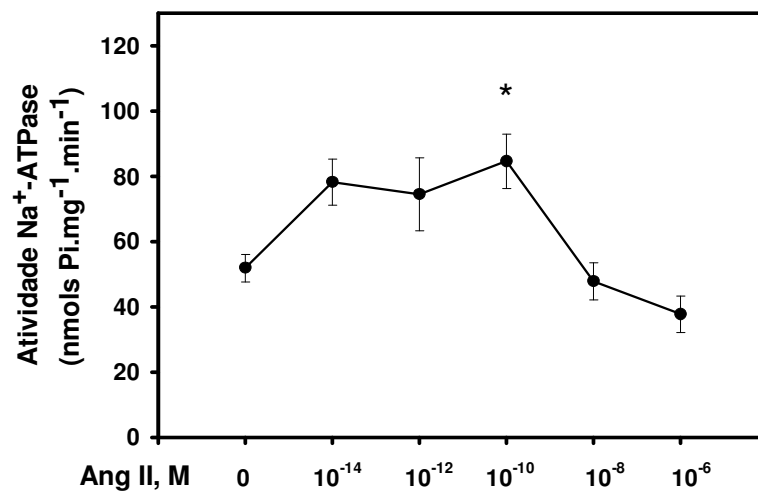


Figura 20 - Efeito de diferentes doses de angiotensina II sobre a atividade Na⁺-ATPásica da membrana basolateral do túbulo proximal de ratos adultos CON; * $p \leq 0,05$.

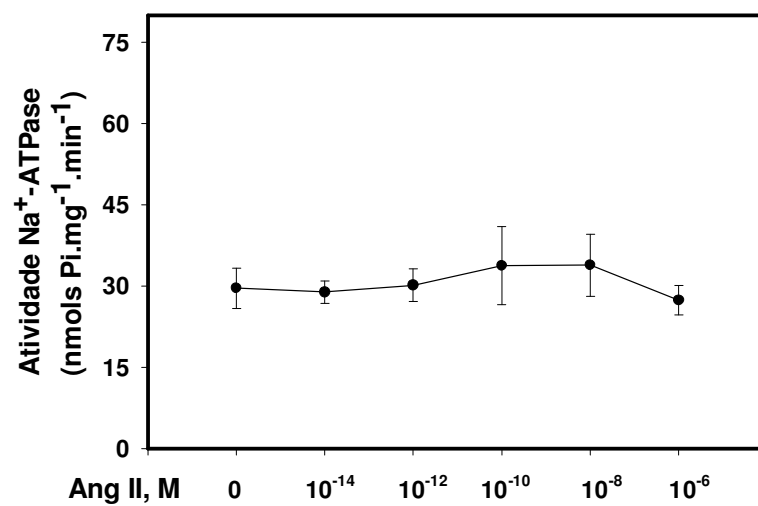


Figura 21 - Efeito de diferentes doses de angiotensina II sobre a atividade Na⁺-ATPásica da membrana basolateral do túbulo proximal de ratos adultos CAGE.

4 DISCUSSÃO

Os animais CON e CAGE foram mantidos em condições similares desde o desmame, exceto pelos níveis mínimos ou normais de AGE nas dietas (SOARES, M.C. et al, 1995). Os animais foram adaptados às GMI onde permaneceram apenas durante o experimento, para evitar o estresse do isolamento crônico e sua influência sobre a atividade das dessaturases em ratos normo e hipertensos (MILLS et al, 1994).

Neste estudo, a ingestão de dieta carente em AGE diminuiu o peso corporal da 6ª semana (3ª na dieta) a 13ª semana de vida (adulto jovem). Resultado similar foi observado em outros trabalhos, também em ratos machos em dieta CAGE desde o desmame, com o menor peso ocorrendo no crescimento - 7ª a 9ª semana (SOARES, M.C. et al, 1995) ou no crescimento e no adulto jovem - 8ª a 12ª semana (SOARES, A.F. et al, 2005) ou, ainda, no adulto jovem - 12ª semana (PAIXÃO et al, 2002). Assim, a redução no peso característica de dietas deficientes em AGE pós-desmame (COX et al, 1982; HARRIS et al, 1990) poderia decorrer de disfunção temporária na regulação do hormônio do crescimento (SOARES, M.C. et al, 1995) ou de menor absorção de gordura em ratos submetidos à dieta CAGE (WERNER et al, 2005, 2002) ou, ainda, do maior requerimento metabólico energético, secundário à perda de água por evaporação pela pele devido à sua maior permeabilidade (PHINNEY et al, 1993). Na deficiência materna em AGE durante a gravidez e lactação, ocorreu também diminuição do peso na prole, associada a baixos níveis de leptina, hormônio envolvido na regulação do peso (KOROTKOVA et al, 2005).

No caso do maior requerimento energético, haveria uma maior ingestão de sólido ou de água para repor as perdas. Neste estudo, entretanto, a ingestão de sólido foi similar em todas as semanas, excetuado pelo aumento na 13ª semana. A similaridade do volume urinário nos animais CON e CAGE em crescimento e adulto, corrobora os dados da ingestão, não favorecendo a possibilidade de maior perda de água por evaporação e diferindo do maior consumo de água com manutenção do volume urinário em ratos CAGE (HANSEN, 1981).

As vias de ganho de água são a ingestão de líquidos e alimentos e a produção metabólica pela oxidação dos carboidratos, enquanto as de saída são via urina, pele, pulmões e fezes (EATON; POOLER, 2006). No homem, a perda de água pelas fezes e pela evaporação é pequena e sua quantidade é similar a produção

metabólica (SCHNERMANN; SAYEGH, 1998) e, assim, para manter o balanço hídrico, a quantidade de água excretada pelo rim é igual à ingerida (KOEPPEN; STANTON, 2001). Neste estudo, os valores das ingestões, excreções de água e, portanto, do balanço hídrico foram similares em geral nos animais em crescimento e adulto jovem, com os valores das ingestões cerca de duas vezes os das excreções, uma característica fisiológica do rato (SHARP; LA REGINA, 1998).

Mudanças no balanço hídrico alteram a osmolalidade dos fluidos corporais e o rim controla este balanço formando urina com menos ou mais água, conservando-a ou excretando-a conforme necessário (COGAN, 1991). Neste estudo, a água foi fornecida *ad libitum* aos animais, as rações foram preparadas com quantidades iguais de água e carboidratos - estes substratos para a oxidação, portanto, com vias de entrada iguais para ambos os grupos. Adicionalmente, os animais estavam no mesmo ambiente, provavelmente com perdas insensíveis de mesma magnitude.

Neste estudo ocorreu diminuição do hematócrito nos animais CAGE apenas na 8ª semana, indicando uma possível anemia ao fim da terceira fase do crescimento extra-uterino. Entretanto, os valores de hematócrito variam bastante de acordo com a raça, idade e sexo dos animais (SHARP; LA REGINA, 1998). Uma das funções do rim é estimular a produção dos eritrócitos via eritropoetina (LOTE, 2000), sendo a anemia uma consequência importante da insuficiência renal (REMUZZI; MINETTI, 2000). Modificação na composição dos ácidos graxos da membrana dos eritrócitos tem sido relatada através da mudança do aporte lipídico da dieta (KIRCHGESSNER et al, 1994) e também tem sido observada tal modificação em pacientes com fibrose cística e níveis plasmáticos baixos de AGE (WOOD et al, 2003).

