

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**PAPEL DO Ca^{2+} EXTRACELULAR E DO RECEPTOR SENSÍVEL A CÁLCIO (CaR)
NA REGULAÇÃO DA H^+ - K^+ -ATPASE RENAL**

**CURITIBA
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

**PAPEL DO Ca^{2+} EXTRACELULAR E DO RECEPTOR SENSÍVEL A CÁLCIO (CaR)
NA REGULAÇÃO DA H^{+} - K^{+} -ATPASE RENAL**

Monografia apresentada pela
graduanda Daiane Eliza Milan ao
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Fernandez Perez
Colaborador: Fernando A.M. Casare
(Mestrando Biologia Celular e
Molecular)

**CURITIBA
2010**

Aos meus pais Jostino P. Milan e Ana Marlene Giacomelli Milan

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Doutor Ricardo Fernandez Perez, pelas orientações, competência e grande paciência e compreensão.

Ao querido amigo e colaborador Fernando Casare, pelo apoio, orientações, compreensão e amizade.

À Triciane Ap. Milan e Marcos A. Milan.

À Luiz Carlos Giacomelli, pelo apoio e incentivo.

À Graice Giombelli, pelo apoio, incentivo e ombros amigos.

À meu já ausente cunhado Sebastião Salvandir Wanzuita, por dividir meus sonhos e objetivos.

Aos tão queridos e considerados amigos que dividiram momentos nesses anos de graduação, em especial à Talita Demichelli, Fernanda Ceschin, Daniela Soares, Karin Arruda e Devânia P. de Jesus.

À CNPq, por acreditar e apoiar jovens cientistas.

RESUMO

Os rins participam de funções como órgãos excretores, reguladores e de síntese de hormônios. Como órgãos reguladores, mantêm a homeostase ácido-base por mecanismos de secreção de prótons e reabsorção de bicarbonato principalmente em células intercalares do ducto coletor cortical (DCC). Esse manuseio pode dar-se por bombas vacuolares, ou bombas do tipo P, como a $H^+ - K^+ - ATPase$, e tanto hormônios quanto íons, que agem como co-fatores, podem modular sua atividade. O Ca^{2+} está entre os íons que podem modular a atividade das ATPases, e qualquer modificação nas suas concentrações é precisamente detectada por uma gama de células especializadas. Presumivelmente, essa sensibilidade se deve ao Receptor Sensível a Cálcio (CaR), expresso em todos os segmentos do néfron. Esse receptor apresenta, entre outros, controle da secreção de hormônios, equilíbrio do cálcio extracelular e do cloreto de sódio. Devido a tantas descobertas recentes sobre as diversas funções do CaR, este projeto tem como objetivo investigar a interação do mesmo com o transporte de prótons através da $H^+ - K^+ - ATPase$ no córtex e na medula externa do rim de camundongo. Foram realizados testes de atividade bioquímica onde foi medida a atividade da bomba $H^+ - K^+ ATPase$ em frações de membranas plasmáticas obtidas a partir das regiões do córtex e da medula externa de rim de camundongo. Foram utilizados os reagentes *gadolinium* (Gd^{3+}) e neomicina, conhecidos agonistas de CaR e diferentes concentrações de cálcio extracelular. Os resultados mostram que Gd^{3+} 300 μ M estimulou de forma significativa a atividade da $H^+ - K^+ ATPase$ presente tanto no córtex (controle 13.812 ± 3.327 e na presença de Gd^{3+} 26.862 ± 7.385 , $p < 0,05$, $n = 10$), como na medula externa (controle 13.296 ± 4.118 e na presença de Gd^{3+} 22.261 ± 4.00 , $p < 0,05$, $n = 10$). Resultados similares foram observados ao utilizar Neomicina. Foi observado também que a atividade da $H^+ - K^+ ATPase$ é sensível às mudanças nos níveis de Ca^{2+}_{extra} , quanto maiores as concentrações de cálcio, maior o estímulo da bomba. Assim, concluímos que existe modulação significativa da $H^+ - K^+ - ATPase$ pelo CaR.

SUMÁRIO

Introdução	Erro! Indicador não definido.
Justificativa e Objetivos	8
Metodologia.....	9
1) Obtenção de membranas plasmáticas renais:.....	Erro! Indicador não definido.0
2) Dosagem da concentração de proteínas:	Erro! Indicador não definido.0
3) Determinação bioquímica da atividade da H ⁺ ATPase vacuolar:	Erro! Indicador não def
Análise Estatística:	14
Resultados	14
Conclusão	18
Referências	19

INTRODUÇÃO

Os rins participam, no corpo, de múltiplas funções. Como órgãos excretadores, asseguram que as substâncias, presentes em excesso ou que sejam nocivas, sejam excretadas na urina em quantidades adequadas. Como órgão regulador, os rins mantêm constantes o volume e a composição dos líquidos orgânicos, ao regular a excreção de solutos e de água. Por fim, como órgãos endócrinos, os rins sintetizam e secretam três hormônios: renina, eritropoietina e 1,25-diidroxicolecalciferol (Costanzo, 1999).

