Tatiana Martins Aniteli

**Efeitos da sobrecarga de fósforo dietético na
expressão dos cotransportadores NaP-IIb e
PiT-1 em ratos controles e urêmicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Nefrologia
Orientador: Prof.^a Dr.^a Vanda Jorgetti

**São Paulo
2015**

Tatiana Martins Aniteli

**Efeitos da sobrecarga de fósforo dietético na
expressão dos cotransportadores NaP-IIb e
PiT-1 em ratos controles e urêmicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Nefrologia
Orientador: Prof.^a Dr.^a Vanda Jorgetti

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Aniteli, Tatiana Martins

Efeitos da sobrecarga de fósforo dietético na expressão dos contrantransportadores NaP-IIb e PiT-1 em ratos controles e urêmicos / Tatiana Martins Aniteli. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.NaP-IIb 2.PiT-1 3.Doença renal crônica 4.Uremia
5.Nefrectomia 5/6 6.Fósforo 7.Absorção intestinal 8.Intestino delgado
9.Apoptose

USP/FM/DBD-147/15

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 16 (LIM-16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), bolsa de doutorado (2011/00230-0) e auxílio regular (2011/00036-0).

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, professores, amigos ...

*e a todos aqueles que, como eu, adoram se arriscar em um
novo desafio na vida!*

Agradecimentos especiais

A minha orientadora, Profa. Dra. Vanda Jorgetti. Agradeço por ter me acolhido e aceito que esta tese fosse realizada sob sua orientação. Agradeço a confiança, o incentivo, todo o apoio, a liberdade que me proporcionou para o desenvolvimento das atividades e por acreditar que seria possível! Muito obrigada pela sua disponibilidade, atenção, convívio harmonioso, por todos os ensinamentos e exemplo de pesquisadora e profissional.

À amada amiga Flávia Ramos de Siqueira, que não foi só pessoa fundamental no final deste processo para que a tese pudesse ser concluída, como foi especial no começo e no meio. No começo, pois foi quem de graça esbanjou simpatia, sorrisos e conversas num ambiente novo, além de ser exemplo no cuidado com os animais e no modo de organizar os cadernos de experimentos. No meio, por oferecer amizade e companheirismo despretensiosos em toda atividade curricular e extracurricular, e por ter sido responsável por eu ter nestes 4 anos o que me trouxe mais alegrias, contusões e espetáculos na vida. 'Obrigadaaaa' Flavinha!

À Profa Dra Lígia Araújo Martini, minha querida orientadora durante a graduação, grande incentivadora para que trabalhos científicos fossem realizados, apresentados, publicados e compartilhados. Agradeço todo o

apoio e devo este meu doutorado direto a você, que além de tudo me deu oportunidades ímpares de crescer como nutricionista.

À Profa Dra Patrícia Castelucci por abrir as portas do seu laboratório para realização dos experimentos de imunofluorescência e ter dado suporte no aprendizado para que a pesquisa em tecido intestinal fosse realizada com o esmero devido.

Aos meus pais por me ajudarem a ter o melhor apoio de todos estes citados acima, que é a fé em Deus de que tudo no final dá certo e que nada acontece se não for por vontade Dele.

Agradecimentos

À Dra Kátia Neves pela e Dra Irene Duayer por terem sido as primeiras com quem aprendi detalhes da nefrectomia em ratos, instrumentais e sutura. Agradeço muito por toda a calma e didática com que fazem isso.

À Flávia Gomes Machado pela parceria no começo deste projeto. Agradeço por ter me ensinado o “savoir-faire” de muitas coisas e com que eu tivesse mais claras as minhas perguntas e buscasse foco nas respostas. Agradeço pelos dias de trabalhos árduos, mas que tiveram bom humor, música,

piadas e seu sorriso sempre bem disposto, além de uma parceria ímpar. Senti sua falta!

À Dra Luciene Magalhães e Dra Rosa Maria Moysés pela disposição em ajudar atenciosamente, pelos esclarecimentos, discussões dos resultados. Agradeço o convívio, exemplo e sábios comentários.

Ao Wagner Vasques Rodrigues pela disposição de ajudar sempre. Pelas diversas vezes que incansavelmente repetiu comigo contas de titulação, confirmou tudo para ver se não fazia errado e se propôs a ajudar no que precisasse.

À minha querida aluna de iniciação científica Renata Amaral de Souza Marinho, pelo ano que dividi com você os experimentos, as dificuldades, as tardes no ambulatório, as questões só de nutricionista e as risadas nos momentos bons e ruins. Pró-ativa, dedicada e muito cuidadosa com o que faz... Você é muito especial!

A todas as pessoas que em algum momento deram sua contribuição ao meu aprendizado, repassando seus conhecimentos e auxiliando na solução dos problemas encontrados durante as etapas deste projeto: Dra Patrícia Gama, Rubia Misawa, Valéria (LIM-10), Dra Walcy Teodoro e Paula (LIM-17), Joelcimar M. da Silva (ICB III) e Ana Lucia Garippo (confocal INCOR).

Aos amigos Fabiana Graciolli, Rackel Mota, Roxana Camelo, Rodrigo Azevedo, Rodrigo Bueno, Verônica Gouveia,

Raquel Cavallari que estiveram próximos em algum momento destes quatro anos e por quem vou sempre guardar muito carinho e admiração.

A todos do LIM-16: Denise Duarte, Solange Coutinho, Rosimeire Bizerra, Claudia, Newton, Janice, Camilla Fanelli, Ivone Braga, Victor Ávila, Orestes F. Neto, Simone Arias, Viviane Dias, Priscila Seravalli, Carolina Romão, Sônia Soto, Isis Akemi, Rafael, Ellen, Guilherme, Dra Luzia Furukawa, Dr Joel, Dra Clarice e Dr Roberto Zatz pelos momentos compartilhados!

Aos meus mais que queridos amigos que entenderam ausências, torceram e se alegraram pelas conquistas: Graziella, Letícia, Vivi, João Rodrigo, Paulinho, Daniel, Camila, Ricardo Sá, Danilo (Balu), Ana Paula, Yana, Thaís, Cíntia, Cris e tantos outros que posso não ter referido, mas que estão bem representados por estes citados!

À instituição de fomento FAPESP pelo auxílio financeiro, o qual permitiu o desenvolvimento deste estudo e foram fundamentais para minha formação acadêmica e científica.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Nefrologia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Aprender é descobrir aquilo que já se sabe.
Fazer é demonstrar que você o sabe.
Ensinar é lembrar aos outros que eles sabem tanto quanto você.
Somos todos aprendizes, fazedores, professores.
Você ensina melhor o que mais precisa aprender."
(Richard Bach)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	1
1.1. Fisiologia do Intestino Delgado.....	2
1.2. Homeostase do fósforo	5
1.3. Regulação da absorção de fósforo	10
1.4. Metabolismo mineral e perspectivas de pesquisa.....	12
2. Objetivo	15
2.1 Objetivos específicos.....	15
3. Metodologia	16
3.1. Modelo experimental.....	16
3.2 Imunofluorescência	20
3.3. Expressão proteica.....	21
3.3.1. Extração de proteínas	21
3.3.2. Western Blotting (WB).....	21
3.3.3 ELISA indireto	23
3.4. Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real	23
3.4.1. Extração, purificação e integridade do RNA total.....	23
3.4.2. Síntese do DNA complementar	24
3.4.3. Desenho e concentração dos oligos (<i>primers</i>).....	25
3.4.4. Reação de qRT-PCR.....	26
3.5. Apoptose dos enterócitos nos diferentes segmentos do intestino delgado	28
3.6. Análises estatísticas	29
4. Resultados	30
4.1. Dados gerais dos animais	30
4.2. Análise qualitativa da expressão dos cotransportadores.....	36
4.3. Análise quantitativa da expressão proteica dos cotransportadores.....	40

4.4. Análise quantitativa da expressão gênica dos cotransportadores	44
4.5. Análise quantitativa de apoptose no epitélio intestinal	47
5. Discussão	50
6. Conclusões	54
7. Referências Bibliográficas.....	56

ANEXOS

Anexo I. Dieta Harlan-Teklad, fósforo 0,02% (Baixa).....	I
Anexo II. Dieta Harlan-Teklad, fósforo 0,54% (Padrão).....	II
Anexo III. Dieta Harlan-Teklad, fósforo 0,9% (Alta)	III
Anexo IV. Certificado do prêmio de melhor trabalho as Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (2013)	IV
Anexo V. Certificado de 2º melhor pôster no Congresso Paulista de Nefrologia (2013).V	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte histológico de duodeno. Coloração pelo Azul de Toluidina.	3
Figura 2. Microarquitetura da borda em escova presente na região apical de enterócitos por microscopia de varredura.	3
Figura 3. Comparação da topologia secundária das proteínas SLC34 e SLC20.	10
Figura 4. Desenho do protocolo experimental realizado.	17
Figura 5. Evolução do peso corpóreo dos animais controles e urêmicos.	30
Figura 6. Níveis séricos de fósforo nos animais dos grupos controles e urêmicos.	33
Figura 7. Fração de excreção de fósforo nos animais controles e urêmicos.	33
Figura 8. Dupla marcação dos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 no duodeno, jejuno e íleo de animais controle e urêmicos submetidos à dieta baixa em fósforo.	37
Figura 9. Dupla marcação de cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 no duodeno, jejuno e íleo de animais controle e urêmicos submetidos à dieta padrão em fósforo.	38
Figura 10. Dupla marcação de cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 no duodeno, jejuno e íleo de animais controle e urêmicos submetidos à dieta alta em fósforo.	39
Figura 11. Análise da expressão proteica do cotransportador NaP-IIb na mucosa do intestino delgado de animais controles e urêmicos submetidos a diferentes concentrações de fósforo na dieta, realizada pela técnica de Western blotting.	41
Figura 12. Análise da expressão proteica do cotransportador PiT-1 na mucosa de intestino delgado de animais controles e urêmicos submetidos a diferentes concentrações de fósforo na dieta, realizada pela técnica de ELISA.	43
Figura 13. Expressão gênica do cotransportador NaP-IIb na mucosa de intestino delgado de animais controles e urêmicos submetidos a diferentes concentrações de fósforo na dieta, realizada pela técnica de PCR em tempo real.	45
Figura 14. Expressão gênica do cotransportador PiT-1 na mucosa de intestino delgado de animais controles e urêmicos submetidos a diferentes concentrações de fósforo na dieta, realizada pela técnica de PCR em tempo real.	46
Figura 15. Análise de apoptose em enterócitos do intestino delgado de animais controles e urêmicos submetidos a diferentes concentrações de fósforo na dieta, realizada pela técnica de TUNEL.	48
Figura 16. Micrografia representativa da técnica de TUNEL realizada em duodeno de animais controles e urêmicos.	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais cotransportadores de fósforo e distribuição tecidual 6

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica usando qRT-PCR..... 26

Tabela 3. Concentrações séricas e urinárias de parâmetros bioquímicos dos grupos controles e urêmicos, de acordo com a concentração de fósforo na dieta..... 32

Tabela 4. Concentrações séricas e urinárias de parâmetros bioquímicos dos grupos controles e urêmicos, de acordo com a concentração de fósforo na dieta..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	<i>3-amino-9-ethyl-carbazol</i>
Akt	proteína quinase B
As	arsenato inorgânico
APS	adenina 5-fosfosulfato
ATP	adenosina trifosfato
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	controle
Ca	cálcio
Cai	cálcio iônico
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
cols.	colaboradores
Ct	<i>cycle threshold</i>
DEPEC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
DRC	doença renal crônica
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>enzyme linked immunono sorbent assay</i>
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
FeP	fração de excreção de fósforo
FGF-23	<i>fibroblast growth factor</i>
Ht	microhematócrito
HPTS	hiperparatiroidismo secundário
HRP	horseradish peroxidase
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NaP	cotransportador sódio fósforo
P	fósforo inorgânico

PiT	cotransportador sódio fósforo
PFA	<i>phosphonoformic acid</i>
primer	oligonucleotídeo iniciador
RIPA	tampão para <i>radio immuno precipitation assay</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
PCR	reação em cadeia da polimerase
RT	transcriptase reversa
RT-PCR	transcrição reversa seguida por PCR
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativo
SLC	solute carrier family
TA	temperatura ambiente
TFG	taxa de filtração glomerular
Tm	temperatura de <i>melting</i> (desnaturação)
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
VDR	receptor de vitamina D

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
±	mais ou menos
> e <	maior e menor
ANOVA	análise de variância
°C	grau Celsius
Na ⁺	sódio
Ca	cálcio
Cl ⁻	cloreto
cm	centímetro
d	dia
dL	decilitro
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
h	hora
kDa	quilo dalton
kg	quilograma
L	litro
min	minuto
mg	miligrama
mEq	miliequivalente
nm	nanômetro
p	coeficiente de significância estatística
pK	constante de ionização
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
sem	semana
x	vezes
µg	micrograma
µL	microlitro

RESUMO

Aniteli T.M. Efeitos da sobrecarga de fósforo nos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 em ratos controles e urêmicos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O fósforo é um dos minerais mais abundantes no corpo além de ser essencial para muitos processos biológicos. A homeostase do fósforo depende da absorção no intestino, da excreção renal, da remodelação óssea e de hormônios como o paratormônio, calcitriol e FGF-23. Nos pacientes com doença renal crônica, a excreção urinária de fósforo está comprometida levando à hiperfosfatemia, que contribui para o aumento da morbidade e mortalidade desses pacientes. A absorção intestinal de fósforo no intestino delgado, particularmente via cotransportadores NaP-IIb e PiT-1, é pouco estudada. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de dietas com diferentes concentrações de fósforo na expressão proteica e gênica dos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1, bem como na apoptose dos enterócitos dos diferentes segmentos do intestino delgado de animais controles e urêmicos. Estudamos setenta e seis ratos Wistar machos, inicialmente divididos em dois grupos: controles (C) e urêmicos (Nx). Cada grupo foi subdividido em outros três, de acordo com a concentração de fósforo (P) na dieta: dieta Baixa (0,2%), dieta Padrão (0,54%) e dieta Alta (0,9%). Analisamos parâmetros bioquímicos (creatinina, P, Cai, PTH e FGF-23), a expressão proteica dos cotransportadores, através de Western Blotting, ELISA e imunofluorescência, a expressão gênica por PCR em tempo real e a apoptose dos enterócitos pela técnica TUNEL. Os resultados mostraram que os níveis séricos de creatinina, P, PTH e FGF-23 foram significativamente mais elevados nos animais Nx. Nos animais C com dieta baixa em P observamos aumento da expressão proteica do cotransportador NaP-IIb em todos os segmentos do intestino enquanto, no Nx Baixo, a expressão desse cotransportador foi menor somente no jejuno. Quanto ao PiT-1, sua expressão foi menor no íleo do grupo Nx Alto comparado ao seu respectivo controle. A expressão gênica do cotransportador NaP-IIb foi menor no jejuno do Nx Alto e maior no íleo desse mesmo grupo em relação aos seus respectivos controles. A expressão gênica do PiT-1 foi maior em todos os segmentos do grupo Nx Baixo em relação aos seus controles. Detectamos uma correlação direta entre a expressão gênica do NaP-IIb no jejuno com o fósforo sérico. A expressão gênica do PiT-1 no jejuno correlacionou-se com o fósforo sérico e no duodeno e jejuno, com os níveis séricos de FGF-23. No duodeno e no jejuno, a porcentagem de enterócitos apoptóticos foi maior nos animais Nx Alto comparados aos controles, particularmente no duodeno a porcentagem dessas células também foi maior no grupo Nx Baixo e controle padrão. Já no jejuno, tanto o grupo Nx baixo quanto no Nx Padrão observamos menos células apoptóticas que nos seus respectivos controles. Quando analisamos conjuntamente todos os segmentos intestinais o grupo Nx alto apresentou mais células apoptóticas que o controle e o oposto foi observado nos grupos Nx Baixo e Nx Padrão. Em conclusão, dietas com distintas concentrações de fósforo promovem modificações na expressão proteica e gênica dos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 no intestino delgado que não seguem um padrão uniforme. A sobrecarga de fósforo aumenta a porcentagem de enterócitos apoptóticos nos animais urêmicos.