O rim é um importante órgão para manter a homeostase corporal e a diminuição de sua função é insidiosa, resultando em insuficiência renal crônica, cuja progressão diminui com o tratamento clínico, dito conservador, o qual, sendo bem conduzido e contando com a aderência do paciente, adia em muitos anos o início do tratamento dialítico (KHWAJA et al, 2007). Pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento hemodialítico têm redução no conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados na membrana eritrocitária, o qual pode ser decorrente da sua condição inflamatória crônica (KOORTS; VILJOEN; KRUGER, 2002) e a suplementação dietética com óleo de peixe aumenta a deformabilidade dos eritrócitos e o hematócrito (PECK, 1997).

O rim regula precisamente o conteúdo corporal de Na^+ e K^+ para manter o balanço corporal e a homeostase (LOTE, 2000). Nos experimentos de 24h nas GMI, ocorreram elevações das $U_{\text{Na}^+}\text{V}$ nas 8ª e 13ª semanas, a última provavelmente em consequência à maior ingestão de sólido e, portanto, de Na^+ nesta semana, visando igualar a excreção à ingestão e para manter o balanço, o que não ocorreu na 8ª semana. Este aumento da $U_{\text{Na}^+}\text{V}$ pode ser conseqüente ao maior RFG observado em ratos CAGE com cinquenta dias (HJELTE et al, 1990). Por sua vez, as maiores $U_{\text{K}^+}\text{V}$ na 7ª e 8ª semanas podem ser decorrentes do maior RFG nesta fase do crescimento (HJELTE et al, 1990). Soares, A.F. et al (2005) observaram, também, um aumento da $U_{\text{Na}^+}\text{V}$ na fase de crescimento - 10ª semana de vida. Células *Madin Darby canine kidney* (MDCK), modelo experimental do sistema tubular distal, mantidas em meio CAGE tinham menores transporte de eletrólitos no epitélio, formação hemicística, número e função de mitocôndrias (STOLL; SPECTOR, 1995).

A creatinina é o produto final do metabolismo da creatina nos músculos esqueléticos e liberada em taxas constantes no plasma, em quantidade proporcional à massa muscular e ao exercício (AIRES, 2008; JACOBSON; STRIKER; KLAHR, 1995). Assim, a similaridade nas excreções de creatinina nos ratos CON e CAGE em crescimento e adultos indica massa muscular de mesma magnitude.

Normalmente, as proteínas são restringidas pelo tamanho e carga elétrica durante a filtração glomerular e, portanto, praticamente não aparecem na urina. A medida da concentração de proteína na urina é um meio simples de revelar doença renal (SHAH; FEEHALLY, 2008). A proteinúria ocorre em várias doenças renais, inclusive na síndrome nefrótica congênita, acarretando redução dos níveis plasmáticos de AGE, os quais são arrastados com a albumina durante a filtração glomerular (ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA et al, 2007). Os animais CAGE, apesar da carência lipídica, não apresentaram proteinúria, o que sugere integridade da barreira de filtração. Neste sentido, tanto a administração de ácidos graxos poliinsaturados exerceu efeito benéfico sobre a proteinúria como a adição de EPA à dieta durante quatorze meses impediu o desenvolvimento da doença renal e da proteinúria em ratas *New Zealand Black* (NZB) x *New Zealand White* (NZW) F1 (PRICKETT; ROBINSON; STEINBERG, 1981). Adicionalmente, a suplementação com LNA (ômega-3) em pacientes com nefropatia imunoglobulina A reduziu a proteinúria de forma dose-dependente (HOGG et al, 2006).

Dependendo do estado de hidratação do organismo, o rim pode eliminar urina diluída, hiposmótica ou concentrada, hiperosmótica. Assim, na concentração da urina, a água é atraída pelo gradiente osmótico para o interstício medular devido a alta concentração de NaCl e uréia, sendo removida dos ductos coletores (DWYER; SCHMIDT-NIELSEN, 2003). A prova de concentração da urina foi realizada visando investigar a integridade do mecanismo de concentração do rim. Os animais adultos foram mantidos em GMI durante 12 horas noturnas, com livre acesso à ração e com restrição hídrica. “A habilidade de concentração é assegurada corretamente pela mensuração da densidade ou osmolalidade após deprivação noturna de água” (JACOBSON; STRIKER; KLAHR, 1995, p. 91). Assim, a densidade urinária é utilizada como um índice da concentração urinária. As elevadas densidades urinárias e os baixos volumes urinários na prova de concentração indicam preservação da capacidade de concentração nos animais CON e CAGE. Os aumentos nas $U_{Na^+}V$ e $U_{K^+}V$ observados nos animais CAGE podem refletir a maior ingestão de sólido ocorrido na semana da realização da prova, uma vez que o rim excreta a totalidade do Na^+ ingerido em três a quatro dias (COGAN, 1991).

A técnica experimental de *clearance* ou depuração plasmática é utilizada para medir o RFG, parâmetro essencial para avaliar a função renal visando administrar doses apropriadas de medicamentos excretados pelo rim bem como para acompanhar a evolução da doença renal. A inulina, polissacarídeo biologicamente inerte, é a substância mais adequada para medir o RFG, por ser ultrafiltrada nos glomérulos e não ser reabsorvida, secretada ou metabolizada pelos túbulos renais. Entretanto, sua utilização requer imobilização e infusão contínua para manter um nível plasmático estável no paciente ou no animal anestesiado. Estes fatores dificultam o seu uso em humanos e, sobretudo, em animais acordados. Assim, o *clearance* de inulina vem sendo substituído pelo *clearance* de creatinina na clínica e nos estudos com animais acordados. A creatinina, cuja excreção é igual à produção, é uma substância livremente filtrada, ocorrendo pequena secreção no túbulo proximal, a qual é compensada pela falsa elevação da sua concentração plasmática, conseqüente à reação de substâncias plasmáticas que se coram como ela - os cromógenos da creatinina (AIRES, 2008; ROSE, 1994).

Os resultados do C_{cr} evidenciaram similaridade no RFG dos CON e CAGE, sugerindo que a dieta não causou alterações na função glomerular global. Estes resultados divergem dos menores C_{cr} ($280,10 \pm 21,15 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) observados em

animais adultos jovens carentes em AGE (SOARES, A.F. et al, 2005) e em animais adultos com vinte e oito semanas ($470 \pm 70 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$), nos quais a deterioração da função renal foi antecedida por um período de maior RFG ($820 \pm 50 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) quando jovens (HJELTE et al, 1990).

A divergência dos resultados obtidos neste estudo em relação ao de Soares, A.F. et al (2005) decorreu possivelmente dos diferentes percentuais dos AGE nas dietas (óleo de soja versus óleo de milho), das diferentes linhagens dos ratos utilizados ou ainda dos diferentes tipos de gaiolas metabólicas (minimizam ou não as perdas do volume urinário). As diferenças dos RFG observados por Hjelte et al (1990) podem resultar das idades dos animais (12 semanas ou 7 a 28 semanas) e aporte lipídico (óleo de côco ou toucinho).