A manutenção da homeostase ácido-base é mantida por esses órgãos através de mecanismos de secreção de prótons e reabsorção de bicarbonato. Sendo que para cada próton (H^+) que é excretado na luz do túbulo, um íon bicarbonato é reabsorvido. Ao longo do néfron se encontram três mecanismos de secreção de prótons: o contra-transporte Na^+/H^+ , a H^+ ATPase do tipo vacuolar e a H^+-K^+ ATPase. No túbulo proximal o intercâmbio Na^+/H^+ é o predominante (Mello Aires & Malnic, 1979 e Murer e col., 1976), acompanhado de uma H^+ -ATPase do tipo vacuolar (Kinne-Saffran e col., 1982; Ulate e col., 1993). O contra-transportador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) é a via predominante para a secreção de H^+ e usa o gradiente lúmen célula para Na^+ para impulsionar este processo (Lee Hamm & Nakhoul, 2008). Por outro lado, até 40% da secreção de H^+ neste segmento é independente de Na^+ e sensível a bafilomicina, um inibidor da H^+ -ATPase do tipo vacuolar (Wagner e col., 2004). As células intercalares, presentes no ducto coletor cortical (DCC), são responsáveis pelo manuseio do H^+ e do HCO_3^- nos segmentos do ducto coletor e subdividem-se em células alfa e beta (Schuster, 1993 e Brown, 1988). Esse manuseio pode dar-se através de bombas vacuolares como a H^+ - ATPase ou bombas do tipo P, como a bomba $H^+ - K^+ - ATPase$. O tipo alfa secreta prótons na luz do túbulo, acidificando a urina, e para cada íon secretado, um íon bicarbonato é dissolvido no sangue através da membrana basolateral. Em contraste, as células intercalares beta secretam íon bicarbonato no lúmen e prótons são transportados através da membrana basolateral.

Diversos fatores podem modular a atividade das H^+ ATPases, dentre eles hormônios como o Hormônio paratireoideano (PTH), vasopressina,

angiotensina II; ou mesmo íons que agem como co-fatores, mensageiros intracelulares chaves de várias enzimas (Ca^{2+} , por exemplo) (Brown, 1998). Verificou-se, *in vitro*, que tanto alterações hormonais como alteração no nível de eletrólitos geram alterações nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} (Oliveira-Souza, 2004).

H^+ - K^+ - ATPase no néfron.

A mensuração da atividade bioquímica da H^+ - K^+ - ATPase em segmentos do néfron foi a primeira, embora indireta, evidência a sugerir a presença dessas ATPases no rim. Esses estudos primeiros demonstraram a presença de um mecanismo de trocas iônicas independente de Na^{2+} . A atividade dessa bomba é insensível a ouabaína e é inibida por compostos como omeprazol e *Schering* 28080 (Horisberger & Doucet, 2002). Esta atividade foi demonstrada principalmente no ducto coletor cortical (DCC) e no ducto coletor medular externo (DCME). Esta ATPase consiste em duas subunidades, uma maior de ~100kDa, a subunidade α , com 10 hélices transmembrana que contem o sitio catalítico e os locais de troca iônica; e uma menor de ~30kDa, a subunidade β (Gumz e col., 2010).

Estudos funcionais têm examinado em detalhe o mecanismo de acidificação do lúmen e a reabsorção pelo ducto coletor medular externo (DCME), uma região com alta capacidade de acidificação urinária. Esses estudos indicam que o mecanismo de secreção de prótons neste segmento é semelhante a um modelo proposto para a secreção de ácido gástrico. Especificamente, o efeito profundo de inibidores de H^+ - K^+ - ATPases ou a remoção de K^+ luminal na reabsorção de bicarbonato indica um papel importante dessa bomba na acidificação do lúmen. A importância de uma H^+ - K^+ - ATPase é reforçada pela constatação de que as concentrações nanomolares de bafilomicina, que inibe especificamente a ATPase vacuolar do tipo P, a H^+ ATPase, tem efeitos significativamente menor na reabsorção de HCO_3^- que os inibidores da H^+ - K^+ - ATPase (Wino & Smolka).

A partir de diversos estudos funcionais e bioquímicos tem sido possível identificar dois tipos de H^+ - K^+ ATPases: a tipo 1 ou gástrica altamente sensível

ao composto *Schering* 28080; e a tipo 2 ou colônica, menos sensível ao *Schering* mais altamente sensível a ouabaína.

Por último, estudos de expressão das subunidade α têm identificado o RNAm e a proteína da isoforma 1 (gástrica) no córtex de rato e coelho, na região medular externa de camundongo, rato e coelho, e na região medular interna de camundongo e rato. Especificamente, a isoforma 1 foi localizada nas células intercalares do DCME de rato e coelho. Entretanto a isoforma 2 (colônica) se expressa no DCC de camundongos, ratos e coelhos (Gumz e col., 2010).

Calcium-Sensing receptor, CaR ou CaSR.

O Ca^{2+} é um importante íon divalente que atua na manutenção de diversas funções no organismo, como formação óssea, divisão e crescimento celular, coagulação sanguínea, mensageiro da resposta hormonal, acoplamento estímulo-resposta, co-fator de enzimas, entre outros. Sabe-se que 99% do total de cálcio corporal está armazenado no osso, 1% é encontrado no fluido intracelular e 0.1% no fluido extracelular. De todo o Ca^{2+} do organismo, apenas uma pequena fração fica disponível para filtração (apenas o Ca^{2+} ionizado ou o complexado a ânions). Desse total, normalmente 99% é reabsorvido pelo néfron: 70% no túbulo proximal, 20% na alça de Henle, 5 a 10% no túbulo distal e menos de 5% no ducto coletor (Mello Aires, 2002).