Descritores: 1.NaP-IIb 2.PiT-1 3.Doença Renal Crônica 4.Uremia 5.Nefrectomia 5/6, 6.Fósforo 7.Absorção intestinal 8.Intestino delgado 9.Apoptose

ABSTRACT

Aniteli T.M. Phosphorus overload effects on NaP-IIb and PiT-1 cotransporters in control and uremic rats [thesis]. São Paulo: University of São Paulo School of Medicine; 2015.

Phosphorus is one of the most abundant minerals in the body besides being essential for many biological processes. Phosphorus homeostasis depends on absorption in the small intestine, renal excretion, bone remodeling and hormones such as parathyroid hormone, calcitriol and FGF-23. In patients with chronic kidney disease phosphorus urinary excretion is compromised leading to hyperphosphatemia, which contributes to increased morbidity and mortality of these patients. Intestinal absorption of phosphorus in the small intestine, particularly of NaP-IIb and PiT-1 cotransporters is poorly studied. The aim of this study was to evaluate the effects of diets with different concentrations of phosphorus in protein expression and gene of NaP-IIb and PiT-1 cotransporters as well as in apoptosis of enterocytes of different segments of intestine in control and uremic animals. We studied seventy-six male Wistar rats initially divided into two groups: controls (C) and uremic (Nx). Each group was subdivided into three others, according to the phosphorus concentration in the diet: Low diet (0.2% P), Standard diet (0.54% P) and High diet (0.9% P). We analyzed biochemical parameters (creatinine, P, iCa, PTH and FGF-23), protein expression of cotransporters, using Western Blot, ELISA, immunofluorescence, real-time PCR and apoptosis of enterocytes using the TUNEL technique. Results showed that serum creatinine, P, PTH and FGF-23 were significantly higher in Nx animals. In C animals with a diet low in P we observed increase in protein expression of NaP-IIb cotransporter in all segments of the intestine while in low Nx expression of this cotransporter was lower only in jejunum. As for PiT-1 expression was lower in the ileum of the high Nx group compared to their respective control. Gene expression of NaP-IIb cotransporter was lower in the jejunum of high Nx and higher in the ileum of the same group as compared to their respective controls. PiT-1 gene expression was higher in all segments of the low Nx group compared to their controls. We detected a direct correlation between the gene expression of NaP-IIb in jejunum and serum phosphorus. Gene expression of PiT-1 correlated with serum phosphorus in the jejunum, and correlated with the serum levels of FGF-23 in the jejunum and duodenum. In the duodenum and jejunum the percentage of apoptotic enterocytes was higher in high Nx animals compared to controls; particularly in the duodenum the percentage of these cells was also higher in low Nx group and standard control. In the jejunum in both low Nx group and standard Nx we observed fewer apoptotic cells than in their respective controls. When we analyze all intestinal segments together the high Nx group had more apoptotic cells than the control, and the opposite was observed in the low Nx group and standard Nx group. In conclusion, diets with different phosphorus concentrations promote changes in protein expression and gene of NaP-IIb and PiT-1 cotransporters in the small intestine that do not follow a uniform pattern. Phosphorus overload increases the percentage of apoptotic enterocytes in uremic animals.

Keywords: 1.NaP-IIb 2.PiT-1 3.Chronic renal insufficiency 4.Uremia 5.5/6 Nephrectomy 6.Phosphorus 7.Intestinal absorption 8.Small Intestine 9.Apoptosis

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O fósforo inorgânico (P) é um dos mais abundantes minerais do corpo e essencial para os seres vivos, pois participa da proliferação celular, é um dos componentes do DNA e RNA, da membrana celular, contribui para a geração de ATP, sinalização celular, atividade enzimática e muscular, mineralização óssea e para o equilíbrio ácido-base, atuando como tampão no sangue e na urina (Berndt & Kumar, 2008; Lee & Marks, 2015; Wagner et al., 2014; Tenenhouse, 2007; Bergwitz & Jüppner, 2011; Kiela & Ghishan, 2009).

No plasma, o P encontra-se predominantemente (72%) na forma bivalente (HPO_4^{2-}) e 28% monovalente (H_2PO_4^-). Essa distribuição depende da sua constante de ionização pK de 6,8 e do pH no sangue de 7,4. A sua concentração extracelular depende, em grande parte, da excreção realizada pelos rins (Wagner et al., 2014).

O controle do P plasmático através da excreção renal, e em menor grau da absorção gastrointestinal, é regulado de maneira complexa envolvendo diversos órgãos e hormônios (Wagner et al., 2014).

Há evidências crescentes de que alterações na homeostase do P podem resultar na deposição de cálcio (Ca) e P nos vasos sanguíneos, provocando enrijecimento das artérias e disfunção miocárdica (Marks et al., 2013). A hiperfosfatemia persistente, como a que ocorre na Doença Renal Crônica (DRC) pode modificar o fenótipo das células musculares lisas endoteliais que passam a se comportar como osteoblastos levando a calcificação vascular e desenvolvimento de doenças cardiovasculares. (Chavkin et al., 2015).

Assim, embora essencial em diversas funções biológicas, a retenção de P sérico na DRC é um fator de risco independente para o rápido declínio da função renal, observado em modelos experimentais, e maior mortalidade entre indivíduos com função renal normal ou em fase pré-dialítica (Neves et al., 2004; Spasovski et al., 2009; Adeney et al., 2009). Na fase dialítica, a hiperfosfatemia se exacerba visto que a excreção renal de P é praticamente nula e a remoção pela diálise insuficiente. A hiperfosfatemia favorece, portanto, complicações como calcificações ectópicas e doenças cardiovasculares, que é a principal causa de morte nesses pacientes (Prié et al., 2011; Block et al., 1998; Hutchison, 2009; Marks et al., 2007; Wagner et al., 2007; Giral et al., 2009; Qunibi, 2005; Santoro & Cianciaruso, 2008).

Na DRC, o controle dos níveis sanguíneos de P é difícil e, por isso, a ingestão alimentar e a absorção intestinal regulada, em parte, pelos cotransportadores assumem grande importância (Marks et al., 2013; Tenenhouse, 2007). Para reduzir a absorção intestinal, quelantes de P são largamente utilizados, porém apresentam efeitos colaterais indesejáveis e não atuam diretamente nos cotransportadores. Assim, o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos no transporte intestinal de P pode contribuir para um melhor controle da hiperfosfatemia (Marks et al., 2010).

1.1. Fisiologia do Intestino Delgado

O intestino delgado, principal segmento de digestão e absorção de nutrientes, é formado por dobras da camada mucosa e submucosa e por vilosidades também conhecidas como vilos, que são projeções da lâmina própria que aumentam consideravelmente a superfície absorptiva.

Subdivido em três regiões, duodeno, jejuno e íleo, quatro tipos celulares são identificados: células colunares absorptivas ou enterócitos, caliciformes ou “globet” produtoras de muco, células de *Paneth* secretoras de substâncias como lisozimas que atuam no controle do crescimento bacteriano e células enteroendócrinas, das quais foram identificadas mais de dez populações distintas que produzem hormônios gastrointestinais (Thomson et al., 2003).

As células intestinais derivam de células indiferenciadas localizadas no fundo das criptas de *Lieberkühn*, depressões do revestimento epitelial, também conhecidas como zona proliferativa. Essas células sofrem um processo gradual de diferenciação à medida que migram para a superfície da vilosidade, onde irão assumir as funções de cada um dos tipos celulares descritos anteriormente (Thomson et al., 2003; Pinho & Rossi, 1998).

Os enterócitos proliferam na cripta, migram para o ápice das vilosidades e são eliminados no lúmen intestinal, passando, portanto, por constante processo de divisão, migração, diferenciação, apoptose e esfoliação (Thomson et al., 2003). Nos ratos, o ciclo proliferativo se faz a cada 24 horas e a vida média das células é de dois dias (Caruso & Demonte, 2005). Nos humanos, todo o epitélio é renovado no período de três a cinco dias (Simons & Clevers, 2011).

Figura 1. Corte histológico de duodeno. Coloração pelo Azul de Toluidina. Seta vermelha: enterócito; Seta branca: célula caliciforme; Seta preta: região de cripta. Aumento 400x.

Cada enterócito possui microvilosidades em seu ápice, formando o que se conhece por borda em escova (Figura 2). Estas projeções da membrana se apoiam no citoesqueleto da célula, o qual é constituído por filamentos de actina associados à fimbrina e vilina, e aumentam consideravelmente a superfície de absorção do intestino. A expressão das proteínas transportadoras de membrana é controlada pela interação de componentes que se conectam direta ou indiretamente a este citoesqueleto (Reining et al., 2010).

Figura 2. Microarquitetura da borda em escova presente na região apical de enterócitos por microscopia de varredura. Adaptado de Sobotta J. Atlas de Histologia (2007).

As proteínas transportadoras responsáveis pela absorção de substâncias do lúmen e transporte de nutrientes do citoplasma para o sangue, ou vice-versa, são localizadas na região apical e basolateral dos enterócitos, respectivamente (Boudry et al., 2010).

Além disso, estruturas de membrana especializadas conhecidas como *tight junctions* são responsáveis pela coesão entre as células e pelas propriedades de barreira do epitélio intestinal, controlando a permeabilidade e compondo parte do transporte paracelular (Ivanov, 2012).

O intestino é capaz de adaptar-se morfológica e funcionalmente a estímulos internos e externos, sendo esta propriedade conhecida como enteroplasticidade que determina alterações fisiológicas, celulares e moleculares (Drozdowski et al., 2009).

As mudanças morfológicas e funcionais do intestino incluem aumento da profundidade das criptas e comprimento de vilosidades, proliferação dos enterócitos e consequente aumento da absorção de eletrólitos e demais compostos presentes no lúmen intestinal (Drozdowski et al., 2009). Estas alterações, ditas não específicas, favorecem a absorção de nutrientes, inclusive dos que são absorvidos pela via paracelular, por aumento da fluidez e permeabilidade da membrana (Drozdowski et al., 2006).

Marks e colaboradores (2007), estudando a absorção intestinal de P na DRC, especificamente no duodeno e jejuno, não mostraram alterações morfológicas nas vilosidades de animais doentes quando comparados aos controles, no que diz respeito ao tamanho das vilosidades ou profundidade das criptas.

Mecanismos específicos, por sua vez, podem se alterar na doença especialmente a taxa máxima de transporte de nutrientes e a constante de afinidade dos transportadores. O aumento na taxa de transporte é resultante do aumento no número de células absorptivas, maior número de transportadores por enterócito ou aumento intrínseco da atividade do transportador (Drozdowski et al., 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram que a sobrecarga de P causa apoptose de células ósseas e endoteliais de maneira tempo e dose dependente (Meleti et al., 2000; Chen et al., 2015). Mansfield e cols. (1999), estudando condrócitos demonstraram que, após 48h de exposição a altas concentrações de P, 30% dessas células sofriam apoptose, sugerindo que a sobrecarga desse elemento, poderia interferir na maturação e na mineralização da matriz extracelular.

Até o presente momento não se avaliou se a sobrecarga de P, situação frequente nos pacientes com DRC, poderia promover apoptose dos enterócitos.

1.2. Homeostase do fósforo

A homeostase do P depende da absorção no intestino delgado (dieta), da excreção renal e da remodelação óssea. (Wagner et al., 2007; Marks et al., 2007, Takeda et al., 2007; Uribarri, 2007; Tenenhouse, 2007).

Ao longo do dia a concentração sanguínea de P varia de 2,7 a 4,5 mg/dL, com valores mais baixos pela manhã (Uribarri, 2007). A concentração de P não é estritamente regulada como a de cálcio (Ca), que se mantém mais constante ao longo de dia. Assim, embora não exista um mecanismo rígido de controle do P sérico, tanto a hiper como a hipofosfatemia podem acarretar danos ao indivíduo.

De acordo com os valores de referência propostos pelo *Food and Nutrition Board*, a recomendação diária de ingestão de P é de 700 mg para adultos saudáveis. Habitualmente, a ingestão varia de 800 a 1400 mg, e cerca de 70% desse elemento é absorvido ao longo do intestino delgado, principalmente no jejuno (Uribarri, 2007; Wagner et al., 2014).

A absorção intestinal de P se dá por duas vias: 1) paracelular através das *tight junctions* por difusão passiva no espaço intercelular lateral e 2) transcelular através de cotransportadores presentes na membrana celular (Eto et al., 2006; Katai et al., 1999; Marks et al., 2010).

A absorção paracelular acontece, sem intervenção de hormônios e/ou outros fatores, sempre que a concentração de P no lúmen intestinal excede 50 mg/L, valor quase sempre alcançado após as refeições (Eto et al., 2006).

Em contrapartida, a via transcelular depende do gradiente de sódio (Na) entre o lúmen e o interior da célula constituindo um transporte ativo secundário que se dá pelos chamados cotransportadores sódio fosfato (NaP). Eto e cols. (2006), estudando a via transcelular no epitélio jejunal, verificaram que 78% da absorção era mediada por cotransportadores, corroborando os achados de Loghman-Adham (1993).

A energia para esse processo deriva do gradiente eletroquímico de Na^+ mantido pela bomba Na/K ATPase, que favorece o influxo de P para dentro das células. Vale ressaltar que, evolutivamente, os organismos vivos expressam mais de um transportador

para acumular P, dada sua grande importância na fisiologia como abordado anteriormente (Uribarri 2007; Forster et al., 2011).

Atualmente, três famílias de cotransportadores são conhecidas e designadas com base na similaridade estrutural da sequência de seus aminoácidos. Esses cotransportadores diferem entre si por sua afinidade pelo P, distribuição e mecanismos que controlam sua atividade (Prié et al., 2005).