Foi observado aumento no RFG em alguns pacientes com fibrose cística (BERG; KUSOFFSKY; STRANDVIK, 1982; STENVINKEL et al, 1991), os quais retornam aos valores normais após um ano de suplementação com AGE, demonstrando a relação entre a CAGE e função renal na fibrose cística (STRANDVIK et al, 1989). O óleo de peixe aumenta o RFG em pacientes com nefropatia por imunoglobulina A, portadores de uma deficiência em AGE. Dessa maneira, o LNA (ômega-3) pode influenciar favoravelmente essa nefropatia, diminuindo a injúria glomerular decorrente da hemodinâmica glomerular alterada, contração mesangial e inflamação (HOLMAN et al, 1994). Na disfunção renal pelo uso da ciclosporina, a suplementação com óleo de peixe também melhorou o fluxo plasmático renal e o RFG dos pacientes (HOMAN VAN DER HEIDE et al, 1990). Em animais uninefrectomizados, a suplementação dietética com óleo de peixe também diminuiu a esclerose glomerular e a atrofia tubular, demonstrando o efeito benéfico dos ácidos graxos desse óleo (WHEELER et al, 1991).

O Li^+ vem sendo empregado cronicamente na forma de LiCl para tratamento da doença bipolar, sem afetar a função renal quando as concentrações séricas são mantidas em valores inferiores a $0,4 \text{ mEq/l}$ (KOOMANS; BOER; DORHOUT MEES, 1989; THOMSEN, 1984). O Li^+ é um íon metálico alcalino, livremente filtrado nos glomérulos, reabsorvido no túbulo proximal proporcionalmente ao Na^+ , e por isso, seu *clearance* vem sendo utilizado como marcador do transporte tubular proximal de Na^+ . Para tal, o Li^+ não deve ser reabsorvido após o túbulo proximal, sendo feita uma expansão com água visando inibir o hormônio antidiurético (THOMSEN, 1990).

Métodos diretos para estudar o fluxo iônico transmembrana como micropunção e microperfusão, embora bastante utilizados, têm desvantagens como o uso de anestésicos, procedimentos cirúrgicos e perfusão renal com soluções artificiais. Além disso, a técnica de micropunção acessa apenas néfrons superficiais e não os néfrons profundos. Por tudo isso, o C_{Li+} , método não invasivo, permite estudar os animais em condições fisiológicas, utilizando urina proveniente de néfrons corticais e justamedulares, e dessa maneira, possibilita estudar o túbulo proximal como um todo e realizar cálculos para estudar o transporte tubular distal de Na^+ (GARCIA; GONTIJO; FIGUEIREDO, 1991; LEYSSAC, 1990; THOMSEN, 1977).

Foram seguidos os protocolos modificados de Amaro et al (1997) quanto à duração do *clearance* sendo este estudo de 3h e não 2h, e Garcia, Gontijo e Figueiredo (1991) com sobrecarga hídrica de 5% e não de 10% e coleta de sangue por decapitação e não por punção do ventrículo direito. A expansão hídrica do protocolo experimental para o estudo da função tubular foi essencial, devido ao pequeno peso, volume urinário e tempo nas gaiolas, e pelo fato do estudo ser realizado durante o dia, período de menor atividade, quando os ratos dormem. Assim, tais fatores que levam a diminuição do volume urinário e aumentam a probabilidade de erro, foram minimizados. A sobrecarga hídrica também foi fundamental para inibir a liberação do hormônio antidiurético, reduzindo a osmolalidade dos fluidos corporais (AIRES, 2008) e para diminuir a reabsorção de água nos ductos coletores, promovendo assim a geração de água livre e de um fluxo tubular distal hipoosmótico, reduzindo o transporte distal hidrossalino nessa condição experimental de diurese aquosa máxima (THOMSEN, 1990).

Os valores das concentrações plasmáticas de Li^+ entre os grupos CON ($0,24 \pm 0,09 \mu\text{mol/ml}$) e CAGE ($0,23 \pm 0,13 \mu\text{mol/ml}$) foram inferiores ao limite de toxicidade (KOOMANS; BOER; DORHOUT MEES, 1989; THOMSEN, 1984). Os C_{Li+} dos CAGE e CON ($40,00 \pm 20,00$ vs $42,50 \pm 20,94 \mu\text{l/min/100g}$) foram semelhantes, sugerindo reabsorção proximal de Na^+ similar entre eles e divergindo da redução observada por Soares, A.F. et al (2005), possivelmente decorrente do melhor controle dos parâmetros experimentais no presente estudo, acima mencionado.

Os *clearances* de Na^+ e K^+ foram semelhantes entre os dois grupos de animais no presente estudo tendo o mesmo ocorrido com as excreções de Li^+ , Na^+ e K^+ , como esperado, em virtude da excreção urinária de solutos ser conseqüente à

filtração glomerular menos a reabsorção e mais a secreção tubular (LOTE, 2000). Estes resultados estão em concordância com os de Soares, A.F. et al (2005).

Os componentes proximal e distal da reabsorção tubular de Na^+ foram individualizados resultando em RFR_{Na^+} em torno de 90% nos dois grupos, tanto quando a reabsorção proximal de Na^+ foi avaliada por método direto (SHIRLEY; WALTER; THOMSEN, 1987; THOMSEN; HOLSTEIN-RATHLOU; LEYSSAC, 1981) como indireto (THOMSEN, 1984). A semelhança entre o AD_{Na^+} nos dois grupos resultou em $\text{RFRD}_{\text{Na}^+-\text{I}}$ de mesma magnitude nos CON e CAGE. A CF_{Na^+} , produto do RFG pela $[\text{Na}]_s$, foi igual nos animais CON e CAGE, como esperado.

Os órgãos podem reagir de modo específico quando submetidos a uma deficiência em AGE, como no estudo de Korotkova e Strandvik (2000), no qual ratos CAGE apresentaram composições diversas dos ácidos graxos nos diferentes segmentos intestinais, na membrana dos eritrócitos e no soro. Moussa et al (1996) verificaram, também, que animais CAGE apresentaram níveis diferentes de ácidos graxos nos eritrócitos, fígado, rim, coração e músculo esquelético, justificados pelas diferentes atividades das dessaturases e elongases nesses tecidos. Entretanto, neste estudo, os pesos do baço, coração, fígado, pulmão, testículos e rins, relativos ao peso corporal, foram semelhantes nos animais adultos CON e CAGE. O resultado do peso do rim concorda com o índice renal em ratos adultos jovens em dieta CAGE (PAIXÃO et al, 2002). Contudo, mesmo sendo a esteatose hepática uma característica de modelos experimentais deficientes em AGE, os animais CAGE não tinham aumento do peso do fígado (WERNER et al, 2005).

Na análise histológica, utilizando microscopia óptica e coloração hematoxilina eosina, não foram observadas características fora dos padrões normais, entre os animais adultos CON e CAGE. O mesmo ocorreu no estudo morfométrico, demonstrado pelos similares números de glomérulos e tamanhos do espaço urinário nos animais CON e CAGE. Esses resultados histológicos e morfológicos corroboram a ausência de alteração nas funções glomerular e tubular proximal, demonstradas pelos C_{cr} e C_{Li^+} semelhantes nos animais adultos CON e CAGE. Soares, A.F. et al (2005) obtiveram resultado semelhante na coloração hematoxilina eosina entre animais CON e CAGE mas a borda em escova era mais proeminente no túbulo proximal nos animais CAGE no estudo histoquímico, fornecendo suporte para a maior reabsorção tubular proximal encontrada nos animais CAGE. Hjelte et al (1990) observaram leves alterações morfológicas em animais adultos e carentes em AGE,

sugerindo que maiores modificações estariam presentes em animais mais velhos, conforme demonstrado por Borland e Jackson (1931). O efeito benéfico da mistura de n-6 e n-3 foi relatado no modelo da nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina, minimizando as lesões histológicas tubulares renais, efeito atribuído ao aumento dos eicosanóides prostaglandinaE/tromboxanoB₂ e prostaciclina/tromboxanoB₂ (TSIPAS; MORPHAKE, 2003). Nos rins de animais uninefrectomizados, a suplementação dietética com óleo de peixe diminuiu a esclerose glomerular e a atrofia tubular, demonstrando o efeito benéfico dos ácidos graxos desse óleo (WHEELER et al, 1991).