Esse íon também é regulado por retroalimentação ou auto-regulação. Células da paratireóide secretam calcitonina quando os níveis de Ca^{2+} sobem nas células do túbulo proximal e, ao mesmo tempo, inibe a síntese de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (vitamina D3). Com a elevação do Ca^{2+} peritubular, mas não o luminal, nos túbulos do ramo espesso ascendente da alça de Henle há inibição na reabsorção de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Assim, esse íon divalente pode desempenhar um papel hormonal como um mensageiro extracelular, atuando em conjunto com PTH, calcitonina e vitamina D3 para manter a homeostase de íons minerais (Brown, 1998).

As modificações nas concentrações de Cálcio extracelular (Ca^{2+}_e) são constantemente monitoradas por uma variedade de células especializadas situadas em diferentes regiões e tecidos do organismo (Brown, 2001).

Presumivelmente, tanta sensibilidade deve-se ao receptor sensível a cálcio (*Calcium-Sensing receptor*, CaR ou CaSR), que se expressa em todos os segmentos do néfron, mas cujos efeitos em segmentos específicos e os mecanismos de regulação e transporte ainda não são totalmente compreendidos (Huang, 2007).

Demonstrou-se que esses receptores também são encontrados em outras regiões, tendo sido isolados de diferentes estruturas do organismo, como: glândulas paratireóides humanas (Garrett, 1995a); rins de ratos, coelhos, e humanos (Riccardi, 1995; Butters, 1997; Aida, 1995); células C de rato (Garrett, 1995b); cérebro de rato (Ruat, 1995); estômago humano (Ray, 1997); intestino de rato (Chattopadhyay, 1998); e osteoblastos de camundongo (Yamaguchi, 1998).

CaR apresenta seu papel na regulação da secreção e síntese do hormônio da paratireóide em resposta a modificações nas concentrações de cálcio extracelular em células C da tireóide (Huang, 2007). A estimulação deste receptor pode ativar diferentes vias de sinalização intracelular, produzindo diferentes efeitos biológicos de acordo com o tipo celular (Brown, 1998). Isto sugere que tais receptores estão envolvidos tanto no controle da homeostase mineral como nas funções de regulação da secreção dos hormônios calcitroóficos clássicos como: o Hormônio Paratireóideo (PTH), a Calcitonina e na 1,25 Dihidroxicálciferol (1,25(OH)₂ D3). Assim, o Ca²⁺ também pode atuar como um hormônio regulador local ou sistêmico, graças à presença do receptor (Brown, 2001).

O CaR medeia os efeitos do Ca²⁺ extracelular nos rins e parece essencial no controle da regulação fisiológica do equilíbrio do cálcio e, possivelmente, no equilíbrio do cloreto de sódio. A porção ascendente espessa da Alça de Henle e o túbulo convoluto distal parecem ser os segmentos do néfron mais responsáveis para os efeitos do receptor (Huang, 2007). Apesar do nome, os receptores CaR não são tão seletivos, apresentando também resposta para cátions divalentes, como o Magnésio (Mg²⁺), trivalentes, como o Gadolínio (Gd³⁺), e para proteínas com carga positiva, como a neomicina e a espermina (Brown, 1998).

A ativação do CaR inicia uma cascata via proteína G dependente, o estímulo do receptor ativa a fosfolipase C que cliva os fosfolípidos gerando Inusitol-Trifosfato (IP3), que por sua vez causa liberação do Ca^{2+} armazenado nos retículos sarcoplasmáticos no interior da célula, que é seguida por um grande influxo de Ca^{2+} extracelular. O aumento nas $[Ca^{2+}]_i$ ativa a proteína quinase C, que dá início a via das proteínas quinases (Ward, 2004).

Os receptores sensíveis a cálcio foram encontrados acoplados a uma proteína G de classe 3 (GPCR), e foram identificados pela primeira vez em células da glândula paratireóide bovina (Ward & Riccardi, 2002). Esse receptor encontra-se dividido em três domínios (figura 1). Um domínio extracelular (com aproximadamente 613 AAs), formado pela porção aminoterminal, e apresenta nove sítios de glicosilação (Thakker, 1998). O domínio central, com 250 AAs, em sete hélices hidrofóbicas. E o domínio citosólico (com aproximadamente 222 AAs), formado pela porção carboxiterminal com sequências de consenso para processos de fosforilação.