A tabela 1 resume os principais tipos de cotransportadores e sua distribuição tecidual.

Tabela 1. Principais características dos cotransportadores de fósforo e distribuição tecidual

Símbolo do Gene	Proteína	Substrato predominante	Íons de transporte	Distribuição tecidual e celular
SLC17	NPT1, NPT3, NPT4	P e outros ânions	P, Li	Hemácias, membranas microsossomais de rim, intestino e fígado
SLC34a1	NaP-IIa	P bivalente	Na/HPO ₄ ²⁻	Rim (túbulo proximal, membrana apical), células ósseas e neurônios
SLC34a2	NaP-IIb	P bivalente	Na/HPO ₄ ²⁻	Intestino delgado, pulmão, osteoblasto, fígado, testículos, glândulas mamárias e salivares
SLC34a3	NaP-IIc	P bivalente	Na/HPO ₄ ²⁻	Rim (túbulo proximal, membrana apical)
SLC20a1	PiT-1	P monovalente	Na/H ₂ PO ₄ ⁻	Diversos tecidos, incluindo intestino
SLC20a2	PiT-2	P monovalente	Na/H ₂ PO ₄ ⁻	Rim (túbulo proximal, membrana apical), intestino

O cotransportador NaP tipo I (SLC17) é representado por 3 membros: NPT1, NPT3, NPT4. Estes transportadores são encontrados nas hemácias ou em membranas microsossomais de células renais, intestino e fígado e suas funções não são totalmente conhecidos. Além do P, estes cotransportadores também transportam outros ânions (Prié et al., 2005).

A outra família de cotransportadores envolvidos na homeostase do P é do tipo II (SLC34) e inclui os membros NaP-IIa (SLC34a1), NaP-IIb (SLC34a2) e NaP-IIc (SLC34a3). O transporte de P no intestino, ossos e rins é mediado por esses

cotransportadores e são essenciais para manutenção da homeostase em vertebrados (Marks et al, 2007; Forster et al., 2011; Kiela & Ghishan, 2009; Capuano et al., 2005; Wagner et al., 2007).

O conhecimento da estrutura destes cotransportadores deriva de estudos biofísicos e as três isoformas diferem nas porções C- e N-terminais e no *loop* extracelular, o qual contém dois locais de N-glicosilação e uma ponte bissulfito que liga as duas metades da proteína (Wagner et al., 2014). (Figura 3)

As isoformas NaP-IIa e NaP-IIc estão presentes na borda em escova das células dos túbulos renais proximais, com maior expressão nos segmentos S1 dos néfrons justamedulares (Wagner et al., 2014; Murer et al., 2004; Forster et al., 2011; Segawa et al., 2002). Da carga filtrada no glomérulo, em torno de 75% são reabsorvidos no túbulo proximal, 10% no túbulo distal e 10 a 30% excretado na urina (Uribarri, 2007; Wagner et al., 2014).

A isoforma NaP-IIa é o principal cotransportador envolvido na reabsorção tubular de P, sendo que estudos com animais *knockout* (Npt2a^{-/-}) demonstram uma redução de 70 a 80% na reabsorção quando comparados com animais normais (Murer et al., 2004; Forster et al., 2011). A isoforma NaP-IIc, tem seu nível de expressão nos túbulos renais influenciado pela idade do animal sugerindo envolvimento no crescimento e desenvolvimento, sendo que animais *knockout* possuem níveis normais de P sérico e urinário, nenhuma anormalidade óssea e a reabsorção renal semelhante à dos controles (Marks et al., 2007; Kiela & Ghishan, 2009; Segawa et al., 2009; Forster et al., 2011).

O NaP-IIb é o principal transportador de P no intestino, sendo também encontrado em outros tecidos como pulmão, fígado, testículos e glândulas mamárias, no tecido renal só foi identificado o RNA mensageiro (RNAm) (Kiela & Ghishan, 2009; Prié et al., 2011; Lederer & Miyamoto, 2012).

Hilfiker e cols. (1998) demonstraram que o NaP-IIb difere do NaP-IIa na porção C-terminal, que é rica em resíduos de cisteína e mais longa em aproximadamente 50 aminoácidos.

No intestino de humanos e ratos, a maior parte do P ingerido é absorvida no duodeno e jejuno, ao passo que em camundongos, ocorre predominantemente no íleo, sendo a contribuição do cólon ainda incerta com aparente capacidade absorptiva em

cólon distal, porém questionável devido à solidez do conteúdo colônico nesta região (Marks et al., 2015; Wagner et al., 2014).

Camundongos alimentados com dieta normal em P expressam cotransportadores NaP-IIb principalmente no íleo e com menor intensidade no duodeno e jejuno (Reining et al., 2010). Em ratos, foram descritos níveis mais elevados de RNAm e proteínas no jejuno (Marks et al., 2010).

A ausência de NaP-IIb resulta em letalidade embriogênica precoce por incapacidade de absorção de P da circulação materna e animais *knockout* (Npt2b^{-/-}) possuem aumento da excreção fecal de P, com absorção reduzida em 90% (Forster et al., 2011).

Estudos experimentais demonstram que camundongos NaP-IIb^{-/-} são normofosfatêmicos, em razão dos mecanismos compensatórios do cotransportadores renais que reduzem a excreção do P. Nos pacientes com mutações no cotransportador detecta-se microlitíase alveolar e testicular (Forster et al., 2011).

As três isoformas da proteína SLC34 transportam preferencialmente P bivalente (HPO₄²⁻) e são sódio dependentes, embora íons lítio possam parcialmente substituir o sódio. Além disso, são fortemente influenciadas pelo pH, que define a distribuição de P monovalente/bivalente no meio extracelular (Forster et al., 2013).

Nas proteínas SLC34, há uma larga região extracelular com dois sítios de glicosilação e pontes dissulfeto que ligam as duas metades da proteína (Figura 1A). O transporte de P pelo NaP-IIa e NaP-IIb, na forma HPO₄²⁻, é eletrogênico com três íons Na⁺. NaP-IIc é eletroneutro, transportando um cátion bivalente com dois íons Na⁺ (Murer et al., 2004; Forster et al., 2013).

Os cotransportadores tipo III, PiT-1 (SLC20a1) e PiT-2 (SLC20a2), foram descritos em 1994 por Kavanaugh e colaboradores, e participam da regulação e manutenção do P intracelular. Estes cotransportadores possuem alta afinidade pelo P e são encontrados na membrana basolateral das células de vários tecidos. No intestino, o PiT-1 foi descrito na membrana apical dos enterócitos (Giral et al., 2009).

O transporte de P por esses cotransportadores é eletrogênico, porém diferem das proteínas SLC34 por favorecerem o transporte de P monovalente (H₂PO₄⁻) com duas moléculas de Na⁺ e por ser pouco influenciado pelas mudanças o pH, o que confere a eles a capacidade de absorver P por exemplo, na acidose (Forster et al., 2013).

Os níveis de RNAm das proteínas SLC20 variam pouco entre os tecidos sugerindo que, nos mamíferos, assumam o papel de proteínas *housekeeping*, ou seja, constituintes do tecido. No entanto vale ressaltar que estudos recentes revelaram um papel importante do PiT-1 no metabolismo ósseo, na calcificação vascular e na função paratireoideana (Forster et al., 2013; Chavkin et al., 2015; Tatsumi et al., 1998).

Tanto nos rins como no intestino, são descritas as duas isoformas de SLC20, responsáveis por apenas 5% do transporte transepitelial de P (Forster et al., 2011).

A contribuição do PiT-1 na absorção intestinal de P é controversa, pois os estudos não são unânimes quanto a sua expressão proteica e distribuição nos segmentos do intestino delgado, e quanto a sua resposta a sobrecarga de P nesses segmentos (Marks et al., 2010; Forster et al., 2013; Giral et al., 2009)

O PiT-2, assim como NaP-IIa e NaP-IIc, contribuem para a reabsorção renal de P e foi primeiramente identificado como receptor retroviral com ampla distribuição no tecido. Estudos de Villa-Bellosta e cols. (2008) mostraram que PiT-2 se expressa na borda em escova das células do túbulo proximal e sua abundância é regulada pela carga de P da dieta.

Os cotransportadores, NaP-IIb e PiT-1, possuem 12 domínios transcelulares diferindo na região C- e N-terminal entre si, porém ambos são importantes alvos de hormônios e de interação com outras proteínas (Forster et al., 2011).

Nas proteínas SLC34, as regiões terminais –COOH e –NH₂ são intracelulares e, em contrapartida, nas proteínas SLC20 são extracelulares. Pouco se conhece da conformação tridimensional dessas proteínas. O esquema da topologia secundária dessas proteínas está demonstrado na figura 3.

Figura 3. Comparação da topologia secundária das proteínas SLC34 (A) e SLC20 (B). Adaptado de Forster et al., 2011.

A estabilização (inserção e posicionamento) dos cotransportadores na membrana celular parece estar associada à proteína NHERF-1, *Sodium/Hydrogen Exchanger Regulatory Factor 1*, e ao domínio PDZ, que se ligam à porção COOH-terminal das proteínas SLC34 (Weinman et al., 2005; Murer et al., 2004).

Em relação à translocação de P pela célula e do efluxo através da membrana basolateral, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos (Tenenhouse, 2007). Sabe-se, no entanto, que a absorção intestinal de P pode ser regulada e adaptada à oferta dietética, bem como ao equilíbrio ácido-básico e a variações hormonais tais como as promovidas pelo calcitriol ou pelos glicocorticóides (Wagner et al., 2014).

1.3. Regulação da absorção de fósforo

No balanço neutro, com uma ingestão de 20 mg de P por quilograma (kg) de peso por dia (d), a quantidade absorvida pelo intestino é de aproximadamente 16 mg/kg/d com perda pelos sucos digestivos de 3 mg/kg/d, no total de 7 mg/kg/d pelas fezes e 13 mg/kg/d pela urina. A remodelação óssea contribui para o balanço incorporando e liberando cerca de 3 mg/kg/d (Berndt & Kumar, 2008).

Em indivíduos saudáveis, os níveis séricos de P são influenciados por vários fatores como o hormônio da paratireóide (PTH), dopamina, glicocorticóides, o calcitriol, sFRP4 (*secreted frizzled-related protein-4*) e fosfatoninas, incluindo FGF-23 (*Fibroblast Growth Factor*), FGF-7 e MEPE (Wagner, 2007). Além de outros como, por exemplo, a dieta e acidose, que interferem na função e expressão das proteínas de transporte de P na membrana celular (Wagner et al., 2014).

O PTH é liberado no sangue em resposta a alterações na concentração de cálcio, porém o P também influencia indiretamente a sua liberação (Martin et al., 2005). Esse hormônio diminui a reabsorção renal de P promovendo a internalização dos cotransportadores NaP-IIa e IIc presentes nas células dos túbulos proximais e distais (Kiela & Gishan, 2009; Prié et al., 2005).

O PTH, ligando-se ao seu receptor PTHR1 pelo domínio N-terminal do complexo PDZ, promove hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, ativação da proteína kinase C e aumento dos níveis de AMP cíclico, o que leva a ativação das vias de sinalização dependentes da proteína kinase A (PKA) (Prié et al., 2005; Blaine et al., 2011). Assim ocorre modificação covalente dos resíduos da proteína NHERF-1 e interrupção da associação com o cotransportador inserido na membrana, o qual acaba por ser internalizado e degradado nos compartimentos lisossômicos das células tubulares (Prié et al., 2005). Foi relatado, ainda, que os passos iniciais da ação do PTH na internalização dos cotransportadores no rim podem estar associados à dinâmica do citoesqueleto de actina e miosina (Blaine et al., 2009).

Outra classe de reguladores chamados fosfatoninas estabelece uma ligação direta entre o metabolismo ósseo e a homeostase renal do P (Wagner, 2007). A fosfatonina mais estudada é o FGF-23, secretada por osteoblastos e osteócitos, e que atua primariamente nos túbulos proximais aumentando a excreção urinária de P por diminuição da expressão dos cotransportadores NaP tipo IIa e IIc.

O FGF-23 inibe a 1α -hidroxilase presente principalmente no túbulo proximal e aumenta a 24-hidroxilase, enzima que degrada o calcitriol ($1,25\text{OH}_2\text{D}_3$). A redução na concentração sérica de calcitriol diminui a absorção intestinal de cálcio e de fósforo através de mecanismo VDR-dependente (Uribarri, 2007; Prié et al., 2005; Marks et al., 2008; Kiela & Ghishan, 2009; Gutierrez, 2010). Além disso, outros mecanismos não genômicos podem estar envolvidos na ação do calcitriol no transporte de P, como alteração da fluidez de membrana e ativação de proteínas kinases (Suzuki et al., 1988; Hattenhauer et al., 1999).

O hormônio FGF-23, comparado a outras fosfatoninas, é o único que requer um cofator, a proteína Klotho, para ativação do seu receptor FGFR-1 (Blaine et al., 2011). Essa proteína existe em duas formas distintas: inserida na membrana e secretada na forma solúvel, e evidências apontam para sua ação na regulação de canais iônicos de cálcio, de enzimas, que modificam glicoproteínas na membrana celular, acelerando ou

retardando a degradação dessas proteínas, interferindo no transporte de substâncias, incluindo o fósforo via cotransportadores (Hu et al., 2010; Martin et al., 2012).

Nos últimos anos, estudos apontam para a existência de uma fosfatonina entérica liberada em resposta a carga de P no lúmen. Essa fosfatonina sinalizaria e modularia a excreção renal de fósforo, além de controlar sua absorção intestinal (Berndt & Kumar, 2008; Marks et al., 2010).

Segawa e cols (2004) demonstraram, em camundongos modificados sem receptor para vitamina D (VDR), que o intestino responde a alterações do P dietético independente do calcitriol. Isto abre a discussão para a existência de um eixo de sinalização pelo qual o P intestinal rapidamente modula a reabsorção renal.

Berndt e cols. (2007) estudaram animais paratiroidectomizados e controles nos quais infundiram homogenato de mucosa duodenal em animais controles e detectaram aumento na Fração de excreção de P (FeP), reforçando a discussão de uma substância liberada pelo próprio intestino e que inibe a reabsorção renal de P. Esses estudos sugerem outros mecanismos envolvidos, que independem do PTH e ocorrem rapidamente sem envolver outros peptídeos fosfatúricos.

Outros autores supõem a presença de um sistema de detecção de variações no P dietético e regulação da síntese de cotransportadores (Takeda et al., 2004). Aventando-se uma possível associação com ativação de neurônios mioentéricos ou fibras nervosas renais, estudos com denervação renal verificaram que a resposta fosfatúrica não se modifica (Berndt & Kumar, 2008).