As propriedades funcionais da Na⁺, K⁺-ATPase, tais como afinidade ao Na⁺ e ouabaína (GERBI et al, 1997), são fortemente dependentes da composição dos ácidos graxos das membranas, uma vez que essa enzima é circundada por fosfolípidios (DJEMLI-SHIPKOLYE et al, 2002). Um mecanismo sugerido para modular a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase pelos ácidos graxos poliinsaturados é a alteração na espessura e na fluidez da membrana (JOHANNSSON; SMITH; METCALFE, 1981; LIN et al, 1979). Vários estudos têm demonstrado a relação entre a alteração da composição lipídica das membranas e a função de ATPases. Por exemplo, em pacientes com diabetes mellitus, a inibição da $\Delta 6$ -dessaturase resulta em modificação na incorporação de ácidos graxos poliinsaturados n-6 no nervo ciático, relacionada com a redução na velocidade de condução nervosa e na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase (COSTE et al, 1999). Ainda, no diabetes mellitus foi observada menor atividade da Na⁺, K⁺-ATPase em membranas cardíacas (GERBI et al, 1997) e no segmento ascendente espesso medular da alça de Henle (TSIMARATOS et al, 2001), associada à modificação no conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas, decorrente da inibição característica das dessaturases.

Em estudo anterior neste Laboratório também com animais CAGE adultos, foi observada mudança na distribuição cortical e medular de ácidos graxos nos fosfolípidios: redução nos níveis de AA no córtex e aumento dos ácidos graxos das famílias n-7 e n-9 no córtex e na medula (SOARES, A.F. et al, 2005). A redução nos níveis de AA corticais poderia justificar o aumento da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase dos animais CAGE, devido ao efeito inibitório dos metabólitos do AA sobre essa enzima (THERIEN; BLOSTEIN, 2000). Deste modo, o 20-HETE, metabólito do AA produzido sobretudo nas células do túbulo proximal, inibiria a atividade da Na⁺, K⁺-

ATPase via ativação da proteína-cinase C (OMINATO; SATOH; KATZ, 1996; SATOH; COHEN; KATZ, 1993). A maior atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nos animais CAGE poderia ser decorrente, ainda, de uma modificação nos níveis de colesterol no plasma e nas membranas das células tubulares proximal, tendo sido demonstrada uma relação entre os aumentos do colesterol plasmático e da atividade Na^+ , K^+ -ATPase nos eritrócitos (MAKAROV; KUZNETSOV, 1995). Entretanto, os níveis desse lipídio não foram mensurados neste trabalho.

O aumento da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase poderia resultar em maior reabsorção proximal de Na^+ e, portanto, uma menor carga de Na^+ oferecida aos segmentos do néfron, posteriores ao túbulo proximal. Contudo, tal não ocorreu neste estudo possivelmente porque o método utilizado para medir a função renal envolve néfrons superficiais, médios e profundos, enquanto a técnica do estudo molecular retira apenas os néfrons mais superficiais, os mais susceptíveis à injúria.

A atividade da Na^+ -ATPase mensurada em animais adultos CAGE, neste estudo, mostrou um possível dano no ajuste fino da reabsorção de Na^+ no túbulo proximal e, também, não foi estimulada pela angiotensina II mesmo quando foram utilizadas concentrações que exercem efeito estimulatório máximo - 10^{-9} - 10^{-10} M (RANGEL et al, 2002). A redução na atividade da Na^+ -ATPase pode sugerir um mecanismo compensatório à maior atividade da Na^+ , K^+ -ATPase ou alteração no acoplamento dos receptores AT_1 e AT_2 à angiotensina II ou, ainda, alteração da via de sinalização da Na^+ -ATPase pela angiotensina II.

5 CONCLUSÃO

A carência em AGE desde o desmame teve pequeno impacto sobre a excreção eletrolítica renal no crescimento e não modificou a estrutura, a filtração e a função tubular proximal, avaliadas globalmente no rato adulto acordado. Entretanto, esta carência afetou transportadores envolvidos na homeostase do Na⁺ no animal adulto, possivelmente pela ausência do ácido linoléico. Estas alterações podem contribuir para a fisiopatologia da fibrose cística e insuficiência renal crônica. É possível que haja alterações em animais anestesiados, ou em segmentos tubulares isolados ou na indução da carência em AGE no período perinatal.

REFERÊNCIAS

AHMAD, S.; DASGUPTA, A.; KENNY, M.A. Fatty acid abnormalities in hemodialysis patients: effect of L-carnitine administration. **Kidney Int Suppl**, v. 27, p. 243-246, 1989.

AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ALAM, S.Q. et al. Effects of essential fatty acid deficiency on forskolin binding sites, adenylate cyclase and cyclic AMP-dependent protein kinase activity, the levels of G proteins and ventricular function in rat heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 8, p. 1593-1604, 1995.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4.ed. New York: Garland Science, 2002.

ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA, L. et al. Essential fatty acid deficiency profile in patients with nephrotic-range proteinuria. **Pediatr Nephrol**, v. 22, n. 4, p. 533-540, 2007.

AMARO, C.R.P.R. et al. Avaliação da função tubular proximal utilizando o *clearance* de lítio no tratamento pela Ciclosporina A em ratos. **J Bras Nefrol**, v. 19, n. 4, p. 369-375, 1997.

AL-TURKMANI, M.R; FREEDMAN, S.D.; LAPOSATA, M. Fatty acid alterations and n-3 fatty acid supplementation in cystic fibrosis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 77, n. 5-6, p. 309-318, 2007.

ANDERSON, R.J. et al. Prostaglandins: effects on blood pressure, renal blood flow, sodium and water excretion. **Kidney Int**, v. 10, n. 3, p. 205-215, 1976.

ARFI, T.S. **Evolution des lipids pendant la maturation des cellules digestives intestinales**: effects d'une carence em acides gras polyinsatures essentiels chez le rat en croissance. Diplome d'études approfondies. Paris: Universite Rene Descartes, 1987.

BARBERGER-GATEAU, P. et al. Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. **BMJ**, v. 325, n. 7370, p. 932-933, 2002.

BARCELLI, U.O. et al. Beneficial effects of polyunsaturated fatty acids in partially nephrectomized rats. **Prostaglandins**, v. 32, p. 211-219, 1986.

BARCELLI, U.O. Effect of dietary prostaglandin precursors on the progression of renal disease in animals. **Kidney International**, v. 39, n. 31, p. 57-64, 1991.

BARTELS, H.; BOHMER, M. A kinetic method for measurement of creatinine in serum. **Medicine Laboratory**, v. 26, n. 9, p. 209-215, 1973.