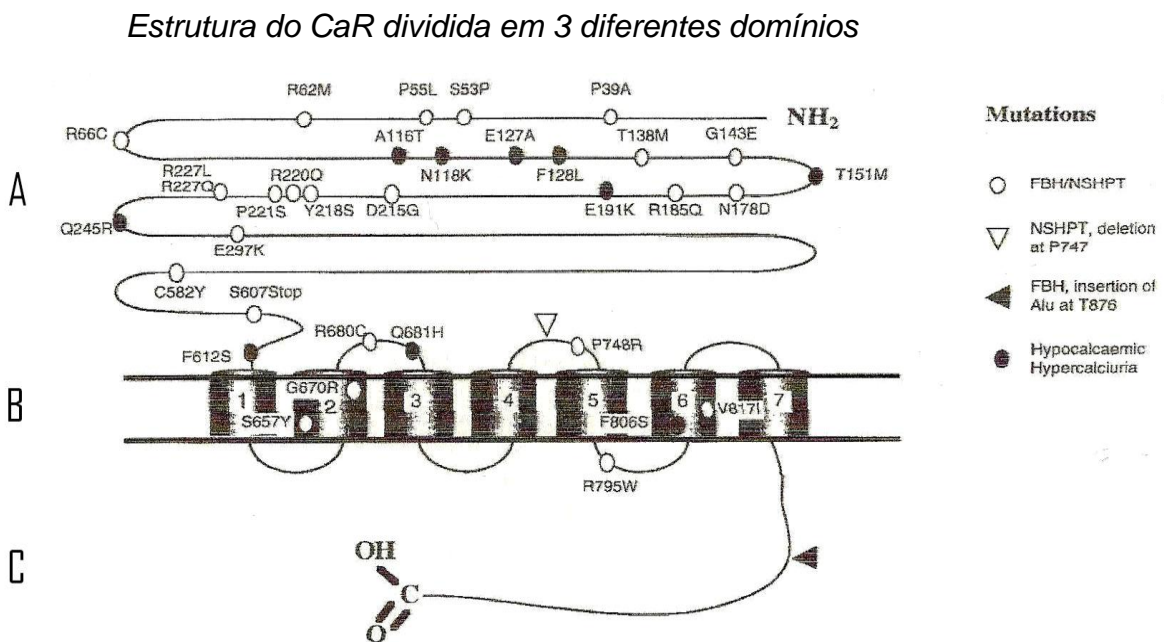


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do CaR mostrando que mesmo uma pequena alteração na cadeia dos AAs, como uma troca ou deleção de um AA pode ocasionar doenças como: Hipercalcemia Familiar Benigna ou a Hiperparatireoidismo Neonatal Severo (NSHPT). (Retirado de Thakker, 1998)

Tanto o PTH como a vitamina D exercem controle sobre a reabsorção de Ca^{2+} , entretanto, na ausência destes hormônios o nível de controle é reduzido mais não abolido. A relação linear entre a concentração plasmática de Cálcio e sua excreção urinária persiste, o que se opõe ao nível de controle esperado. Isto sugere a presença de um terceiro mecanismo calciotrófico, provavelmente o Ca^{2+} extracelular que por si só atue via CaR (Kurokawa, 1994; Hebert, 1996). Uma evidencia em favor desta hipótese é a observação feita em humanos, nos quais os níveis de PTH foram clampeados, de que a excreção de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ ficou particularmente sensível as variações agudas na concentração de Ca^{2+} extracelular (El-Hajj, 1998).

Em rim de mamíferos, CaR é expresso em todos os segmentos do néfron, incluindo a mácula densa, mas não o glomérulo. Em ratos, seu nível de expressão aumentou na presença de vitamina D. No túbulo proximal é expresso na membrana apical, e estudos nesta porção sugerem que na presença de PTH, a ativação do CaR pode resultar em aumento na reabsorção de sódio por antagonizar os seus efeitos. Estudos para determinar os efeitos do receptor no transporte de sódio no túbulo proximal não foram realizados. A membrana basolateral parece ser o segmento do néfron onde há melhores resultados quanto à inibição do transporte de íons divalentes. Esses estudos sugerem que variações das concentrações de cálcio no interstício renal em condições fisiológicas permitem uma dinâmica de sinalização dos receptores sensíveis a cálcio (Huang, 2007).

Outras evidências de que o CaR medeia o transporte e a regulação do cálcio foram observadas em estudos com ratos homozigotos e heterozigotos para uma mutação que inativa o receptor CaR. A mutação diminui a sensibilidade do receptor a Ca^{2+} e para suprir a secreção de PTH seria necessária uma concentração de cálcio mais elevada. Porém, o que acontece é uma hipocalciúria. Ratos heterozigotos têm fenótipo Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (FHH) e exibem elevação modesta nos níveis séricos de cálcio. Para mutações homozigóticas a doença é chamada de Hiperparatireoidismo Neonatal Severo (NHSPT), semelhante à humana, e se caracteriza por hiperplasia da tireóide, alterações ósseas, atraso no

crescimento e morte após o nascimento. Essa doença era considerada letal até que um grupo de cientistas conseguiu produzir modelos *knock out* em camundongos ($\text{CaR}^{-/-}$) que exibem hipocalciúria e outros sintomas similares a FHH, mas não morrem devido à mutação (Huang, 2007; Kos 2003).

Em experimentos utilizando hibridização *in situ*, observou-se a expressão de CaR isolado na porção medular do ramo espesso da alça de Henle e no ducto coletor. Outros estudos também têm demonstrado a presença do receptor na membrana apical do túbulo proximal e ducto coletor medular interno, no ramo ascendente espesso (na membrana basolateral), e de forma difusa no túbulo distal convoluto. Quase não há expressão de CaR no glomérulo (Riccardi & Gamba, 1999).

No ramo espesso da alça de Henle e no ducto coletor medular interno CaR está envolvido principalmente na regulação da reabsorção de Ca^{2+} e água. Foi demonstrado que incrementos na concentração plasmática de Ca^{2+} e Mg^{2+} modulam diretamente o transporte de NaCl e outros íons minerais na alça de Henle de rato. Assim, o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extra}}$ ou o tratamento com um agonista do receptor, como a neomicina ou o gadolínium, estimula a atividade do receptor sensível a cálcio, que por sua vez estimula o cotransporte de íons por ATPases como a $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$.