1.4. Metabolismo mineral e perspectivas de pesquisa

Vinte anos após a identificação do primeiro membro da família de cotransportadores SLC34, um grande progresso foi obtido na compreensão da regulação hormonal da absorção e excreção do P. Um maior entendimento desses processos tem importância clínica no que diz respeito à hiperfosfatemia e suas consequências nos pacientes com DRC (Wagner et al., 2014).

Os níveis de P sérico permanecem normais até que a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) seja inferior a 30 ml/min/1,73m³, porém os níveis de PTH e de FGF-23 elevam-se precocemente contribuindo para o desenvolvimento do Hiperparatiroidismo Secundário (HPTS) (Uribarri, 2007). A perda de função renal é

ainda acompanhada da redução da síntese de calcitriol, o que contribui para diminuir a absorção intestinal de Ca e P (Loghman-Adham, 1993).

Em indivíduos saudáveis, os níveis séricos de FGF-23 aumentam em resposta ao maior conteúdo de P na dieta, independentemente dos níveis de PTH (Prié et al., 2005; Segawa et al., 2004). Segundo Takeda e colaboradores (2007), pacientes com HPTS apresentam níveis de FGF-23 extremamente elevados que podem chegar a até duzentas vezes o encontrado em indivíduos normais.

A partir da década de 70, estudos demonstraram que a hiperfosfatemia piorava o HPTS e modelos experimentais evidenciaram que a redução da ingestão de P representava um passo importante na prevenção dessa complicação (Goodman & Quarles, 2007; Santoro & Cianciaruso, 2008).

A exposição excessiva a fontes de P na dieta oriundas de alimentos processados que contenham conservantes à base de fosfato podem levar à dita "toxicidade fosfato" com maior risco de doenças cardiovasculares na população em geral e em pacientes com DRC (Marks et al., 2013). Portanto, estabelecer formas mais eficazes de limitar a absorção de P da dieta pode ser de grande benefício para esses pacientes.

Poucos estudos avaliaram o transporte intestinal de P na DRC. A modulação na expressão e atividade dos cotransportadores é provavelmente um ponto chave para a compreensão e consequentemente manipulação da absorção de P pelo intestino.

Giral e cols. (2009) encontraram mudanças significativas nos cotransportadores NaP-IIb quando animais saudáveis foram alimentados com dieta pobre em P. Em contrapartida, Marks e cols. (2007) estudando animais urêmicos alimentados com dieta normal e restrita em P não encontraram mudanças na absorção desse elemento seja no duodeno ou jejuno, assim como na expressão de RNA mensageiro (RNAm) destes cotransportadores. Contudo, uma revisão bibliográfica de 2010 do mesmo autor descreveu estudos nos quais animais submetidos agudamente e/ou cronicamente a uma dieta pobre em P modulam a expressão destas proteínas aumentando a absorção de P (Marks et al., 2010).

Alguns inibidores competitivos dos cotransportadores como o ácido fosfonofórmico (PFA - *phosphonoformic acid*) e o arsenato inorgânico são conhecidos, porém como são tóxicos não são usados na prática clínica (Murer & Biber, 1996; Forster et al., 2012).

Diante do exposto, estudos que avaliam a regulação dos cotransportadores intestinais de P, tanto nas situações de normalidade como na uremia, são bem vindos, pois contribuiriam para novas estratégias terapêuticas.

OBJETIVOS

2. Objetivo

Investigar os efeitos da administração de dietas com distintas concentrações de fósforo na regulação dos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de ratos controles e urêmicos.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar parâmetros bioquímicos, séricos e urinários ligados ao metabolismo do fósforo, nesses animais.

Avaliar a expressão proteica e gênica dos cotransportadores nos três segmentos de intestino delgado.

Averiguar a porcentagem de células apoptóticas nos enterócitos do duodeno, jejuno e íleo.

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1. Modelo experimental

Este projeto foi registrado no Comitê de Pesquisa em Animais da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº 023/11), analisado e aprovado em 09 de fevereiro de 2011.

Utilizaram-se ratos *Wistar*, machos, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso inicial entre 100 a 150g. Todos os animais passaram por tratamento contra parasitoses gastrointestinais de cestódeos e nematódeos, com praziquantel e mebendazol antes do início dos experimentos.

Os animais foram mantidos em gaiolas, com controle de luminosidade (12h/12h), temperatura e umidade, com livre acesso à água e dieta padrão comercial Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrientes Produtos Veterinários Ltda – Curitiba/PR).

Quando os animais atingiram o peso de 250 a 300g foram separados em grupos: controle (C) e nefrectomizados (Nx), sendo este último grupo submetido à ablação renal.

A nefrectomia 5/6 foi realizada nos animais do grupo Nx sob anestesia com ketamina e xilazina (solução 2:1), na dose de 1 mL/kg por via intramuscular.

A nefrectomia consistiu na ligadura de dois a três ramos da artéria renal esquerda e retirada do rim direito. O resultado final da ablação de cada animal foi registrado de modo a permitir correta separação dos mesmos entre os grupos de acordo com a massa renal restante.

Durante a indução anestésica, administramos antibiótico profilático Benzetacil 0,1 mL por animal (equivalente a 30.000 UI) para prevenção de infecção pós-operatória. Animais com sangramento maior que 2 mL foram excluídos do estudo.

Após estes procedimentos, os animais receberam 0,05 mL de Tramadol intramuscular com repetição da analgesia após 24 horas (Zegre et al., 2011). A analgesia visou à redução da dor pós-cirúrgica, melhora na ingestão de alimentos e recuperação da curva de crescimento.

A figura 4 descreve o protocolo realizado.

Figura 4. Desenho do protocolo experimental realizado, com especificações do tempo e concentrações de fósforo (P) da dieta administrada aos animais do estudo, separados em grupo controle (C) ou nefrectomizado (Nx). GM: gaiola metabólica

Após ablação, os animais Nx e controles receberam dieta padrão Harlan-Teklad (TD-91352, Indianápolis, EUA), contendo 0,54% de fósforo; 0,7% de cálcio e 20% de proteína e água em livre demanda, por 30 dias.

No 28º dia, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para um primeiro dia de adaptação ao novo ambiente, e no dia seguinte medimos o volume de urina e consumo de ração, no segundo dia a urina de 24 horas foi coletada e nela analisamos a concentração de proteína, creatinina e P (tempo basal).

Após 30 dias de dieta padrão os animais C e Nx receberam, durante 48 horas, dietas com diferentes concentrações de P. Os grupos foram renomeados conforme o tipo de dieta ofertada e passaram a ser designados como:

- C Baixo:** Controle - Dieta baixa em P (0,2%)
C Padrão: Controle - Dieta padrão em P (0,54%)
C Alto: Controle - Dieta alta em P (0,9%)
Nx Baixo: Nefrectomizados - Dieta baixa em P (0,2%)
Nx Padrão: Nefrectomizados - Dieta padrão em P (0,54%)
Nx Alto: Nefrectomizados - Dieta alta em P (0,9%)

Todas as dietas continham as mesmas quantidades de calorias, cálcio, proteína e vitamina D, variando apenas no seu conteúdo de fósforo (anexos I, II e III).

Ao término das 48 horas foi coletada novamente a urina de 24 horas, na qual se analisou concentração de albumina pela técnica de imunodifusão radial, empregando anticorpo específico (anti-albumina de rato, MPBiomedicals LLC, EUA) (Mancini et al., 1965).

Foram excluídos do estudo animais que durante o experimento apresentaram piora do quadro geral com emagrecimento, inapetência, anúria, sangramentos ou anormalidade nas fezes.

Ao final do experimento e no momento do sacrifício os animais receberam anestesia intramuscular de ketamina e xilazina (diluição 2:1, 1mL/100g de peso corpóreo) seguida de punção da aorta para obtenção de sangue no qual analisamos: microhematócrito (Ht) coletado em tubos capilares heparinizados e centrifugados em centrífuga específica. O restante da amostra foi centrifugado, o soro separado e nele analisamos potássio (mmol/L), sódio (mmol/L) e cálcio iônico - Cai (mmol/L) em analisador de eletrólitos AVL 3140 (AVL Medical Instruments, Schaffhausen, Suíça), por método eletrodo seletivo, P (mg/dL) e creatinina (mg/dL) por método colorimétrico empregando um *kit* de análise comercializado pela Labtest Diagnóstica S.A (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), PTH intacto (pg/mL) por ELISA (Rat BioActive Intact PTH ELISA Kit, Immutopics, San Clement, CA, USA) e FGF-23 (pg/mL) por kit de ELISA (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan). A obtenção do sangue foi a mais rápida possível e em quantidade moderada para se evitar hipóxia do tecido intestinal.

O rim esquerdo de cada animal foi extraído e pesado para comparação entre os grupos. As concentrações urinárias de creatinina e P foram analisadas por método colorimétrico utilizando um *kit* de análise comercializado pela Labtest Diagnóstica S.A

(Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). O *clearance* de creatinina foi calculado a partir do produto do volume de urina de 24 horas pela concentração de creatinina urinária dividido pela concentração de creatinina no soro, sendo expresso em mL/min/kg.

A FeP foi calculada através da divisão da concentração do P urinário pela Cr do soro e do P do soro pela Cr urinária, multiplicado o valor final por 100, sendo expressa em porcentagem.

O intestino delgado dos animais foi seccionado desde sua inserção no estômago até o ceco. O intestino foi lavado *in situ* com solução fisiológica 0,9% resfriada acrescida de Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF - *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 mM como inibidor de proteases.

O duodeno foi definido como o segmento entre o final do estômago e o ângulo de *Treitz*. Desse ângulo até o ceco dividimos o segmento em duas metades o primeiro foi considerado o jejuno e o segundo o íleo. Os segmentos uma vez identificados foram colocados em tampão resfriado. Cerca de 0,5 a 1 cm de cada segmento foi aberto ao longo da borda mesentérica para exposição das vilosidades e foi congelado sobre vapor de nitrogênio líquido envoltos em meio de inclusão, composto de resinas e glicóis solúveis em água (*Tissue Tek*[®], Leica, Alemanha). Os cortes histológicos obtidos dessas amostras congelados foram usados para análise por imunofluorescência e também foram incluídas amostras de tecido em parafina para análise por imunohistoquímica

Do restante retiramos a mucosa (raspada com uma lâmina de vidro), que foi transferida para microtubos para posterior extração de RNA. Tanto os segmentos para imunohistoquímica como as amostras de mucosa foram colocadas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* a -80°C até a realização das diferentes análises prevista no estudo.

3.2 Imunofluorescência

Dos fragmentos de intestino armazenados a -80°C obtivemos cortes de 6 µm usando criostato Leica CM1850 (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Alemanha) a -20°C. Os cortes foram seriados visando uma análise ampla do segmento estudado. Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas fixados com acetona (Synth[®], Diadema, São Paulo) por 10 minutos, a -20°C, e secagem em temperatura ambiente (TA) por 1 hora.

Para a reação imunológica, realizou-se três lavagens de 10 minutos em PBS, seguida de bloqueio de epítomos não específicos com 10% soro normal de cavalo diluído em PBS acrescido de 1,5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich[®]), por 45 minutos à temperatura ambiente.

Os anticorpos primários policlonais produzido em coelho anti-NaP-IIb (Davids Biotechnologie, Regensburg, Alemanha) e produzido em cabra anti-PiT-1 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) foram diluídos em solução de 10% soro normal de cavalo em PBS acrescido de 1,5% de Triton X-100 nas diluições de 1:50 para e 1:20, respectivamente. Seguiu-se uma incubação de 48 horas, em câmara úmida, a 4°C.

Após três lavagens em PBS, os tecidos foram incubados por 1h à temperatura ambiente com seus respectivos anticorpos secundários: produzido em burro anti-coelho, na diluição 1:500, conjugado ao corante fluorescente *Alexa Fluor* 488 (verde) e produzido em burro anti-cabra, na diluição 1:200, conjugado com *Alexa Fluor* 594 (vermelho).

Após lavagens em tampão PBS, as lâminas foram finalizadas com lamínulas e glicerol tamponado (Tampão carbonato de sódio 0,5 M com glicerol 1:1, pH 8,6).

As imagens foram obtidas no núcleo de microscopia confocal. Cada fluoróforo é processado separadamente utilizando uma combinação diferente de filtros de excitação e emissão, e as imagens são capturadas em sequência usando uma câmera CCD digital, em seguida, sobrepostas para dar uma imagem completa.

As imagens de fluorescência de marcação isolada de cotransportadores foram obtidas no microscópio de fluorescência Olympus (DX-15020).

3.3. Expressão proteica

A análise da expressão proteica foi obtida pelas técnicas de *Western Blotting* (WB) para NaP-IIb e ELISA indireto para PiT-1. A escolha da técnica baseou-se no padrão de reatividade dos anticorpos.

3.3.1. Extração de proteínas

Para a extração das proteínas totais, amostras de mucosa de duodeno, jejuno e íleo de cada animal foram pesadas e homogeneizadas em solução tampão de lise preparada com tampão RIPA – *Radio ImmunoPrecipitation Assay* (Millipore, Massachussets, EUA), adicionada de ortovanadato a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e coquetel inibidor de proteases Sigma (P8340-Aldrich, Missouri, EUA).

A solução de lise com os inibidores de proteases e de fosfatases foi usada na proporção de 500 µL para cada 80 a 100 mg de mucosa.

A mucosa foi homogeneizada em tubos com *beads* de metal 2,8 mm (OMNI, Geórgia, EUA), sob agitação durante 1 ciclo de 60 segundos no *Bead Ruptor* (OMNI, Geórgia, EUA). Após essa etapa, o material foi centrifugado a 5000 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi fracionado em microtubos e congelado à -80°C até a análise. As proteínas totais dos lisatos foram quantificadas utilizando o kit comercial *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Illinois, EUA), segundo determinações do fabricante.

3.3.2. Western Blotting (WB)

Após a extração, 100 µg de proteínas foram misturadas ao tampão de amostra *Laemmli* na proporção 1:1, separadas, segundo seu peso molecular, em gel de SDS a 10% (Criterion, Bio-Rad, Califórnia, EUA) usando equipamento de corrida eletroforética vertical (Bio-Rad, Califórnia, EUA), sob voltagem de 120 V, durante 90 minutos em tampão de corrida contendo Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM e 10% de dodecilsulfato de sódio (SDS).

Antes da aplicação no gel para separação, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos para denaturação da estrutura proteica. O marcador de peso molecular utilizado foi *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope®* e/ou *Precision Plus Protein™ WesternC™* (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Após essa etapa as proteínas em gel de SDS, foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Berkeley, Califórnia) a 37 volts, *overnight*, a 4°C.

As membranas foram bloqueadas com 4% albumina de soro bovino (BSA) em solução de TBS (10 mM Tris Cl, 150 mM de NaCl, pH 7.5) por 90 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram diluídos em TBS com 1% de BSA incubados *overnight* a 4°C sob agitação.