BAYLIN, A. et al. Adipose tissue α -linolenic acid and nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica. **Circulation**, v. 107, n. 12, p. 1586-1591, 2003.

BELTOWSKI, J. et al. Bidirectional regulation of renal cortical Na^+, K^+ -ATPase by protein kinase C. **Acta Biochim Pol**, v. 51, n. 3, p. 757-772, 2004.

BENATTI, P. et al. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 4, p. 281-302, 2004.

BERG, U.; KUSOFFSKY, E.; STRANDVIK, B. Renal function in cystic fibrosis with special reference to the renal sodium handling. **Acta Paediatr Scand**, v. 71, n. 5, p. 833-838, 1982.

BERNE, R.M. et al. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BHURA-BANDALI, F.N. et al. The ΔF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator alters control of essential fatty acid utilization in epithelial cells. **J Nutr**, v. 130, n. 12, p. 2870-2875, 2000.

BORLAND, V.G.; JACKSON, C.M. Effects of a fat-free diet on the structure of the kidney in rats. **Arch Pathol**, v. 11, p. 687-708, 1931.

BOUMENDIL-PODEVIN, E.F.; PODEVIN, R.A. Isolation of basolateral and brush-border membranes from the rabbit kidney cortex. Vesicle integrity and membrane sidedness of the basolateral fraction. **Biochim Biophys Acta**, v. 735, n. 1, p. 86-94, 1983.

BOURRE, J.M.; PICIOTTI, M.; DUMONT, O. Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging. **Lipids**, v. 25, n. 6, p.354-356, 1990.

BRADLEY, M.; SCHUMANN, G.B.; WARD, P.C.J. Examination of urine. In: HENRY, J.B. (Ed.) **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 16. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1979. p. 559-634.

BURNS, K.D.; INAGAMI, T.; HARRIS, R.C. Cloning of a rabbit cortex At₁ angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. **Am J Physiol**, v. 264, p. 645-654, 1993.

CALDER, P.C.; GRIMBLE, R.F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur J Clin Nutr**, v. 56, n. 3, p. 14-19, 2002.

CARUSO-NEVES, C. et al. Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 8, p. 1079-1084, 2001.

_____. Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. **Biophys Acta**, v. 1467, p. 189-197, 2000.

CHRISTON, R. et al. The effect of dietary essential fatty acid deficiency on the composition and properties of the liver microsomal membrane of rats. **J Nutr**, v. 118, n. 11, p. 1311-1318, 1988.

CLARK, W.F. et al. Comparative efficacy of dietary treatments on renal function in rats with subtotal nephrectomy: renal polyunsaturated fatty acid incorporation and prostaglandin excretion. **Clin Nephrol**, v. 33, p. 25-34, 1990a.

CLARK, W.F. et al. Effects of fish oil in the chronic remnant nephron model. **J Am Soc Nephrol**, v. 1, p.439, 1990b.

COGAN, M.G. **Fluid & Electrolytes: Physiology & Pathophysiology**. 1th ed. East Norwalk: Appleton & Lange, 1991.

COKA-GUEVARA, S. et al. Adenosine inhibits the renal plasma-membrane (Ca⁺²+Mg⁺²)-ATPase through a pathway sensitive to cholera toxin and sphingosine. **Eur J Biochem**, v. 263, n. 1, p. 71-78, 1999.

COSTE, T. et al. Beneficial effects of gamma linolenic acid supplementation on nerve conduction velocity, Na⁺,K⁺ ATPase activity, and membrane fatty acid composition in sciatic nerve of diabetic rats. **J Nutr Biochem**, v. 10, n. 7, p. 411-420, 1999.

COX, J.W. et al. Studies of the effects of essential fatty acid deficiency in the rat. **Circ Res**, v. 51, n. 6, p. 694-702, 1982.

CRAIG-SCHMIDT, M.C. Isomeric fatty acids: evaluating status and implications for maternal and child health. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 997-1006, 2001.

DANIELS, E.G. et al. Identification of prostaglandin E₂ as the principal vasodepressor lipid of rabbit renal medulla. **Nature**, v. 215, n. 5107, p. 1298-1299, 1967.

DAS, U.N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotech J**, v. 1, n. 4, p. 420-439, 2006.

_____. A defect in the activity of Δ^6 and Δ^5 desaturases may be a factor in the initiation and progression of atherosclerosis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 76, n. 5, p. 251-268, 2007.

DASGUPTA, A.; KENNY, M.A.; AHMAD, S. Abnormal fatty acid profile in chronic hemodialysis patients: possible deficiency of essential fatty acids. **Clin Physiol Biochem**, v. 8, n. 5, p. 238-243, 1990.

DE THOMAS, M.E. MERCURI, O.; SERRES, C. Effect of cross-fostering rats at birth on the normal supply of essential fatty acids during protein deficiency. **Jornal of nutrition**, v. 113, p. 314-319, 1983.

DE VIZIA, B. et al. Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 27, n. 1, p.52-57, 2003.

DJEMLI-SHIPKOLYE, A. et al. Differential effect of ω 3 PUFA supplementations on Na,K-ATPase and Mg-ATPase activities: possible role of the membrane ω 6/ ω 3 ratio. **J Membrane Biol**, v. 191, p. 37-47, 2002.

DVORAK, B.; STEPANKOVA, R. Effects of dietary essential fatty acid deficiency on the development of the rat thymus and immune system. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 46, n. 3, p. 183-190, 1992.

DWYER, T.M.; SCHMIDT-NIELSEN, B. The renal pelvis: machinery that concentrates urine in the papilla. **News Physiol Sci**, v. 18, p. 1-6, 2003.

EATON, D.C.; POOLER, J.P. **Fisiologia Renal de Vander**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ELIAS, S.L.; INNIS, S.M. Infant plasma *trans*, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 4, p. 807-814, 2001.

ESCUDERO, A. et al. Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1394, p. 65-73, 1998.

FAROOQUI, A.A.; RAPOPORT, S.; HORROCKS, L.A. Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. **Neurochem Res**, v. 22, n. 4, p. 523-527, 1997.

FARRELL, P.M. et al. Fatty acid abnormalities in cystic fibrosis. **Pediatr Res**, v. 19, n. 1, p. 104-109, 1985.

FAVRELÈRE, S. et al. Age related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus. **Neurobiol Aging**, v. 21, n. 5, p. 653-660, 2000.

FERAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: Hormonal control. **Physiol Rev**, v. 81, p. 345-418, 2001.

GARCIA, W.E.; GONTIJO, J.A.R.; FIGUEIREDO, J.F. "Clearance" de lítio como método de avaliação do manuseio tubular de sódio em ratos acordados, estudados em gaiolas metabólicas. **J Bras Nefrol**, v. 13, n. 3, p. 89-94, 1991.

GERBI, A. et al. Alteration of Na,K-ATPase isoenzymes in diabetic cardiomyopathy: effect of dietary supplementation with fish oil (n-3 fatty acids) in rats. **Diabetologia**, v. 40, n. 5, p. 496-505, 1997.

HALL, J.E. Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. **Am J Physiol**, v. 250, p. 960-972, 1986.

HANSEN, H.S. Essential fatty acid supplemented diet increases renal excretion of prostaglandin E2 and water in essential fatty acid deficient rats. **Lipids**, v. 16, n. 11, p. 849-854, 1981.

HAO, C.M.; BREYER, M.D. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. **Kidney International**, v. 71, p. 1105-1115, 2007.