Um estudo recente com ducto coletor medular externo (DCME) de camundongo também demonstrou a influencia do CaR na regulação do pH urinário (Renkema e col., 2009). Neste trabalho foi estudada a recuperação do pH intracelular independente de sódio após a acidificação em células intercalares do DCME. Tendo sido observado que a secreção de prótons através da H^+ ATPase vacuolar foi estimulada também por incrementos no Ca^{2+} extracelular e por um agonista do CaR, neomicina 200 μM (figura 2).

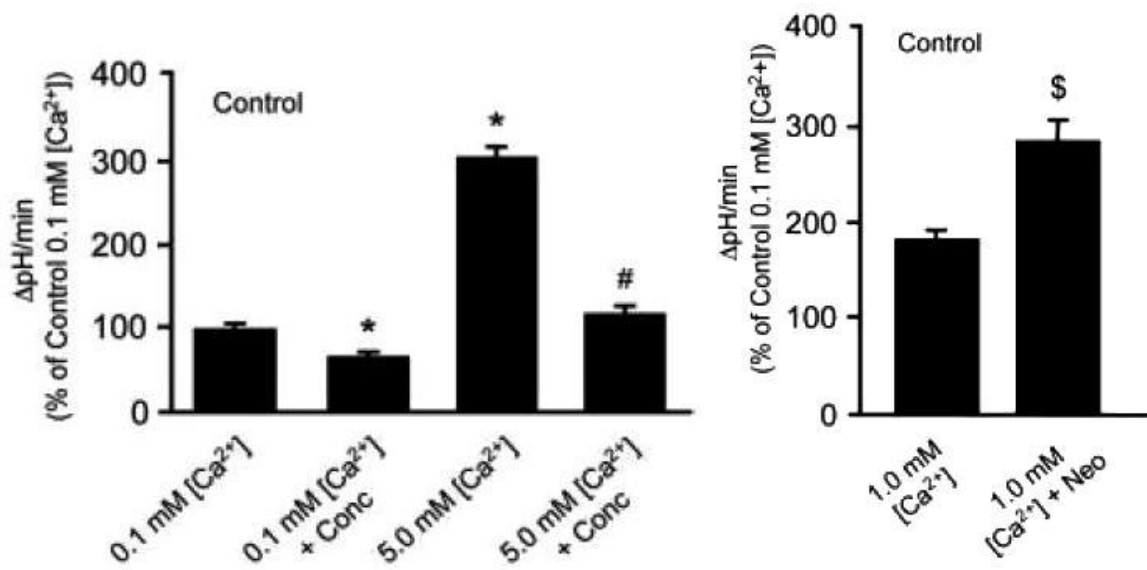


Figura 2: Efeito das concentrações de Ca²⁺ e Neomicina no ducto coletor medular. (retirado de Renkema, 2009)

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A regulação dos transportadores no epitélio renal dá-se de diversas formas e por diferentes moduladores, tanto íons quanto hormônios: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , ADH, PTH, Angiotensina II e a Aldosterona. Esses fatores modulam os transportadores apicais e basolaterais. Sabe-se que o receptor sensível a cálcio está presente ao longo do néfron, desde o túbulo proximal até o ducto coletor.

Descobertas recentes indicam que CaR pode estar envolvido na reabsorção de outros íons minerais, regulação do transporte tubular de íons bicarbonato e H^+ , além de possivelmente modular a secreção de prótons independente de Na^+ em células intercalares do ducto coletor cortical.

Dados recentes do nosso laboratório indicam que o estímulo do CaR, utilizando conhecidos agonistas como gadolinium e neomicina, incrementam de forma significativa a atividade das bombas H^+ ATPase do tipo vacuolar presentes nas regiões cortical e medular externa do rim de camundongo.

Devido a tantas descobertas recentes sobre as diversas funções do CaR, este projeto tem como objetivo investigar a interação do mesmo com o transporte de prótons através da H^+ - K^+ -ATPase no córtex e na medula externa do rim de camundongo.

METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos utilizando a seguinte metodologia:

- Testes de Atividade Bioquímica: onde foi medida a atividade da bomba H^+-K^+ ATPase em frações de membranas plasmáticas obtidas a partir das regiões do córtex e da medula externa.

Todos os procedimentos utilizados durante estes experimentos foram previamente submetidos ao Comitê Setorial de Ética em Experimentação Animal da UFPR e obtiveram aprovação através do protocolo de nº 354. Os animais selecionados para serem utilizados nos experimentos foram camundongos swiss adultos com peso corporal variando entre 25 e 35 gramas. Os animais foram mantidos no biotério em salas climatizadas com controle de umidade e ciclo claro-escuro de 12hs, sob uma dieta padrão até o momento dos experimentos.

A ortotanasia dos animais foi realizada por injeção letal de Pentobarbital, na dose de 150mg/kg e após a morte do animal, ambos os rins foram removidos e descapsulados seguindo o procedimento abaixo para obtenção de homogenados renais:

Os rins foram transferidos para uma placa de Petri de vidro com Solução de Separação a 4°C (Solução de Separação: 250mM sacarose, 10mM HEPES-tris (pH 7.4), 2mM EDTA e 1mM PMSF - Fenil-Metil-Sulfonil Fluorido) com a ajuda de uma gilete a pélvis renal e parte interna da medula foram removidas, enquanto pequenas porções do córtex e da medula externa foram separadas e armazenadas em tubos eppendorfs imersos em gelo, cada um contendo solução de separação numa proporção de aproximadamente 4mL solução/grama de tecido. A baixa temperatura e o PMSF são importantes para manter em atividade mínima os processos biológicos e reduzir a degradação protéica.