Todos os experimentos foram pareados com um respectivo controle negativo (CN), no qual o anticorpo primário foi omitido. A β -actina foi utilizada como controle endógeno e normalizador do experimento.

Os anticorpos primários empregados foram: monoclonal produzido em camundongo anti- β -actina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na diluição 1:5000 e policlonal produzido em coelho anti-NaP-IIb (Biorbyt Ltd., Cambridge, Reino Unido) na diluição 1:500.

Após três lavagens com solução/tampão TBS-Tween 20 (Tampão Tris Salina e Tween 20 - 20mM de Tris HCl pH 7,5, 150mM de NaCl, 0,05% de Tween 20), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase nas diluições 1:80.000 para o anticorpo coelho anti-camundongo/HRP (Dako, Carpinteria, EUA) e 1:6000 para o anticorpo produzido em cabra anti-coelho/HRP (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em cada teste empregamos o marcador de peso molecular *Precision Plus Protein WesternC Standards* (BIO-RAD – Hercules, EUA). Esses padrões foram incubados com *Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate* (Bio-Rad) na proporção de 1:80.000, sempre em TBS com 1% de BSA.

Para a revelação, utilizou-se *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) e a imagem foi obtida com o fotodocumentador Aliance 4.7 (UVITEC, Cambridge, Reino Unido) e o *software* Uvitec Capture (UVITEC, Cambridge, Reino Unido).

3.3.3 ELISA indireto

Após a extração e determinação da concentração da proteína de cada amostra, 10 µg foram misturadas ao tampão RIPA, com pH ajustado para 7,4 e com volume completado para 100 µL que foi distribuído em placas de poliestireno para ELISA (*Corning 96-well Microplates high binding, without lids* - CLS3590 – Sigma). As placas foram deixadas por 24 horas em ambiente limpo e com temperatura adequada para secagem por evaporação.

Após esta etapa, as placas foram hidratadas com PBS (fosfato de sódio dibásico 100 mM, cloreto de sódio 1370 mM, cloreto de potássio 27 mM, fosfato de potássio monobásico 20 mM) pH 7,4, tratadas com tampão Tris-base (50 mM) pH 7,4, fixadas em formaldeído 3,7% por 20 minutos, bloqueadas em tampão com albumina bovina sérica (BSA) 1%, sacarose 5%, azida sódica 0,05% em PBS e incubadas com anticorpo primário, anti-PiT-1, *overnight*, a 4°C, sob agitação.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas com PBS sob agitação e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à fosfatase alcalina, na concentração 1:60.000, por 2 horas à temperatura ambiente. Seguiram-se novas lavagens com PBS, além da adição de tampão de revelação (Tris-base 100 mM, 20 mg de p-Nitrofenil Fostato - Sigma P4744) e a leitura da densidade ótica (DO) das placas foram efetuadas em espectômetro a um comprimento de onda de 420 nm a 37°C.

Os resultados foram expressos em percentual de positividade, pela razão entre a DO da amostra e a DO controle positivo.

3.4. Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real

A técnica de Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real método quantitativo (qRT-PCR) foi realizada para averiguar a expressão gênica dos cotransportadores na mucosa obtida dos diferentes segmentos intestinais.

3.4.1. Extração, purificação e integridade do RNA total

O RNA total dos três segmentos de intestino delgado foi isolado utilizando-se Trizol[®] (Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). A extração foi feita com tiocianato

de guanidina/ fenol/ clorofórmio na relação de 1 mL de Trizol[®] para cada 50 mg de tecido homogeneizado segundo técnica previamente descrita (Chomczynski et al, 1987).

O homogenato foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos proteicos. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados, seguida de centrifugação a 12.000 G por 15 minutos à 2°C para separação da fase aquosa. Após esta etapa, adicionamos 500 µL de álcool isopropílico com incubação de 15 minutos à temperatura ambiente seguida de nova centrifugação, após o que, o sobrenadante foi eliminado, o *pellet* lavado com etanol 75% gelado e o precipitado resultante suspenso em 50 µL de água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC).

A concentração do RNA foi determinada pelo espectrofotômetro *Nano Drop 1000* (Thermo Scientific, Illinois, EUA) em absorbância a 260 nm. Após mensuração da densidade óptica (DO) [RNA = (DO x 40 x diluição) µg/mL] o grau de pureza do RNA foi estimado pela relação absorbância 260 nm/absorbância 280 nm (contaminação com proteína) e absorbância 260 nm/absorbância 230 nm (contaminação com compostos fenólicos). Consideramos amostras com pureza satisfatórias as que obtiveram razões 260/280 próximas de 2,0 e 260/230 entre 1,8 e 2,2.

A integridade do material genético extraído foi averiguada por meio da identificação das bandas 18S e 28S por meio do *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Inc., Califórnia, EUA) com cálculo do RIN (*RNA Integrity Number*), utilizando-se para o qPCR-RT somente amostras com valor de RIN acima de 7.0.

3.4.2. Síntese do DNA complementar

Após isolamento do RNA total, realizamos transcrições reversas (RT) para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se *Improm II Reverse Transcription System Kit* (Promega, Wisconsin, EUA).

Para cada amostra usamos 1 µg de RNA total, 1 µL de Oligo dT (150 ng/µL, Promega Corporation, Madison, EUA) e 3,0 µL de água MilliQ (sistema Milli-Q, Millipore Corporation). Os tubos foram incubados por 5 minutos a 70°C para desnaturação das cadeias e resfriamento imediato a 4°C por mais 5 minutos, em seguida foram mantidos em gelo.

Em seguida, foram adicionados 15 μL de uma solução contendo: 4 μL de tampão 5x concentrado, 2,4 μL de MgCl_2 (25mM), 1 μL de dNTP mix (10mM), 1 μL da enzima *Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega Corporation, Wisconsin, EUA) e 6,6 μL de água Milli-Q (sistema Milli-Q, Millipore Corporation), para um volume final de 20 μL .

As amostras foram incubadas à 25°C por 5 minutos e posteriormente, à 42°C por 1 hora, para a síntese de cDNA. Em seguida, a enzima transcriptase reversa foi inativada por meio da incubação das amostras à 70°C por 15 minutos. Nas duas etapas usamos o termociclador (DNA Engine, Massachusetts, EUA). As amostras foram armazenadas em freezer -20°C, e posteriormente quantificadas para avaliar a expressão gênica por meio do PCR quantitativo.

3.4.3. Desenho e concentração dos oligos (*primers*)

Os *primers* usados para identificação dos cotransportadores NaP-IIb, PiT-1, β -actina e 18S foram sintetizados pela empresa IDT® *Integrated DNA Technologies* (Coralville, EUA).

Com o auxílio do programa Oligo Analyzer versão 3.1 (<http://www.idtdna.com>), os oligos iniciadores (*primers*) sense (*forward*) e anti-sense (*reverse*) foram desenhados e utilizados na amplificação dos genes expressos nos experimentos de qRT-PCR. Todos os *primers* foram analisados no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para certificar que não amplificavam produtos inespecíficos. As sequências dos *primers* estão listadas na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica usando qRT-PCR

Nome do gene	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	T _m (°C)	Produto	Gene ID
NaP-IIb			139	
<i>Foward</i>	ATGAAGGCCCTGTCCAACACTACA	60,2		NM_053380.2
<i>Reverse</i>	AGGCATTATAGGCCATGGGTGGAT	60,3		
PiT-1			108	
<i>Foward</i>	CAATGGTGCAGTGCAGTTGCCTAA	60,3		NM_031148.1
<i>Reverse</i>	TCCTTGTGCACGGTGTGATACTGA	60,2		
B-actina			125	
<i>Foward</i>	AGAGAAGCTGTGCTATGTTGCCCT	60,4		NM_031144
<i>Reverse</i>	ACCGCTCATTGCCGATAGTGATGA	60,3		
18S			129	
<i>Foward</i>	GCCGCTAGAGGTGAAATTCT	60,0		NC_000072.6
<i>Reverse</i>	TCGGAACACTACGACGGTATCT	60,0		

T_m: Temperatura de *melting*.

Para todos os *primers*, realizamos teste de gradiente de temperatura a partir das temperaturas de *melting* (T_m) dos *primers* informadas pelo fabricante, definindo uma faixa que pressupõe 10% a mais ou a menos. Para os *primers* citados na tabela 2, a faixa de 50,4 a 61,6°C foi determinada de acordo com o T_m e 12 temperaturas testadas, além do teste de ciclagem e padronização do número de ciclos.

3.4.4. Reação de qRT-PCR

As reações qRT-PCR foram realizadas usando o kit SYBR[®] *GreenERTM qPCR SuperMix Universal* (Life Technologies, Califórnia, USA) segundo as instruções do fabricante.

O corante SYBR[®] *GreenERTM* devido a sua afinidade ao se intercalar na dupla fita do DNA apresenta intensidade de emissão de fluorescência significativamente aumentada na ordem de mil vezes, permitindo assim a detecção do produto da PCR em tempo real.

Todas as reações foram realizadas em triplicata, no termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha) e para a análise inicial dos dados gerados durante a amplificação usamos o programa *Rotor-Gene Q Series Software* versão 2.1.0.

Esse programa analisa e associa a intensidade de fluorescência e o número de ciclos da reação e caracteriza, sob a forma de gráfico, quando a reação se torna linear. O número do ciclo em que a intensidade de fluorescência é superior ao sinal de ruído (*background*), corresponde ao Ct (*cycle threshold*). Desta forma, o ponto de corte (*threshold*) é definido manualmente e o Ct de cada reação determinado. Para tanto, o valor de Ct de cada gene de interesse foi comparado com o Ct do gene referência (ou endógeno), possibilitando a normalização do resultado e minimização da variabilidade que podem ocorrer na quantidade de mRNA ou nas condições do experimento.

O modelo matemático usado para a determinação relativa da expressão gênica empregou a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001). Como calibrador utilizou-se o *pool* de cada segmento intestinal do grupo controle dieta padrão e os dados apresentados com a variação na expressão dos genes normalizados a um gene endógeno de referência e em relação ao calibrador não tratado. O cálculo foi realizado a partir dos valores de Ct, empregando-se a fórmula:

$$\Delta Ct = \text{Média do gene alvo (das duplicatas)} - \text{Média do gene endógeno (das duplicatas)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra de interesse}) - \Delta Ct (\text{amostra de referência})$$

Calculou-se a diferença entre os valores de Ct do gene em estudo e do controle endógeno para cada amostra (ΔCt). Em seguida, calculou-se a média de ΔCt entre as amostras controle do experimento (calibrador) e a diferença entre os valores de ΔCt de cada amostra e o valor médio de ΔCt das amostras controle ($\Delta\Delta Ct$). O valor relativo de cada amostra foi obtido pela expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5. Apoptose dos enterócitos nos diferentes segmentos do intestino delgado

Foi realizada a técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidil transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling*) para a detecção de células apoptóticas nos enterócitos das vilosidades intestinais. Para tal procedimento, foi utilizado o ApopTag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Kit (Millipore, Massachussets, EUA).

Essa técnica consiste na marcação da extremidade 3'-OH de oligonucleotídeos originados da fragmentação do DNA durante o processo de apoptose celular. Os fragmentos de DNA são submetidos à polimerização pela enzima terminal transferase, que acrescenta nucleotídeos marcados com uma molécula de digoxigenina, reconhecida por um anticorpo conjugado com a enzima peroxidase. A revelação com o substrato diaminobenzidina (DAB) gera uma coloração marrom.

Lâminas com cortes obtidos de segmentos intestinais incluídos em parafina foram desparafinizados, conforme orientação do kit, seguido da incubação com proteinase K (20 µg/ml) durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em PBS, durante 20 minutos. Posteriormente, o excesso do bloqueio foi retirado e acrescentado à solução de equilíbrio por aproximadamente um minuto. As lâminas foram incubadas com a enzima terminal desoxinucleotídeo transferase (TdT) na diluição de 1:7 em tampão do kit. A incubação foi realizada em câmara úmida por 60 minutos a 37°C, ao final dos quais as lâminas foram imersas em solução de parada por 10 minutos.

Na etapa seguinte, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado com a enzima peroxidase, durante 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram submetidas a quatro lavagens com PBS e, em seguida, realizada a revelação da enzima com DAB, acompanhada ao microscópio e interrompida por volta de 10 minutos em tampão. Por fim, as lâminas foram contra coradas com verde de metila a 0,5%, montadas com gelatina glicerina. As células positivas neste tipo de reação apresentam cor marrom/acastanhado e correspondem às células apoptóticas.

Para avaliar o percentual de células apoptóticas presentes nos enterócitos das vilosidades intestinais foram analisados 20 campos consecutivos sob aumento de 1.000x em microscópio ótico Nikon Eclipse 50i (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, USA).

3.6. Análises estatísticas

Primeiramente, analisamos o tipo de distribuição dos resultados usando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Nas variáveis com distribuição normal, usamos a análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) com a finalidade de comparar as diferenças das médias dos resultados dos grupos de animais Nx em relação ao grupo controle dieta padrão, seguido do pós-teste de *Tukey ou Bonferroni*. Para testar as diferenças entre o grupo Nx em relação ao seu respectivo controle empregamos o teste t de *Student*. A análise de variância de dois fatores *two-way* (ANOVA) seguida do pós-teste de *Bonferroni* foi utilizada para avaliar o peso ao longo do tempo e para verificar a interação entre dieta e uremia na expressão dos cotransportadores. Os resultados de variáveis com distribuição normal foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Nas variáveis que não apresentaram distribuição normal utilizou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunns* para comparação de três ou mais grupos; e o teste de *Mann-Whitney* para testar diferença entre o grupo Nx em relação ao seu respectivo controle. Os resultados não paramétricos foram apresentados em mediana, mínimo e máximo.

Para as análises de correlação entre duas variáveis empregou-se o teste de *Pearson* (variáveis paramétricas) ou *Spearman* (variáveis não paramétricas). A análise de regressão linear foi aplicada para se obter a equação da reta nos casos onde a correlação estivesse presente.

A análise estatística foi realizada no *software GraphPad Prism* versão 5.01 (GraphPad Software, Inc, Califórnia, EUA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Dados gerais dos animais

Foram estudados 76 animais que ao final do experimento constituíram os seguintes grupos: C Baixo n=12, C Padrão n =12, C Alto n =13, Nx Baixo n=13, Nx Padrão n=13 e Nx Alto n=13.

O peso inicial dos animais foi semelhante entre os grupos. Porém, no final do experimento, os animais Nx perderam significativamente peso em relação aos controles. Os diferentes aportes de P não influenciaram a evolução ponderal dos animais (Figura 5). Não houve diferença na média do consumo da dieta entre os grupos, que ficou ao redor de 20g/dia por animal (C Baixo $20,2 \pm 4,8$; C Padrão $18,9 \pm 3,2$; C Alto $21,7 \pm 4,4$; Nx Baixo $20,0 \pm 5,0$; Nx Padrão $18,5 \pm 5,3$; Nx Alto $16,7 \pm 5,5$).