HARRIS, K.P.G. et al. Essential fatty acid deficiency ameliorates acute renal dysfunction in the rat after the administration of the aminonucleoside of puromycin. **J Clin Invest**, v. 86, n. 4, p. 1115-1123, 1990.

HARRIS, P.J.; YOUNG, J.A. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. **Pflugers Arch**, v. 367, p. 295-297, 1977.

HARRIS, P.J.; HIRANYACHATTADA, S.; ANTOINE, A.M.; WALKER, L.; REILLY, A.M.; EITLE, E. Regulation of renal tubular sodium transport by angiotensin II and atrial natriuretic factor. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 3, p. 112-118, 1996.

HEIFETS, M. et al. Effect of dietary lipids on renal function in rats with subtotal nephrectomy. **Kidney Int**, v. 32, n. 3, p. 335-341, 1987.

HJELTE, L. et al. Renal function in rats with essential fatty acid deficiency. **Clinical Science**, v. 79, n.4, p. 299-305, 1990.

HOGG, R. J. et al. Efficacy of omega-3 fatty acids in children and adults with IgA nephropathy is dosage- and size-dependent. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.1, n. 16, p.1167-1172, 2006.

HOLMAN, R.T. et al. Essential fatty acid deficiency profiles in idiopathic immunoglobulin a nephropathy. **Am J Kidney Dis**, v. 23, n. 5, p. 648-654, 1994.

HOMAN VAN DER HEIDE, J.J. et al. The effects of dietary supplementation with fish oil on renal function in cyclosporine-treated renal transplant recipients. **Transplantation**, v. 49, n. 3, p. 523-527, 1990.

HUNTER, J.E. n-3 Fatty acids from vegetable oils. **Am J Clin Nutr**, v. 51, n. 5, p. 809-814, 1990.

ICHIKAWA, I.; HARRIS, R.C. Angiotensin actions in the kidney. Renewed insight into the old hormone. **Kidney Int**, v. 40, p. 583-596, 1991.

IMIG, J.D. Eicosanoids and renal vascular function in diseases. **Clin Sci, Lond**, v. 111, n.1, p. 21-34, 2006.

_____. Epoxyeicosatrienoic acids: biosynthesis, regulation and actions. **Methods Mol Biol**, v. 120, p. 173-192, 1999.

IMIG, J.D. et al. Formation and actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in rat renal arterioles. **Am J Physiol**, v. 270, p. 217-227, 1996.

INGRAM, A.J. et al. Effects of flaxseed and flax oil diets in a rat 5/6 renal ablation model. **Am J Kidney Dis**, v. 25, n. 2, p. 320-329, 1995.

INNIS, S.M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **J Pediatr**, v. 143, n. 4, p. 1-8, 2003.

_____. Present knowledge in nutrition: essential dietary lipids. **Int Life Sci Inst**, Washington, DC, p. 58-66, 1996.

_____. Trans fatty intakes during pregnancy, infancy and early childhood. **Atheroscler Suppl**, v. 7, n. 2, p. 17-20, 2006.

JACOBSON, H.R.; STRIKER, G.E.; KLAHR, S. **The principles and practice of nephrology**. 2. ed. Missouri: Mosby, 1995.

JOHANNSSON, A.; SMITH, G.A.; METCALFE, J.C. The effect of bilayer thickness on the activity of Na,K-ATPase. **Biochim Biophys Acta**, v. 641, n. 2, p. 416-421, 1981.

JUMP, D.B. et al. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Prog Lipid Res**, v. 35, n. 3, p. 227-241, 1996.

KATOH, T. et al. Renal hemodynamic actions of lipoxins in rats: a comparative physiological study. **Am J Physiol**, v. 263, p. 436-442, 1992.

KHWAJA, A. et al. The management of CKD: a look into the future. **Kidney Int**, v. 72, n. 11, p. 1316-1323, 2007.

KIRCHGESSNER, M. et al. The effects of dietary oils on the fatty acid composition and osmotic fragility of rat erythrocytes. **Z Ernahrungswiss**, v. 33, n.2, p. 146-158, 1994.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Renal Physiology**. 3th ed. Missouri: Elsevier Science, 2001.

KOOMANS, H.A.; BOER, W.H.; DORHOUT MEES, E.J. Evaluation of lithium clearance as a marker of proximal tubule sodium handling. **Kidney Int**, v. 36, n. 1, p. 2-12, 1989.

KOORTS, A.M.; VILJOEN, M.; KRUGER, M. C. Red blood cell fatty acid profile of chronic renal failure patients receiving maintenance haemodialysis treatment. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 67, n. 1, p. 13-18, 2002.

KOROTKOVA, M. et al. Perinatal essential fatty acid deficiency influences body weight and bone parameters in adult male rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1686, n. 3, p. 248-254, 2005.

KOROTKOVA, M.; STRANDVIK, B. Essential fatty acid deficiency affects the fatty acid composition of the rat small intestinal and colonic mucosa differently. **Biochim Biophys Acta**, v. 1487, n. 2-3, p. 319-325, 2000.

KRIS-ETHERTON, P. et al. AHA scientific statement: summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health. **J Nutr**, v. 131, p. 1322-1326, 2001.

KUROKAWA, K. Tubuloglomerular feedback, its physiological and pathophysiological significance. **Kidney Int**, v. 54, p. 71-74, 1998.

LARA, L.S. et al. Angiotensin (1-7) reverts the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na⁺-ATPase activity via a A779-sensitive receptor. **Regulatory peptides**, v. 103, n. 1, p. 17-22, 2002.

LAURITZEN, L. et al. The essentiality of long-chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Prog Lipid Res**, v. 40, n.1-2, p. 1-94, 2001.

LEITZMANN, M.F. et al. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 1, p. 204-216, 2004.

LEPAGE, G. et al. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. **J Lipid Res**, v. 30, n. 10, p. 1483-1490, 1989.

LEVY, E. *et al.* Lipoprotein abnormalities associated with cholesteryl ester transfer activity in cystic fibrosis patients: the role of essential fatty acid deficiency. **Am J Clin Nutr**, v. 57, n. 4, p. 573-579, 1993.

LEYSSAC, P.P. Validity of the lithium clearance concept assessed with micropuncture studies. **Kidney Int**, v. 37, n. 28, p. 17-21, 1990.

LIN, M.H. et al. Increase in Na,K-ATPase enzyme units in liver and kidneys from essential fatty acids deficient rats. **Experientia**, v. 35, n. 6, p. 735-736, 1979.

LOTE, C.J. **Principles of renal physiology**. 4. ed. Dordrecht: Kluwer, 2000.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n.1, p. 265-275, 1951.

MAIER, K.G.; ROMAN, R.J. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 10, n. 1, p. 81-87, 2001.

MAKAROV, V.L.; KUZNETSOV, S.R. Increased Na⁺,K⁽⁺⁾-pump activity in erythrocytes of rabbits fed cholesterol. **Int J Exp Pathol**, v. 76, n.2, p. 93-96, 1995.

MCLENNAN, P.L.; DALLIMORE, J.A. Dietary canola oil modifies myocardial fatty acids and inhibits cardiac arrhythmias in rats. **J Nutr**, v. 125, n. 4, p. 1003-1009, 1995.

MCMURCHIE, E.J. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function. **Physiological Regulation of Membrane Fluidity**, v. 3, p. 189-237, 1985.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 1. ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1980.