As porções obtidas neste procedimento foram então homogeneizadas em homogenizador de tecidos por cerca de 1 minuto, até obter uma solução

homogênea. O homogenado foi submetido ao processo de separação dos componentes celulares através de centrifugações fracionadas, a fim de se obter frações parcialmente purificadas das membranas plasmáticas celulares. A metodologia usada para obtenção das membranas das porções renais foi adaptada dos protocolos descritos por Boumendil-Podevin (1983) e Caruso - Neves (1999).

1) Obtenção de membranas plasmáticas renais:

1. Centrifugar o homogenado a 2.500G (*Break off* - desaceleração 0m/s) por 15min em temperatura de 4° C, transferir o sobrenadante para novo eppendorf e descartar o sedimento.

2. Centrifugar a porção obtida em ultra centrifuga a 20.500G (*Break off* - desaceleração 0m/s) por 25min, com uma micropipeta retirar o sobrenadante, deixando apenas a porção sedimentada.

3. Ressuspender e diluir a porção superior e mais clara do precipitado em 700 microlitros de solução sacarose buffer, uma solução constituída de 0,25M sacarose, 2mM HEPES-Tris - pH 7.4 e 1mM de PMSF.

4. Armazenar em Freezer -20°C para conservação das proteínas.

2) Dosagem de proteínas:

Para a medida das concentrações protéicas obtidas foi utilizado o método de Reação Colorimétrica de Bradford (1976).

3) Determinação bioquímica da atividade da H⁺- K⁺ ATPase:

Utilizando cálculos matemáticos estimou-se a atividade da bomba H⁺-K⁺ ATPase. Para tal mediu-se a quantidade de íons fosfato (Pi) que foram liberados durante o período de reação a que foram submetidos os fragmentos de membrana plasmática, na presença e ausência de inibidores da H⁺-K⁺ ATPase (Vanadato ou composto Schering 28080). Sendo os testes feitos para as porções do córtex e da medula externa de rim de camundongo sob as mesmas condições.

Para as medidas das concentrações de Pi inorgânico foi utilizada uma reação colorimétrica utilizando para tal um reativo de cor que possui em sua

fórmula Molibdato de Amônio e Metovanadato de Amônio (ver formula abaixo), compostos que apresentam interação colorimétrica com os íons de Pi inorgânico. A metodologia utilizada foi uma modificação do método descrito por Fiske e Subbarow (1925), por um protocolo retirado de Santos e colaboradores (2009).

Reativo de Cor para Fosfato – modo de preparo

Solução A:

Diluir 20 gramas de Molibdato de Amônio em 10 mL de H₂O;

Adicionar 2 mL de NH₄OH;

Adicionar H₂O_{MiliEq} até completar 200 mL.

Solução B:

Diluir 0,4770 gramas de Metovanadato de NH₄ em 150 mL H₂O;

adicionar 1,2 mL HNO₃;

Adicionar H₂O_{MiliEq} até completar 200 mL.

Solução de Reativo:

- 5% da Solução A;
- 5% da Solução B;
- 3,7% de HNO₃.

Sendo a solução final estável em geladeira por até 6 meses.

As reações bioquímicas utilizadas para obtenção da atividade ATPásica foram realizadas em tubos de ensaio contendo: 0,1mL do meio de reação comum (MRC), e completada com água, inibidores, agonistas, hormônios, ou ambos. O MRC varia de acordo com os protocolos empregados para cada finalidade. As reações são disparadas em cada tubo através da adição de 20 microlitros da solução contendo as frações de membrana plasmática de cada porção a ser estudada (córtex ou medula), cada tubo sendo disparado com um intervalo de 15 segundos de um para o outro. Os tubos são transferidos para banho Maria a 37°C durante 30 minutos para reação, sendo que nos tubos brancos a reação é disparada somente ao final da incubação, juntamente com o início da parada das reações através da adição de 1mL de Ácido Tricloroacético (TCA) 12%. Conforme cada tubo recebia TCA era agitado em *vórtex*, para homogeneizar a solução, e transferido para um isopor com gelo no intuito de diminuir qualquer reação que ainda poderia estar ocorrendo. Resulta importante impedir que os tubos brancos apresentem reação durante a

incubação para que se pudesse calcular a concentração basal de fosfato, proveniente da hidrólise espontânea do ATP presente na solução.

Os tubos foram então colocados em centrífuga refrigerada a 4°C e centrifugados a 2.000 RPM por 5 minutos, para que o ATP não hidrolisado e as proteínas sedimentem. Após a centrifugação era retirado 0,5mL de sobrenadante e transferido para novos tubos de ensaio, onde se adicionava 0,5mL do Reativo de Cor (1,02mM Metovanadato de amônio, 21,2 mM Mobilidato de amônio e 37mM de ácido nítrico), seguido novamente de agitação em *vórtex*. Os tubos eram deixados por 20 minutos em temperatura ambiente para reagir, após esse tempo fazia-se a leitura em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 380nm.