Figura 5. Evolução do peso corpóreo dos animais controles (C) e urêmicos (Nx) distribuídos conforme a concentração de fósforo na dieta em diferentes períodos do experimento: no dia da cirurgia da nefrectomia (Início), três e dez dias após a cirurgia, no momento em que os animais foram colocados na gaiola metabólica (GM) e no dia do sacrifício. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Bonferroni*. (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

O volume urinário nos animais Nx foi maior comparado aos respectivos controles. A média do *clearance* de creatinina foi menor nos grupos Nx comparado aos seus controles. O hematócrito no grupo Nx Padrão foi menor comparado ao grupo C Padrão, assim como o grupo Nx Alto em relação ao grupo C alto. A albuminúria,

considerada um marcador precoce de comprometimento renal, foi maior nos animais Nx comparado aos seus controles. Esses resultados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Concentrações séricas e urinárias de parâmetros bioquímicos dos grupos controles (C) e urêmicos (Nx), de acordo com a concentração de fósforo (P) na dieta

	C Baixo	C Padrão	C Alto	Nx Baixo	Nx Padrão	Nx Alto
Volume urinário (mL)	10,13 (5,8 – 14,0)	8,80 (6,3 – 14,0)	11,5 (8,8 – 15,0)*	26,0 (6,5 – 41,0) [#]	25,0 (13,4 – 35,0)* [#]	27,6 (17,8 – 35) [#]
Hematócrito (%)	44,6 (42,0 – 49,4)	44,0 (41,0 – 52,9)	45,0 (40,0 – 48,0)	42,0 (38,4 – 49,0)	44,0 (29,0 – 46,5)*	42,0 (39,5 – 45,5) [#]
ClCr corrigido (mL/min/kg)	0,38 (0,17 – 1,1)	0,48 (0,26 – 0,77)	0,43 (0,21 – 0,60)	0,17 (0,07 – 0,54)* [#]	0,13 (0,07 – 0,32)* [#]	0,01 (0,003 – 0,25)* [#]
Albuminúria (mg/24h)	1,80 (0,16 – 17,6)	1,25 (0,26 – 14,5)	1,45 (0,62 – 16,0)	33,0 (13,1 – 120,0) [#]	39,0 (3,3 – 110)* [#]	22,3 (2,2 – 67,0)* [#]

ClCr corrigido: *clearance* de creatinina corrigido pelo peso do animal. Os valores são expressos em mediana (mínimo – máximo) e número de animais analisados por grupo foi de: Volume urinário 12 a 13; Peso do rim 12 a 13; Hematócrito 10 a 13; ClCr corrigido 10 a 13 e Albuminúria 10 a 13. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunns* e o teste de *Mann-Whitney*. (*) $p < 0,05$ versus grupo C Padrão; (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Os animais do grupo Nx alimentados com dieta alta em P apresentaram níveis maiores de P sérico comparado ao grupo C padrão e ao respectivo controle (C Alto). O grupo Nx Padrão também apresentou nível sérico de P maior que o grupo C Padrão (Figura 6).

Figura 6. Níveis séricos de fósforo (P) (mg/dL) nos animais dos grupos controles (C) e urêmicos (Nx) que receberam dietas com diferentes concentrações de P. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey* e o teste t de *Student*. (*) $p < 0,05$ versus C Padrão; (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

A fração de excreção de fósforo não foi diferente nos grupos que receberam dietas baixa e padrão em fósforo. Já nos animais que receberam dieta alta em P, a FeP foi maior quando comparada ao grupo C Padrão (Figura 7).

Figura 7. Fração de Excreção de fósforo (FeP) (mg/dL) nos animais controles (C) e urêmicos (Nx) que receberam diferentes concentrações de fósforo (P) na dieta. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey* e o teste t de *Student*. (*) $p < 0,05$ versus grupo C padrão.

Na tabela 4, estão descritos os resultados das análises bioquímicas.

Como esperado a creatinina sérica foi maior nos animais dos grupos Nx comparadas aos seus respectivos controles.

Os níveis de PTH foram maiores nos grupos Nx Padrão e Nx Alto em relação ao C Padrão e C Alto

Os níveis de FGF-23 foram maiores no grupo Nx Alto em relação ao C padrão e os grupos Nx em relação aos seus controles.

Cálcio iônico foi maior no grupo C Baixo em relação ao C Padrão. Houve redução significativa dos níveis séricos de Ca iônico no grupo Nx Alto em P, comparado ao grupo C Padrão e entre o grupo Nx Padrão e Nx Alto com seus respectivos controles.

Tabela 4. Concentrações séricas e urinárias de parâmetros bioquímicos dos grupos controles (C) e urêmicos (Nx), de acordo com a concentração de fósforo (P) na dieta

	C Baixo	C Padrão	C Alto	Nx Baixo	Nx Padrão	Nx Alto
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,12	0,44 ± 0,15	0,48 ± 0,10	1,04 ± 0,38 [#]	1,28 ± 0,42 [#]	0,96 ± 0,51 [#]
PTH (pg/mL)	176 (3,9-275)	256 (49-787)	330 (253-663)	543 (9,4-2457)	837 (454-3065)* [#]	1735 (364-3109) * [#]
FGF-23 (pg/mL)	123 (55-310)	293 (197-515)	318 (179-387)	877 (78-6765) [#]	969 (278-6661) [#]	2799 (502-6765)*, [#]
Cálcio iônico (mmol/L)	1,49 ± 0,06*	1,46 ± 0,03	1,45 ± 0,04	1,49 ± 0,09	1,41 ± 0,06	1,35 ± 0,15*, [#]
CaU24h (mmol/L)	1,89 (0,70–6,39)*	0,45 (0,11-2,41)	0,45 (0,23–1,29)	1,11 (0,12–7,02)	0,58 (0,14-2,26)	0,3 (0,1-1,64)

PTH – Paratormônio; FGF-23 – *Fibroblast growth factor 23*; CaU24h - Cálcio urinário de 24 horas. Os valores são expressos em média ± desvio padrão ou mediana (mínimo – máximo). E número de animais analisados por grupo foi de: creatinina 11 a 13; PTH 10 a 12; FGF-23 7 a 12; Cálcio iônico 9 a 12 e CaU24h 12 a 13. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey* ou *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunns* e o teste t de *Student* ou *Mann-Whitney*. (*) p< 0,05 versus grupo C Padrão; (#) p<0,05 versus respectivo controle.

4.2. Análise qualitativa da expressão dos cotransportadores

As imagens de imunomarcações capturadas em microscópio confocal estão apresentadas nas figuras 8 a 10.

O cotransportador NaP-IIb apresentou uma expressão mais intensa nos segmentos de intestino delgado em relação ao cotransportador PiT-1. A localização do NaP-II foi evidente na região apical dos enterócitos de todos os segmentos e grupos analisados. Apesar de menos expresso, o cotransportador PiT-1 também esteve presente na região apical dos enterócitos.

Figura 8. Dupla marcação dos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 no duodeno, jejuno e íleo de animais controle (C) e urêmicos (Nx) submetidos à dieta baixa em fósforo (P). Os núcleos estão marcados em azul com DAPI, cotransportador NaP-IIb marcado de verde (w= 488) e PiT-1 marcado de vermelho (w= 594). A última imagem de cada bloco refere-se à marcação combinada (merge). (CN) Controle negativo. (A) Duodeno, (B) Jejuno, (C) Íleo, grupo C; (D) Duodeno, (E) Jejuno, (F) Íleo, grupo Nx. Aumento 200x.

Figura 9. Dupla marcação de cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 no duodeno, jejuno e íleo de animais controle (C) e urêmicos (Nx) submetidos à dieta padrão em fósforo (P). Os núcleos estão marcados em azul com DAPI, cotransportador NaP-IIb marcado de verde (w= 488) e PiT-1 marcado de vermelho (w= 594). A última imagem de cada bloco refere-se à marcação combinada (merge). (CN) Controle negativo. (A) Duodeno, (B) Jejuno, (C) Íleo, grupo C; (D) Duodeno, (E) Jejuno, (F) Íleo, grupo Nx. Aumento 200x.

Figura 10. Dupla marcação de cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 no duodeno, jejuno e íleo de animais controle (C) e urêmicos (Nx) submetidos à dieta alta em fósforo (P). Os núcleos estão marcados de azul com DAPI, cotransportador NaP-IIb marcado de verde (w= 488) e PiT-1 marcado de vermelho (w= 594). A última imagem de cada bloco refere-se à marcação combinada (merge). (CN) Controle negativo. (A) Duodeno, (B) Jejunum, (C) Íleo, grupo C; (D) Duodeno, (E) Jejunum, (F) Íleo, grupo Nx. Aumento 200x.

4.3. Análise quantitativa da expressão proteica dos cotransportadores

A quantificação da expressão proteica do cotransportador NaP-IIb foi obtida pela técnica de WB e do PiT-1 por ELISA indireto. A expressão do PiT-1 por WB foi fraca, mesmo após ajustes na concentração de proteína e na diluição do anticorpo, impossibilitando a análise pelo normalizador β -actina.

Os animais do grupo Nx Baixo apresentaram menor expressão de NaP-IIb no jejuno em relação ao C Baixo. Não houve diferença nos segmentos duodeno e íleo nos grupos analisados (Figura 11).

Nos animais do grupo C baixo, observamos aumento da expressão de NaP-IIb em todos os segmentos estudados (Figura 11).

A expressão proteica do PiT-1 foi menor apenas no grupo Nx Alto em relação ao seu respectivo controle (Figura 12).

Figura 11. Análise da expressão proteica do cotransportador NaP-IIb na mucosa do intestino delgado de animais controles (C) e urêmicos (Nx) submetidos a diferentes concentrações de fósforo (P) na dieta, realizada pela técnica de *Western blotting*. Os

valores são expressos como mediana e o número de animais analisados foi de 4 a 8. (A) Expressão proteica de NaP-IIb no duodeno; (B) Expressão proteica de NaP-IIb no jejuno; (C) Expressão proteica de NaP-IIb no íleo. A análise estatística foi realizada através da análise de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunns* e o teste t de *Mann-Whitney*. (*) $p < 0,05$ versus grupo C; (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Figura 12. Análise da expressão proteica do cotransportador PiT-1 na mucosa de intestino delgado de animais controles (C) e urêmicos (Nx) submetidos a diferentes concentrações de fósforo (P) na dieta, realizada pela técnica de ELISA. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. (A) Expressão proteica de PiT-1 no duodeno; (B) Expressão proteica de PiT-1 no jejuno; (C) Expressão proteica de PiT-1 no íleo. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey* e o teste t de *Student*. (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

4.4. Análise quantitativa da expressão gênica dos cotransportadores

Para identificar se as diferenças observadas na expressão proteica de NaP-IIb e PiT-1 deviam-se às alterações nos níveis de RNA mensageiro (RNAm), determinou-se as concentrações relativas dos genes correspondentes.

A expressão gênica do cotransportador NaP-IIb no duodeno não apresentou diferença entre os grupos. No grupo Nx Alto a expressão desse cotransportador foi distinta no jejuno e no íleo, ou seja, menor no jejuno e maior no íleo em relação aos seus respectivos controles (Figura 13).

A expressão genica do cotransportador PiT-1 foi diferente em todos os segmentos de intestino delgado analisados. Tanto duodeno, jejuno e íleo dos animais do grupo Nx Baixa apresentaram maior expressão em relação ao seu controle (Figura 14).

Detectamos uma correlação direta entre os níveis de RNAm do NaP-IIb, no jejuno com o P sérico ($p=0,0037$; $r=0,4333$). Quanto ao PiT-1 encontramos uma correlação direta entre sua expressão gênica no jejuno e os níveis de P sérico ($p=0,0018$; $r=0,4668$) e no duodeno e jejuno com o FGF-23 ($p=0,0227$, $r=0,3595$; $p=0,0108$, $r=0,3988$, respectivamente).

Figura 13. Expressão gênica do cotransportador NaP-IIb na mucosa de intestino delgado de animais controles (C) e urêmicos (Nx) submetidos a diferentes concentrações de fósforo (P) na dieta, realizada pela técnica de PCR em tempo real. Os dados são expressos em mediana e o número de animais analisados foi de oito a nove por grupo. (A) Expressão gênica de NaP-IIb em duodeno; (B) Expressão gênica de NaP-IIb em jejunum; (C) Expressão gênica de NaP-IIb em íleo. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste de *Dunns* e teste de *Mann-Whitney*. (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Figura 14. Expressão gênica do cotransportador PiT-1 na mucosa de intestino delgado de animais controles (C) e urêmicos (Nx) submetidos a diferentes concentrações de fósforo (P) na dieta, realizada pela técnica de PCR em tempo real. Os dados são expressos em mediana e o número de animais analisados foi de oito por grupo. (A) Expressão gênica de PiT-1 em duodeno; (B) Expressão gênica de PiT-1 em jejuno; (C) Expressão gênica de PiT-1 em íleo. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste de *Dunns* e teste de *Mann-Whitney*. (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

4.5. Análise quantitativa de apoptose no epitélio intestinal

A análise do número de células apoptóticas foi realizada em cada segmento separadamente (duodeno, jejuno e íleo) e somando-se os resultados dos três segmentos.

No duodeno, o número de células apoptóticas foi maior no grupo Nx Alto comparado ao controle e tanto Nx Baixo quanto C Baixo foram maiores que C Padrão. No jejuno, todos os grupos de animais Nx apresentaram diferenças em relação aos seus controles, sendo menores na dieta baixa e padrão comparado ao grupo C Baixo e C Padrão. No grupo Nx Alto a porcentagem de apoptose foi maior comparado ao C Alto e ao C Padrão. Não houve diferença no número de células apoptóticas analisadas no íleo (Figura 15). Na análise de variância de dois fatores detectamos que no duodeno a porcentagem enterócitos apoptóticos foi influenciada tanto pela dieta como pela uremia, no jejuno unicamente pela dieta e no íleo pela uremia.

Na análise de todo o intestino delgado, o grupo C Baixo apresentou porcentagem de enterócitos em apoptose maior que o controle padrão. O grupo Nx Alto apresentou maior número de células apoptóticas comparado ao seu controle e controle padrão. (Figura 15). Já a análise de variância demonstrou a influência da dieta quando os segmentos foram analisados como um todo.

Na figura 16, estão apresentadas as imagens da reação de imunohistoquímica no duodeno de animal do grupo C e Nx. Observa-se um maior número de núcleos apoptóticos marcados no grupo Nx.

Figura 15. Análise de apoptose em enterócitos do intestino delgado de animais controles (C) e urêmicos (Nx) submetidos a diferentes concentrações de fósforo (P) na dieta, realizada pela técnica de TUNEL. Os dados são expressos em mediana e o número de animais analisados foi de três por grupo. (A) Duodeno; (B) Jejunum; (C) Íleo; (D) Todos os segmentos juntos. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunns* e teste de *Mann-Whitney*. (*) $p < 0,05$ versus grupo C Padrão; (#) $p < 0,05$ versus respectivo controle.