MILLS, D.E. et al. Psychosocial stress, catecholamines, and essential fatty acid metabolism in rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 205, n.1, p. 56-61, 1994.

MORIMOTO, K.C. et al. Hot topic: endogenous production of n-3 and n-6 fatty acids in mammalian cells. **J Dairy Sci**, v. 88, n. 3, p. 1142-1146, 2005.

MORRIS, M.C. et al. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. **Arch Neurol**, v. 60, n. 7, p. 940-946, 2003.

MOUSSA, M. et al. Dietary essential fatty acid deficiency differentially affects tissues of rats. **J Nutr**, v. 126, n. 12, p. 3040-3045, 1996.

MOZAFFARIAN, D. et al. Dietary intake of *trans* fatty acids and systemic inflammation in women. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 4, p. 606-612, 2004.

MUJAIS, S.K.; KAUFFMAN, S.; KATZ, A.I. Angiotensin II binding sites individual segments of the rat nephron. **J Clin Invest**, v. 77, p. 315-318, 1986.

MZAIL, A.H.; NOBLE, A.R. Haemorrhage-induced secretion of active and inactive renin in conscious and pentobarbitone-anaesthetized sheep. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 13, n. 2, p. 131-138, 1986.

NAKAGAWA, K. et al. Salt-sensitive hypertension is associated with dysfunctional *Cyp4a10* gene and kidney epithelial sodium channel. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1696-1702, 2006.

NESTEL, P.J. et al. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n-3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 6, p. 1163-1170, 1997.

OMINATO, M.; SATOH, T.; KATZ, A.I. Regulation of Na-K-ATPase activity in the proximal tubule: role of the protein kinase C pathway and of eicosanoids. **J Membr Biol**, v. 152, n. 3, p. 235-243, 1996.

PAIXÃO, A.D.O. et al. Renal effects of essential fatty acid deficiency in hydropenic and volume-expanded rats. **Kidney Blood Press Res**, v. 25, n. 1, p. 27-33, 2002.

PECK, L.W. Essential fatty acid deficiency in renal failure. Can supplements really help? **J Am Dietary Assoc**, v. 97, n. 10, p. 150-153, 1997.

PERETTI, N. et al. Mechanisms of lipid malabsorption in cystic fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. **Nutr Metab**, v. 2, n. 1, p. 1-18, 2005.

PHINNEY, S.D. et al. Thermogenesis secondary to transdermal water loss causes growth retardation in essential fatty acid-deficient rats. **Metabolism**, v. 42, n. 8, p. 1022-1026, 1993.

PRICKETT, J.D.; ROBINSON, D.R.; STEINBERG, A.D. Dietary enrichment with the polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid prevents proteinuria and prolongs survival in NZB x NZW F₁ mice. **J Clin Invest**, v. 68, n. 2, p. 556-559, 1981.

RALLIDIS, L.S. et al. Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. **Atherosclerosis**, v. 167, n. 2, p. 237-242, 2003.

RANGEL, L.B.A. et al. Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na⁺-ATPase activity through the activation of protein kinase C. **Biochim Biophys Acta**, v. 1564, n. 2, p. 310-316, 2002.

REMUZZI, G.; MINETTI, L. Hematologic consequences of renal failure. In: BRENNER, B.M. (Ed.) **Brenner and Rector's The kidney**. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 2079-2102.

RETTSTØL, K. et al. Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. **Reproduction**, v. 121, n.6, p.881-887, 2001.

RIEMERSMA, R.A. et al. Linoleic acid content in adipose tissue and coronary heart disease. **Br Med J**, v. 292, n. 6533, p. 1423-1427, 1986.

ROMAN, R.J. et al. Renal and cardiovascular actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 27, n. 11, p. 855-865, 2000.

ROSE, B.D. **Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders**. 4th ed. United States of America: McGraw-Hill, 1994.

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

SATOH, T.; COHEN, H.T.; KATZ, A.I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. Role of eicosanoids. **J Clin Invest**, v. 91, n. 2, p. 409-415, 1993.

SCHNERMANN, J.B.; SAYEGH, S.I. **Kidney Physiology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998.

SHAH, S.V.; FEEHALLY, J. The third World Kidney Day: looking back and thinking forward. **Nature clinical practice nephrology**, v. 4, n. 1, p.1, 2008.

SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. **The laboratory rat**. Flórida: CRC Press LLC, 1998.

SHIRLEY, D.G.; WALTER, S.J.; THOMSEN, K. A comparison of micropuncture and lithium clearance method in the assessment of renal tubular function in rats with diabetes insipidus. **Pflugers Arch**, v. 399, n. 4, p. 266-270, 1987.

SILVERTHORN, D.U. et al. **Fisiologia Humana**: uma abordagem integrada. 2. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2003.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 3, p. 560-569, 1999.

_____. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 23, p. 720-731, 1972.

SOARES, A.F. et al. Biochemical, functional, and histochemical effects of essential fatty acid deficiency in rat kidney. **Lipids**, v. 40, n. 11, p. 1125-1133, 2005.

SOARES, M.C. et al. Effect of essential fatty acid deficiency on membrane fatty acid content and growth hormone stimulation of rat pituitaries during postnatal development. **J Lipid Res**, v. 36, n. 6, p. 1401-1406, 1995.

SÖDERBERG, M. et al. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. **J Neurochem**, v. 54, n. 2, p. 415-423, 1990.

STENVINKEL, P. et al. Decreased renal clearance of sodium in cystic fibrosis. **Acta Paediatr Scand**, v. 80, n. 2, p. 194-198, 1991.

STOLL, L.L.; SPECTOR, A.A. Functional and ultrastructural effects of essential fatty acid deficiency in kidney epithelial cells. **Lipids**, v. 30, n. 12, p. 1093-1103, 1995.

STRANDVIK, B. et al. The effect on renal function of essential fatty acid supplementation in cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 115, n. 2, p. 242-250, 1989.

TAUSSKY, H.H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **J Biol Chem**, v. 202, p. 675-685, 1953.

THERIEN, A.G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, n. 3, p. 541-566, 2000.

THOMSEN, K.; HOLSTEIN-RATHLOU, N-H.; LEYSSAC, P.P. Comparison of three measures of proximal tubular reabsorption: lithium clearance, occlusion time and micropuncture. **Am J Physiol**, v. 241, n. 4, p. 348-355, 1981.

THOMSEN, K. Lithium clearance: a new method for determining proximal and distal tubular reabsorption of sodium and water. **Nephron**, v. 37, n. 4, p. 217-223, 1984.

_____. Lithium clearance as a measure of sodium and water delivery from the proximal tubules. **Kidney Int**, v. 37, n. 28, p. 10-16, 1990.

_____. The renal handling of lithium: relation between lithium clearance, sodium clearance and urine flow in rats with diabetes insipidus. **Acta Pharmacol Toxicol**, v. 40, n. 4, p. 491-496, 1977.

TINOCO, S.M.B. et al. Importâncias dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos *trans* do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Cad Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 525-534, 2007.

TRUMBO, P. et al. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **J Am Diet Assoc**, v. 102, n. 11, p. 1621-1630, 2002.

TSIMARATOS, M. et al. Y-linolenic acid restores renal medullary thick ascending limb Na^+, K^+ -ATPase activity in diabetic rats. **J Nutr**, v. 131, n. 12, p. 3160-3165, 2001.