Para o estudo da sensibilidade do CaR ao gadolínio (Gd^{3+}) e neomicina (ambos agonistas do CaR), foi utilizada uma solução de MRC contendo: $CaCl_2$ 1mM, Oligomicina 1uM, Azida de Na^+ 10mM (inibidores da ATPase mitocondrial), Ouabaína 1mM (para inibir a Na^+-K^+ ATPase), $MgCl_2$ 4mM, ATP_{Na^+} 4mM, Hepes 50mM (tampão com pH ajustado para 7,0), e KCl 50mM.

Solução MRC

MRC ([] final)	Vol. 1 tubo	Vol. 30 tubos
KCl (30mM)	0,03	0,9
Oubaina (1mM)	0,02	0,6
HEPES 7,0 (50mM)	0,02	0,6
Azida de Na^+ (10mM)	0,01	0,3
ATP_{Na^+} (4mM)	0,008	0,24
$MgCl_2$ (4mM)	0,004	0,12
Oligomicina (10uM)	0,004	0,12
$CaCl_2$ (1mM)	0,002	0,06
H_2O	0,002	0,06
TOTAL	0,1mL	3,0mL

PROTOCOLO Gadolínium ($Gd^{3+}300\mu M$)

TUBOS	MRC	Sch $10^{-5}M$	$Gd^{3+}300\mu M$	H ₂ O	Proteína	Vol. Total (mL)
Br	0,1	-		0,08	0,02	0,2
1	0,1	-		0,08	0,02	0,2
2	0,1	0,02		0,06	0,02	0,2
3	0,1	-	0,02	0,06	0,02	0,2
4	0,1	0,02	0,02	0,04	0,02	0,2

PROTOCOLO Neomicina (Neom. 200 μM)

TUBOS	MRC	Sch $10^{-5}M$	Neom. ($2 \times 10^{-4}M$)	H ₂ O	Prot.	Vol. Total (mL)
Br	0,1	-	-	0,08	0,02	0,2
1	0,1	-	-	0,08	0,02	0,2
2	0,1	0,02	-	0,06	0,02	0,2
3	0,1	-	0,02	0,06	0,02	0,2
4	0,1	0,02	0,02	0,04	0,02	0,2

Para a avaliação da influência de variadas concentrações de Cálcio sobre o CaR e sua relação com a atividade da H⁺-K⁺ ATPase foi utilizada solução de MRC livre de cálcio, sendo o CaCl₂ 1mM substituído por água destilada. Os tubos para reação de Ca²⁺_{extra} foram divididos em três grupos com diferentes concentrações de cálcio: livre de cálcio (0mM), baixa concentração ($10^{-5}M$) e fisiológica ($10^{-3}M$).

PROTOCOLO Cálcio Extracelular ($[Ca^{2+}_{extra}]$)

TUBOS	MRC	Sch $10^{-5}M$	EGTA $5 \times 10^{-3}M$	CaCl ₂ $10^{-5}M$	CaCl ₂ $10^{-3}M$	H ₂ O	Proteína	Vol. Total (mL)
Br	0,1	-	-	-	-	0,08	0,02	0,2
1	0,1	-	-	-	-	0,08	0,02	0,2
2	0,1	0,02	0,02	-	-	0,04	0,02	0,2
3	0,1	0,02	-	0,02	-	0,04	0,02	0,2
4	0,1	0,02	-	-	0,02	0,04	0,02	0,2

As concentrações de Pi obtidas nas leituras dos tubos brancos foram subtraídas dos demais tubos para obtenção do valor real de Pi liberado pela atividade das ATPases. A atividade da H⁺-K⁺ ATPase foi determinada a partir da sensibilidade da bomba pelo inibidor orto-vanadato de sódio 1mM ou o composto Schering 28080 $10^{-5}M$. As atividades ATPásicas foram expressas em nM de Pi liberados por mg de proteína por unidade de tempo (nMPi.mg⁻¹.min⁻¹).

Análise estatística:

Os resultados estão apresentados na forma de valores médios com erro padrão. Para as análises entre dois grupos foi utilizado o teste *t* de *student*, pareando dois grupos por vez. Para análises com mais de dois grupos foi feita análise de variância de uma via, seguida do teste de *Student-Newman-Keulls*. O critério de significância estatística se obtém com valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Inicialmente estudamos o efeito de Gd^{3+} , um conhecido agonista do CaR, na atividade bioquímica da H^+-K^+ ATPase presente numa preparação de membrana plasmática obtida da região cortical ou da região medular externa do rim de camundongos. No gráfico 1 observamos que Gd^{3+} 300 μ M estimulou de forma significativa a atividade da H^+-K^+ ATPase (atividade ATPásica sensível a orto-vanadato de sódio 1mM) presente tanto no cortex como na medula externa.