Figura 16. Micrografia representativa da técnica de TUNEL realizada em duodeno de animais controles (C) e urêmicos (Nx). A positividade das células apoptóticas são detectadas pela coloração acastanhada nos enterócitos das vilosidades. (A) controle negativo da reação da técnica de TUNEL; (B) grupo C Alto; (C) grupo Nx Alto. Aumento de 1.000 x.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Este trabalho mostra três resultados principais. Primeiro, os ratos controles e urêmicos responderam de forma diferente à oferta reduzida ou aumentada de fósforo na dieta. Em segundo lugar, a menor expressão de NaP-IIb no jejuno dos animais Nx foi determinada pela dieta e a maior expressão de RNAm para PiT-1, em todos os segmentos, foi determinada pela uremia. Em terceiro, a porcentagem de enterócitos apoptóticos foi maior nos animais urêmicos com dieta alta em P.

O modelo e o tempo de uremia que usamos foram adequados uma vez que o comprometimento da função renal nos animais Nx foi significativo quando comparado aos controles (menor *clearance* de creatinina, hematócrito e maior albuminúria). A sobrecarga de P não agravou a função renal, contrariamente ao que já foi demonstrado no estudo de Neves e cols. (2004), provavelmente pela concentração de P na dieta ser maior (1,2% de P) somado a um tempo de uremia mais prolongado (60 dias). No entanto, o tempo de uremia que utilizamos foi suficiente para elevar o P sérico, diminuir os níveis de cálcio iônico e aumentar os níveis de PTH, de FGF-23 e a fração de excreção de P. Esses resultados demonstram a importância do controle da ingestão de fósforo na uremia, pois os animais que receberam menos P elevaram menos os níveis de PTH e FGF-23, porém o suficiente para aumentar a fração de excreção e normalizar o P sérico. Vale lembrar que P, PTH e FGF-23 persistentemente elevados se associam com piora da função renal, complicações ósseas, cardiovasculares e maior mortalidade nos pacientes com DRC (Gutierrez, 2005; Neves et al., 2004; Lau et al., 2013; Weinman et al., 2013; Marks et al., 2013).

Outra vantagem do nosso modelo foi em relação à mortalidade, elevada na sobrecarga prolongada de P (71,4%) ao contrário da nossa que foi de 4,9% (Finch et al., 2013). Optamos por uma sobrecarga aguda (48 horas), pois a renovação das células epiteliais do intestino delgado é rápida (Thomson et al., 2003).

Apesar dos animais urêmicos ganharem menos peso que os controles, a dieta com maior concentração de P não acentuou a perda de peso, já que o tempo de administração foi curto. Uma sobrecarga de P mais prolongada poderia interferir no ganho de peso, como demonstrou Tani e cols. (2007).

Dessa forma obtivemos um modelo de uremia e de sobrecarga de P adequados para analisar o papel dos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 envolvidos na homeostase

do P. Nos rins esses cotransportadores são bastante estudados, contrariamente ao intestino, em que os conhecimentos dos processos regulatórios, principalmente na uremia, são escassos.

Os resultados da imunofluorescência mostraram que o cotransportador NaP-IIb se expressou em todo o intestino delgado dos animais controles e urêmicos já a quantificação no WB revelou que a oferta baixa de P resultou no aumento significativo somente nos controles. Esses resultados mostram a importância do transporte ativo de P quando a oferta pela dieta é reduzida o que já foi demonstrado em outros estudos. (Radanovic et al., 2005; Giral et al., 2009; Eto et al., 2006). O aumento da expressão proteica de NaP-IIb no grupo C Baixo, não se refletiu na maior expressão gênica em relação ao C Padrão. Quarenta e oito horas seria, assim, um tempo demasiado curto para alteração de RNAm. Estudo de Katai e cols. (1999) mostraram que a oferta de uma dieta 10 vezes mais restrita em P (0,02%), durante sete dias também não modificou os níveis de RNAm do cotransportador NaP-IIb. Resultados que vão de encontro aos nossos e revelam uma dissociação entre a expressão proteica e gênica para o NaP-IIb.

Nos animais urêmicos, somente o jejuno apresentou diminuição da expressão proteica de NaP-IIb quando comparado aos controles. De acordo com outros estudos, o jejuno parece ser o segmento que mais responde a mudanças na dieta justificando nossos resultados (Logham-Adham 1993; Eto et al., 2006; Giral et al., 2009).

O resultado obtido da análise de variância de dois fatores revelou que as diferenças entre expressão, proteica e gênica de NaP-IIb no jejuno dos animais Nx e C, na dieta baixa, foi determinada pela dieta e não pela uremia o que também foi observado em outros estudos (Loghman-Adham, 1993; Stauber et al., 2005).

Nos nossos resultados observamos que as proteínas NaP-IIb e β -actina separadas no gel SDS detectado pelo WB, apresentaram duas marcações no jejuno e íleo. Sabe-se que marcações de diferentes tamanhos se associam com diferentes graus de glicosilação, representando formas monoméricas da mesma proteína, por isso foram quantificadas conjuntamente (Arima et al., 2002; Giral et al., 2009).

O efeito do PTH sobre os cotransportadores renais está bem descrito, aumentando a fosfatúria através da internalização dos mesmos e reduzindo a reabsorção de P. No entanto, a atividade do PTH sobre os cotransportadores NaP-IIb no intestino não foi totalmente esclarecida e poderia ocorrer pela sua interferência na síntese de calcitriol associada ao FGF-23 (Prié et al., 2005; Martin et al., 2005).

Enquanto a sobrecarga de fósforo aumenta os níveis de FGF-23, a restrição praticamente não modifica os níveis desse hormônio (Stubbs et al., 2007). Isto também foi demonstrado nos nossos resultados, sempre ressaltando o tempo curto de sobrecarga do nosso estudo. Nos animais Nx, os níveis de FGF-23 foram mais elevados mesmo na dieta restrita em P, o que poderia contribuir para redução da absorção de P via diminuição da síntese de calcitriol ou pelo efeito direto do FGF-23 na expressão do cotransportador NaP-IIb, hipóteses que não avaliamos, mas demonstrada em outros trabalhos (Logham-Adham 1993; Segawa et al., 2004).

Outro fator que pode interferir na absorção intestinal de P e que não analisamos foi o MEPE, que é uma fosfoglicoproteína da matriz extracelular produzida pelas células ósseas (osteoblastos e osteócitos) e os odontoblastos, e atua inibindo a absorção renal e intestinal do P, independentemente do PTH, FGF-23 ou calcitriol (Lee & Marks, 2015). No intestino expressa-se principalmente no jejuno e detectou-se RNAm no duodeno (Marks et al., 2010; Bernt & Kumar, 2008; Lee & Marks, 2015). A forma solúvel da proteína klotho também poderia agir de forma parácrina no intestino interferindo sobre os cotransportadores e, portanto, na absorção de P (HU et al., 2010; Dërmaku-Sopjani et al., 2011). Estudo *in vitro* de Dërmaku-Sopjani e cols. (2011), demonstrou que essa proteína reduziu significativamente o transporte de P via NaP-IIb sem interferência do FGF-23 e do calcitriol. A proteína klotho atua tanto como protease, clivando componentes extracelulares das proteínas transportadoras de P com consequente redução da sua atividade, quanto na glicosilação de proteínas de membrana modificando o transporte de substâncias, incluindo o P (Dërmaku-Sopjani et al., 2011; Hu et al., 2010; Martin et al., 2012).

Aparentemente animais controle são mais sensíveis às mudanças na concentração de P da dieta, uma vez que modificaram rapidamente a expressão proteica do NaP-IIb. Já nos animais urêmicos, cujos níveis séricos de P são mais elevados, haveria uma resistência a essas mudanças visando proteger o organismo dos efeitos deletérios da hiperfosfatemia.

Com relação ao cotransportador PiT-1, vale ressaltar que este foi descrito como uma proteína presente tanto na membrana basolateral quanto apical dos enterócitos e que funcionaria como uma proteína *housekeeping*, tendo sua expressão modificada quando houvesse prejuízo da expressão dos cotransportadores NaP-IIb (Giral et al., 2009; Forster et al., 2013).

Na imunofluorescência detectamos que a expressão de PiT-1 foi menos intensa quando comparada a do NaP-IIb, porém sua distribuição na região apical dos enterócitos foi semelhante. Nos animais urêmicos com dieta baixa em P, os maiores níveis de RNAm do PiT-1 não se traduziram em maior expressão proteica, possivelmente devido aos fatores pós-transcricionais influenciados pela uremia. Estudos prévios tem mostrado baixas taxas de transporte de P via PiT-1 e indetectáveis níveis de RNAm e proteínas em íleo de ratos (Marks et al., 2006; Giral et al., 2009).

Quando avaliamos o papel da uremia e da dieta na expressão gênica do PiT-1, a análise de variância de dois fatores detectou que no jejuno dos animais com dieta padrão os níveis de RNAm foram influenciados pela uremia. No duodeno e no jejuno a expressão gênica do PiT-1 se correlacionou positivamente com níveis de FGF-23, mais elevados na uremia.

A participação do PiT-1 na absorção intestinal de P nos distintos segmentos do intestino delgado é controversa, sua expressão proteica em resposta a sobrecarga de P não é unânime. (Marks et al., 2010; Forster et al., 2013; Giral et al., 2009). Nossos resultados mostraram que a expressão proteica de PiT-1 foi menor que do cotransportador NaP-IIb e restrita ao íleo de animais do grupo Nx Alto. Segundo Marks e cols. em ratos esse segmento tem pequena ou nenhuma capacidade de absorver fósforo (Marks et al., 2015). No entanto sabe-se que no íleo a permanência do alimento é longa, o que deve favorecer a absorção de P mesmo sem auxílio de cotransportadores.

No duodeno, tanto a uremia quanto a dieta contribuíram para aumentar a porcentagem de células apoptóticas.

Ao analisarmos a participação do P na apoptose dos enterócitos, os nossos resultados mostraram maior número de células apoptóticas em animais Nx com dieta alta em P. Mesmo que esta diferença não tenha sido uniforme nos segmentos, ela se manteve quando analisamos os três segmentos juntos, mostrando que a uremia associada à sobrecarga de P aumenta a porcentagem de células apoptóticas. Esses resultados são muito interessantes mostrando que, assim como nos osteoblastos e condrócitos, a sobrecarga de P aumenta a apoptose dos enterócitos, o que talvez ocorra em outras células do organismo.

Segundo Kolek e cols. (2005) a maior expressão de PiT-1 seria determinante na apoptose induzido pelo P. No íleo do grupo Nx Alto não encontramos diferença na porcentagem de células apoptóticas e justamente nesse segmento a expressão proteica

de PiT-1 foi menor, o que deve ter interferido na apoptose mediada pelo P, confirmada pela interação da uremia com a taxa de apoptose no íleo, e não com a dieta, pelo teste de duas variáveis (*two-way* ANOVA).

O trato gastrointestinal tem um extenso sistema nervoso intrínseco que auxilia em várias funções como motilidade e absorção (Furness, 2012). Nas reações de imunofluorescência, especialmente para o PiT-1, observamos intensa marcação desse cotransportador na região entre a camada muscular circular e longitudinal assemelhando-se a corpos celulares de neurônios seguindo redes lineares como a de axônios (dados não mostrados). Seriam necessários outros experimentos para identificar em quais neurônios essas marcações se encontram e assim investigar outra via de participação do PiT-1 ou do próprio sistema nervoso nos processos regulatórios de absorção do intestino.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

O padrão de resposta na expressão dos cotransportadores NaP-IIb e PiT-1 é diferente entre animais controles e nefrectomizados, e o aumento da expressão proteica em 48 horas independe do aumento da transcrição gênica.

Para os animais Nx, o jejuno foi o segmento do intestino delgado que mostrou maior resposta modulatória da expressão proteica de NaP-IIb e o íleo para PiT-1.

A menor expressão proteica de NaP-IIb no jejuno de animais Nx foi determinada pela dieta e a maior expressão de RNAm para PiT-1 no grupo Nx Baixo em comparação aos controles foi determinada pela uremia, em todos os segmentos.

A taxa de apoptose foi maior em animais urêmicos com dieta alta em P.

O controle da ingestão de fósforo é importante na uremia, pois mínimas alterações na oferta de fósforo pela dieta auxiliam na manutenção dos níveis séricos de P mais próximos da normalidade.

O estudo de absorção intestinal é promissor e fundamental para maior compreensão dos efeitos nocivos de altos níveis de P sérico e busca de novas terapias.

BIBLIOGRAFIA

7. Referências Bibliográficas

Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, Kestenbaum BR. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. **J Am Soc Nephrol.** 2009; 20 (2): 381-7.

Arima K, Hines ER, Kiela PR, Drees JB, Collins JF, Ghishan FK. Glucocorticoid regulation and glycosylation of mouse intestinal type IIb Na-Pi cotransporter during ontogeny. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2002; 283: G426–G434.

Bergwitz C, Jüppner H. Phosphate sensing. **Adv Chronic Kidney Dis** 2011; 18 (2): 132-44.

Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. **Physiology** 2008; 24: 17-25.

Blaine J, Okamura K, Giral H, Breusegem S, Caldas Y, Millard A, Barry N, Levi M. PTH-induced internalization of apical membrane NaPi2a: role of actin and myosin VI. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2009; 297: C1339-C1346.

Blaine J, Lanzano L, Giral H, Caldas Y, Levi M, Gratton E, Moldovan R, Lei T. Dynamic imaging of the sodium phosphate cotransporters. **Adv Chronic Kidney Dis.** 2011; 18 (2): 145-50.

Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. **Am J Kidney Disease** 1998; 31 (4): 607-17.

Boudry G, David ES, Douard V, Monteiro IM, Le Huërou-Luron I, Ferraris RP. Role of intestinal transporters in neonatal nutrition: carbohydrates, proteins, lipids, minerals, and vitamins. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 2010; 51 (4): 380-401.

Capuano P, Radanovic T, Wagner CA, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, St-Arnaud R, Murer H, Biber J. Intestinal and renal adaptation to a low-Pi diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1 α OHase-deficient mice. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2005; 288: C429-C434.

Caruso M, Demonte A. Histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes fontes proteicas. **Alim Nutr.** 2005; 16 (2): 131-6.

Chavkin NW, Chia JJ, Crouthamel MH, Giachelli CM. Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells. **Exp Cell Res.** 2015. doi:10.1016/j.yexcr.2015.02.002 [Epub ahead of print]

Chen W, Wang F, Zeng W, Sun J, Li L, Yang M, Sun J, Wu Y, Zhao X, Zhu C. Regulation of Cellular Response Pattern to Phosphorus Ion is a New Target for the Design of Tissue-Engineered Blood Vessel. **Adv Healthc Mater.** 2015. doi: 10.1002/adhm.201400763. [Epub ahead of print]

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.** 1987; 162 (1): 156-9.