TSIPAS, G.; MORPHAKE, P. Beneficial effects of a diet rich in a mixture of n-6/n-3 essential fatty acids and of their metabolites on cyclosporine-nephrotoxicity. **J Nutr Biochem**, v. 14, n. 11, p. 626-632, 2003.

UAUY, M.; DANGOUR, A.D. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. **Nutr Rev**, v. 64, n. 5, p. 24-33, 2006.

VALERO, V.B. **Manual para técnicos de biotério**. 1.ed. São Paulo: Hanna A.Rothschild, 1990.

VEREB, G. et al. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 14, p. 8053-8058, 2003.

VIEYRA, A. et al. Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. **J Biol Chem**, v. 261, n. 9, p. 4247-4255, 1986.

WERNER, A. et al. Essential fatty acid deficiency in mice is associated with hepatic steatosis and secretion of large VLDL particles. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 6, p. 1150-1158, 2005.

_____. Fat malabsorption in essential fatty acid-deficient mice is not due to impaired bile formation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, n. 4, p. 900-908, 2002.

WHEELER, D.C. et al. Effects of dietary fatty acids in an animal model of focal glomerulosclerosis. **Kidney Int**, v. 39, n. 5, p. 930-937, 1991.

WILLIARD, D.E. et al. Identification of a fatty acid Δ^6 -desaturase deficiency in human skin fibroblasts. **J Lipid Res**, v. 42, n. 4, p. 501-508, 2001.

WIJENDRAN, V.; HAYES, K.C. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. **Annu Rev Nutr**, v. 24, p. 597-615, 2004.

WOOD, L.G. et al. Hypothesis: Vitamin E complements polyunsaturated fatty acids in essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. **J Am Coll Nutr**, v. 22, n. 4, p. 253-257, 2003.

YARED, A.; KON, V.; ICHIKAWA, I. Mechanism of preservation of glomerular perfusion and filtration during acute extracellular fluid volume depletion. **J Clin Invest**, v. 75, n. 5, p. 1477-1487, 1985.

YOKOYAMA, H.; MATSUKAWA, R. Effect of dietary essential fatty acid deficiency on Ca^{2+} -ATPase activity in microsomal fraction of rat submandibular gland. **Int J Biochem**, v. 23, n. 9, p. 857-861, 1991.

ZOU, A.P. et al. Effect of P-450 omega-hydroxylase metabolites of arachidonic acid on tubuloglomerular feedback. **Am J Physiol**, v. 266, p. 934-941, 1994.

ANEXO A - Composição da dieta comercial utilizada na alimentação dos animais até o 21º dia de vida.

Enriquecimento por kg de ração *

Vitamina A	20.000 UI
Vitamina D ₃	6.600 UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B ₁₂	0,01 mg
Vitamina B ₂	8 mg
Pantotenato de Cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2.000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,1 mg
Ácido fólico	0,5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg

Níveis de garantia *

Umidade (máx.)	13%
Proteína (mín.)	23%
Extrato Etéreo (mín.)	2,5%
Fibras (máx.)	9,0%
Minerais (máx.)	7,5%
Cálcio (máx)	1,8%
Fósforo (mín.)	0,8%

Composição básica *: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fósforo bicálcio, sal, pré-mix, segundo *Purina do Brasil*.

ANEXO B - Análise físico-química da ração comercial realizada no laboratório de experimentação e análise de alimentos, do departamento de nutrição da UFPE.

ENSAIOS	RESULTADOS
Umidade e substâncias voláteis (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	9,93
Proteína (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	23,71
Cinzas (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	6,97
Gordura (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	5,13
Hidrato de Carbono (g/100g) (Método: por cálculo/ASCAR, 1985)	54,26
VCT (Kcal/100g) (Método: por cálculo)	358,05
Sódio (mg/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	62,63

ANEXO C - Análise físico-química da ração soja realizada no laboratório de experimentação e análise de alimentos, do departamento de nutrição da UFPE.

ENSAIOS	RESULTADOS
Umidade e substâncias voláteis (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	7,42
Proteína (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	17,61
Cinzas (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	3,40
Gordura (g/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	4,82
Hidrato de Carbono (g/100g) (Método: por cálculo/ASCAR, 1985)	66,75
VCT (Kcal/100g) (Método: por cálculo)	380,82
Sódio (mg/100g) (Método Adolfo Lutz, 1985)	60,47

ANEXO D - Fórmulas utilizadas para cálculos dos *clearances*, CF_{Na+} , FE_{Na+} , FE_{K+} , FE_{Li+} e manuseio tubular de Na^+ .

a) $AD_{Na+} = P_{Na+} \times C_{Li}$, onde P_{Na+} é a $[Na^+]_{soro}$

b) $CF_{Na+} = P_{Na+} \times C_{Cr}$

c) $C_{Cr} = [Cr]_{urina} \times V/[Cr]_{soro}$

d) $C_{Li+} = [Li^+]_{urina} \times V/[Li^+]_{soro}$

e) $FE_{Na+} = [Na^+]_{urina} \times [Cr]_{soro} / [Na^+]_{soro} \times [Cr]_{urina}$

f) $FE_{K+} = [K^+]_{urina} \times [Cr]_{soro} / [K^+]_{soro} \times [Cr]_{urina}$

g) $FE_{Li+} = [Li^+]_{urina} \times [Cr]_{soro} / [Li^+]_{soro} \times [Cr]_{urina}$

h) $RFrP_{Na+} = (CF_{Na+} - AD_{Na+})/CF_{Na+} \times 100$

i) $RFrD_{Na+} - I = [AD_{Na+} - (U_{Na} \times V)/AD_{Na+}] \times 100$

ANEXO E - Lista de equipamentos/aparelhos utilizados

- agulha orogástrica, J PETROVICH
- analisador seletivo de íons AVL 9180, ROCHE
- balança analítica, METTLER
- balança mecânica para ratos, OHAUS
- refratômetro para urina, ATAGO
- centrífuga modelo 206-R, FANEM
- centrífuga SORVALL RC-5B, empregando um rotor SS-34
- contador de cintilação líquida PACKARD TRI-CARB 2100 TR
- espectrofotômetro UV-VIS RS 0223, LABOMED
- espectrofotômetro Hitachi U-2001
- microscópio óptico OLYMPUS BX 50
- micrótomo STADIE-RIGGS
- ultracentrífuga BECKMAN L5-50B
- microcentrífuga de mesa, modelo MB, INT. EQUIPMENT CO.

ANEXO F - Nomenclatura e fórmula dos ácidos graxos citados no presente trabalho

8:00	ácido caprílico
10:00	ácido cáprico
12:00	ácido láurico
14:00	ácido mirístico
16:00	ácido palmítico
18:00	ácido esteárico
18:1n-9	ácido oléico
18:2n-6	ácido linoléico
18:3n-3	ácido linolênico
20:00	ácido araquidínico
20:1n-9	ácido gadoléico
22:00	ácido behênico
24:00	ácido lignocérico
20:5n-3	ácido eicosapentaenóico
22:6n-3	ácido docosahexaenóico
20:4n-6	ácido araquidônico
18:3n-6	ácido γ -linolênico
20:3n-6	ácido dihomog- γ -linolênico
22:5n-3	ácido docosapentaenóico
20:3n-9	ácido eicosatrienóico
16:1n-7	ácido palmitoléico