Dërmaku-Sopjani M, Sopjani M, Saxena A, Shojaiefard M, Bogatkov E, Alesutan I, Eichenmüller M, Lang F. Downregulation of NaPi-IIa and NaPi-IIb Na-coupled phosphate transporters by coexpression of Klotho. **Cell Physiol Biochem.** 2011; 28 (2): 251-8.

Drozdowski L, Thomson AB. Intestinal mucosal adaptation. **World J Gastroenterol.** 2006; 12 (29): 4614-27.

Drozdowski LA, Clandinin MT, Thomson ABR. Morphological, kinetic, membrane biochemical and genetic aspects of intestinal enteroplasticity. **World Gastroenterol** 2009; 15 (7): 774-87.

Eto N, Tomita M, Hayashi M. NaPi-mediated transcellular permeation is the dominant route in intestinal inorganic phosphate absorption in rats. **Drug Metab Pharmacokinet.** 2006; 21 (3): 217-21.

Finch JL, Lee DH, Liapis H, Ritter C, Zhang S, Suarez E, Ferder L, Slatopolsky E. Phosphate restriction significantly reduces mortality in uremic rats with established vascular calcification. **Kidney Int.** 2013; 84: 1145–53.

Forster I, Hernando N, Sorribas V, Werner A. Phosphate transporters in renal, gastrointestinal, and other tissues. **Adv Chronic Kidney Dis.** 2011; 18 (2): 63-76.

Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transport kinetics and structure function relationships of SLC34 and SLC20 proteins. **Curr Top Membr.** 2012; 70: 313-56.

Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. **Mol Aspects Med.** 2013; 34 (2-3): 386-95.

Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 9 (5): 286-94.

Giral H, Caldas Y, Sutherland E, Wilson P, Breusegem S, Barry N, Blaine J, Jiang T, Wang XX, Levi M.. Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate. **Am J Physiol Renal Physiol** 2009; 297: F1466–F1475.

Goodman WG, Quarles LD. Development and progression of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: lessons from molecular genetics. **Kidney Int.** 2007; 74: 276-88.

Gutierrez OM. Fibroblast Growth Factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the “trad-off” hypothesis. **Clin J Am Soc Nephrol.** 2010; 5 (9): 1710-6.

Hattenhauer O, Traebert M, Murer H, Biber J. Regulation of small intestinal Na-Pi type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 1999; 277: G756-G762.

Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I., Murer H, Biber J. Characterization of a new murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. **Proc Natl Acad Sci.** 1998; 95: 14564–9.

Hutchison AJ. Oral phosphate binders. **Kidney Int.** 2009; 75: 906–14.

Hu M, Kuro-O M, Moe OW. Klotho and kidney disease. **J Nephrol.** 2010; 23 (16): S136-S144.

Ivanov AI. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: current concepts and unanswered questions. **Adv Exp Med Biol.** 2012; 763: 132-48.

Katai K, Miyamoto K, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, Tani Y, Arai H, Tatsumi S, Morita K, Taketani Y, Takeda E. Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Biochem J.** 1999; 343: 705-12.

Kiela PR, Ghishan FK. Recent Advances in the renal-skeletal-gut axis that controls phosphate homeostasis. **Lab Invest.** 2009; 89: 7-14.

Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR, Ghishan FK. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2005; 289 (6): G1036-42.

Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, Giachelli CM. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant.** 2013; 28 (1): 62-9.

Lederer E, Miyamoto K. Clinical consequences of mutations in sodium phosphate cotransporters. **Clin J Am Soc Nephrol.** 2012; 7: 1179-87.

Lee GJ, Marks J. Intestinal phosphate transport: a therapeutic target in chronic kidney disease and beyond? **Pediatr Nephrol.** 2015; 30 (3): 363-71.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} **Method Methods** 2001; 25 (4): 402-8.

Loghman-Adham M. Renal and intestinal Pi transport adaptation to low phosphorus diet in uremic rats. **J Am Soc Nephrol** 1993; 3: 1930-7.

Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry** 1965; 2: 235-54.

Mansfield K, Rajpurohit R, Shapiro IM. Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. **J Cell Physiol.** 1999; 179 (3): 276-86.

Marks J, Srai SK, Biber J, Murer H, Unwin RJ, Debnam ES. Intestinal phosphate absorption and the effect of vitamin D: a comparison of rats with mice. **Exp. Physiol.** 2006; 91: 531-7.

Marks J, Churchill LJ, Srai SK, Biber J, Murer H, Jaeger P, et al. Intestinal phosphate absorption in a model of chronic renal failure. **Kidney International** 2007; 72: 166–73.

Marks J, Churchill LJ, Debnam ES, Unwin RJ. Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein Inhibits Phosphate Transport. **Am Soc Nephrol** 2008; 19: 2313-20.

Marks J, Debnam ES, Unwin RJ. Phosphate homeostasis and the renal-gastrointestinal axis. **Am J Physiol Renal Physiol.** 2010; 299 (2): F285-F96.

Marks J, Debnama ES, Unwin RJ. The role of the gastrointestinal tract in phosphate homeostasis in health and chronic kidney disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 2013, 22: 481–7.

Marks J, Lee GJ, Nadaraja SP, Debnam ES, Unwin RJ. Experimental and regional variations in Na⁺-dependent and Na⁺-independent phosphate transport along the rat small intestine and colon. **Physiol Rep.** 2015; 3 (1): e12281.

Martin DR, Ritter CS, Slatopolsky E, Brown AJ. Acute regulation of parathyroid hormone by dietary phosphate. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2005; 289: E729-E734.

Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/KLOTHO endocrine pathways. **Physiol Rev.** 2012; 92 (1): 131–55.

Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. **Bone.** 2000; 27 (3): 359-66.

Murer H, Biber J. Molecular mechanisms of renal apical Na/phosphate cotransport. **Annu Rev Physiol.** 1996; 58: 607-18.

Murer H, Forster I, Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. **Pflugers Arch.** 2004; 447 (5): 763-7.

Neves KR, Graciolli FG, dos Reis LM, Pasqualucci CA, Moysés RMA, Jorgetti V. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. **Kidney Int.** 2004; 66: 2237–44.

Pinho M & Rossi BM. O ciclo celular intestinal. **Ver Bras Coloproct.** 1998; 18 (3): 214-5.

Prié D, Becka L, Urena P, Friedlander G. Recent findings in phosphate homeostasis. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension** 2005, 14: 318–24.

Prié D, Torres PU, Friedlander G. Phosphate handling: new genes, new molecules. **Horm Res Paediatr** 2011; 76 (1): 71-5.

Qunibi WY. Dyslipidemia and progression of cardiovascular calcification (CVC) in patients with end-stage renal disease (ESRD). **Kidney International** 2005; 67 (95): S43–S50.

Radanovic T, Wagner CA, Murer H, Biber J. Regulation of Intestinal Phosphate Transport I. Segmental expression and adaptation to low-P_i diet of the type IIb Na⁺-P_i cotransporter in mouse small intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2005; 288 (3): G496-G500.

Reining SC, Liesegang A, Betz H, Biber J, Murer H, Hernando N. Expression of renal and intestinal Na/Pi cotransporters in the absence of GABARAP. **Eur J Physiol** 2010; 460: 207–17.

Santoro D, Cianciaruso B. Alterazione del metabolismo calcio-fosforo e dieta ipoproteica. **Giornale Italiano di Nefrologia** 2008; 25 (42): S25-S28.

Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S, Miyamoto K. Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. **J. Biol. Chem.** 2002; 277: 19665–72.

Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Inoue Y, et al. Intestinal Na-Pi co-transporter adaption to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. **Am J Physiol Renal Physiol** 2004; 287: F39-F47.

Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, et al. Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. **Am J Physiol Renal Physiol** 2009; 297: F671–8.

Simons BD, Clevers H. Stem cell self-renewal in intestinal crypt. **Exp Cell Res.** 2011; 317 (19): 2719-24.

Sobotta J, Welsch U. **SOBOTTA Atlas de Histologia – Citologia, Histologia e Anatomia Microscópica – 7ª Edição.** Editora Guanabara Koogan (Grupo GEN); 2007.

Spasovski G, Massy Z, Vanholder R. Phosphate metabolism in chronic kidney disease: from pathophysiology to clinical management. **Semin Dial.** 2009; 22 (4): 357-62.

Stauber A, Radanovic T, Stange G, Murer H, Wagner CA, Biber J. Regulation of intestinal phosphate transport. II. Metabolic acidosis stimulates Na(+)-dependent phosphate absorption and expression of the Na(+)-P(i) cotransporter NaPi-IIb in small intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 2005; 288 (3): G501-6.

Stubbs J, Liu S, Quarles LD. Role of fibroblast growth factor 23 in phosphate homeostasis and pathogenesis of disordered mineral metabolism in chronic kidney disease. **Semin Dial.** 2007; 20 (4): 302-8.

Suzuki M, Kawaguchi Y, Momose M, Morita T, Yokoyama K, Miyahara T. 1,25-dihydroxyvitamin D stimulates sodium-dependent phosphate transport by renal outer cortical brush-border membrane vesicles by directly affecting membrane fluidity. **Biochem Biophys Res Commun.** 1988; 150 (3): 1193-8.

Takeda E, Yamamoto H, Nishida Y, Sato T, Sawada N, Taketani Y. Phosphate restriction in diet therapy. **Contrib Nephrol.** 2007; 155: 113-24.

Tani Y, Sato T, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, Arai H, Sawada N, Genjida K, Taketani Y, Takeda E. Effects of prolonged high phosphorus diet on phosphorus and calcium balance in rats. **J Clin Biochem Nutr.** 2007; 40 (3): 221-8.

Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, et al. Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. **Endocrinology.** 1998; 139 (4): 1692-9.

Tenenhouse HS. Phosphate transport: molecular basis, regulation and pathophysiology. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology** 2007; 103: 572-7.

Thomson ABR, Drozdowski L, Iordache C, Thomson BK, Vermeire S, Clandinin MT, Wild G. Small bowel review: Normal physiology, part 1. **Dig Dis Sci.** 2003; 48 (8): 1546-64.

Uribarri J. Phosphorus Homeostasis in Normal Health and in Chronic Kidney Disease Patients with Special Emphasis on Dietary Phosphorus Intake. **Seminars in Dialysis** 2007; 20 (4): 295–301.

Villa-Bellosta B, Sorribas V. Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2008; 232: 125–34.

Zegre Cannon C, Kissling GE, Goulding DR, King-Herbert AP, Blankenship-Paris T. Analgesic effects of tramadol carprofen or multimodal analgesia in rats undergoing ventral laparotomy. **Lab Anim** 2011; 40 (3): 85-93.

Wagner CA. Novel insights into the regulation of systemic phosphate homeostasis and renal phosphate excretion. **J Nephrol** 2007; 20: 130-4.

Wagner CA, Biber J, Murer H. What goes in must come out-the small intestine modulates renal phosphate excretion. **Nephrol Dial Transplant** 2007; 22: 3411–2.

Wagner CA, Hernando N, Forster IC, Biber J. The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters **Eur J Physiol** 2014; 466: 139–53.

Weinman EJ, Cunningham R, Wade JB, Shenolikar S. The role of NHERF-1 in the regulation of renal proximal tubule sodium–hydrogen exchanger 3 and sodium-dependent phosphate cotransporter2a. **J Physiol** 2005; 567 (1): 27–32.

Weinman EJ, Light PD, Suki WN. Gastrointestinal phosphate handling in CKD and its association with cardiovascular disease. **Am J Kidney Dis.** 2013; 62 (5): 1006-11.

ANEXOS

Anexo I. Dieta Harlan-Teklad, fósforo 0,02% (Baixa)

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.10262 20% Protein Diet (0.2% P)

Formula	g/Kg
Casein	230.0
DL-Methionine	3.0
Sucrose	435.11
Corn Starch	200.0
Corn Oil	52.3
Cellulose	37.86
Vitamin Mix, Teklad (40060)	10.0
Ethoxyquin, antioxidant	0.01
Mineral Mix, Ca-P Deficient (79055)	13.37
Calcium Phosphate, monobasic, monohydrate	1.6
Calcium Carbonate	16.75

Footnote

Modification of TD.91352. Contains approximately 0.7% Ca and 2.2 IU vitamin D/g.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	20.3	21.5
Carbohydrate	61.9	65.5
Fat	5.5	13.1

Kcal/g 3.8

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better,
and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc.
© 2008 Harlan Laboratories, Inc.

Key Features

- Purified Diet
- Protein
- Phosphorus
- Rodent

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- teklaudio@harlan.com

Helping you do research better

Anexo II. Dieta Harlan-Teklad, fósforo 0,54% (Padrão)

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.91352 20% Protein Diet

Formula	g/Kg
Casein	230.0
DL-Methionine	3.0
Sucrose	431.7
Corn Starch	200.0
Corn Oil	52.3
Cellulose	37.86
Vitamin Mix, Teklad (40060)	10.0
Ethoxyquin, antioxidant	0.01
Mineral Mix, Ca-P Deficient (79055)	13.37
Calcium Phosphate, dibasic	16.66
Calcium Carbonate	5.1

Footnote

The 20% protein diet in a popular series of adjusted protein diets. These diets are isocaloric and are matched for calcium (0.7%) and phosphorus (0.54%).

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	20.3	21.5
Carbohydrate	61.6	65.3
Fat	5.5	13.1

Kcal/g 3.8

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better,
and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc.
© 2008 Harlan Laboratories, Inc.

Key Features

- Purified Diet
- Adjusted Protein Series
- Isocaloric
- Rodent

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

Anexo III. Dieta Harlan-Teklad, fósforo 0,9% (Alta)

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.110434 20% Protein Diet (0.9% P)

Formula	g/Kg
Casein	230.0
DL-Methionine	3.0
Sucrose	417.76
Corn Starch	200.0
Corn Oil	52.3
Cellulose	37.86
Vitamin Mix, Teklad (40060)	10.0
Ethoxyquin, antioxidant	0.01
Mineral Mix, Ca-P Deficient (79055)	13.37
Calcium Phosphate, monobasic, monohydrate	30.2
Calcium Carbonate	5.5

Footnote

Modification of TD.91352 with 0.9% P. Contains approximately 0.7% Ca and 2.2 IU vitamin D/g.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	20.3	21.9
Carbohydrate	60.2	64.8
Fat	5.5	13.3

Kcal/g 3.7

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

Key Features

- Purified Diet
- Phosphorus Adjusted
- Series

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·
- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 *facsimile*
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

Anexo IV. Certificado do prêmio de melhor trabalho as Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN, 2013)

Anexo V. Certificado de 2º melhor pôster no Congresso Paulista de Nefrologia (2013)