Atividade da H^+-K^+ ATPase na presença de Gd^{3+} $3 \times 10^{-4}M$

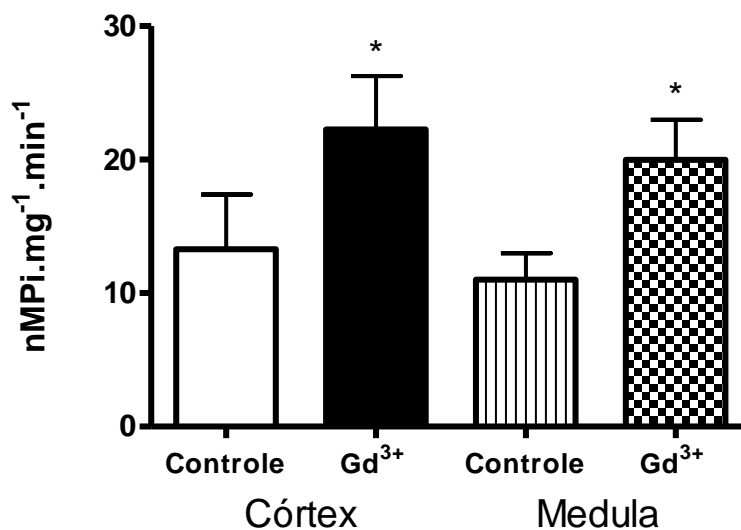


Gráfico 1: Atividade específica da H^+-K^+ -ATPase sensível a Vanadato $10^{-4}M$ expressa em nMPi.mg-1.min-1, na presença ou ausência, do agonista de CaR (Gadolinium – Gd^{3+} $3 \times 10^{-4}M$). Todos os grupos apresentados possuem n = 10. * $p < 0.05$ vs controle.

O composto *Schering* 28080 (um inibidor específico da H^+K^+ -ATPase) foi testado tanto na presença e ausência de *gadolinium* quanto na presença e ausência de *neomicina*. O estímulo do CaR com *gadolinium* ou *neomicina* incrementou de forma significativa a atividade da H^+K^+ -ATPase sensível a *Schering* 28080 ($5 \times 10^{-5}M$), tanto na região cortical como na medular externa (Gráficos 2 e 3).

Atividade da H^+K^+ -ATPase na presença de $Gd^{3+} 3 \times 10^{-4}M$

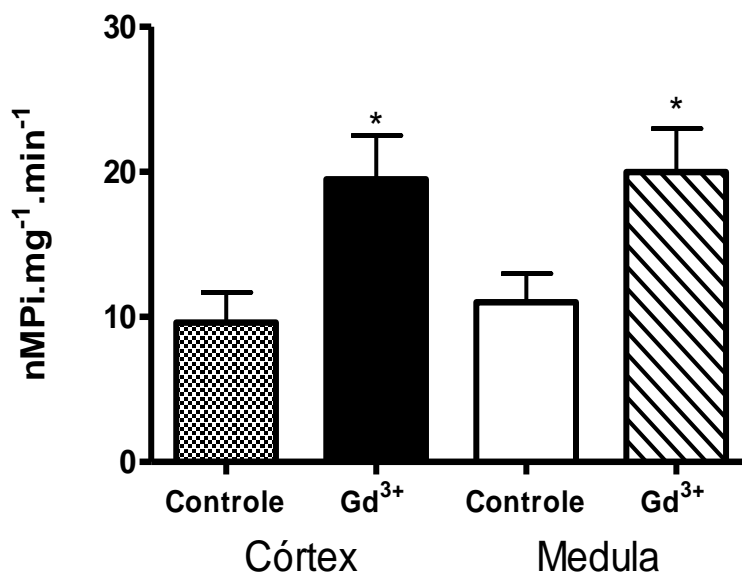


Gráfico 2: Atividade específica da H^+K^+ -ATPase sensível a *Schering* 28080 ($5 \times 10^{-5}M$) expressa em $nMPi \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$, na presença ou ausência, do agonista de CaR (*Gadolinium* – $Gd^{3+} 3 \times 10^{-4}M$). Todos os grupos apresentados possuem $n = 10$. $p < 0.05$ vs controle.

Atividade H^+-K^+ -ATPase -Cortex- na presença neomicina $2 \times 10^{-4}M$

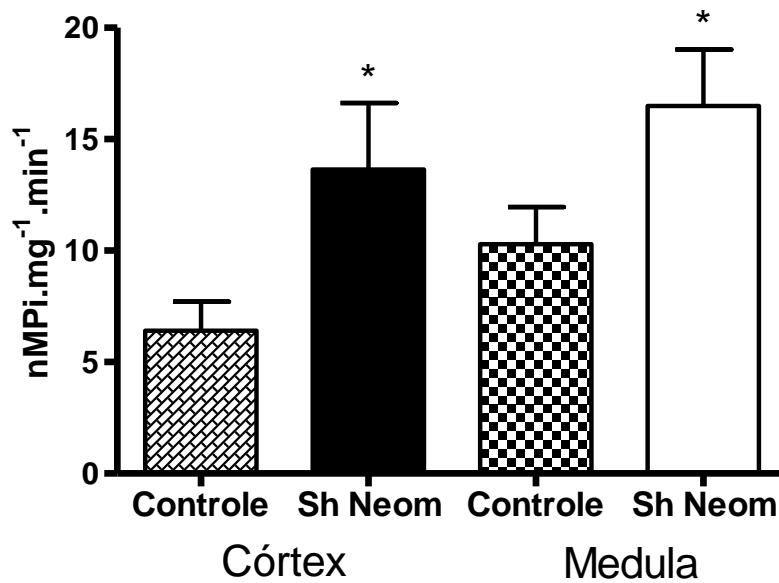


Gráfico 3: Atividade específica da H^+-K^+ -ATPase sensível a Schering 28080 ($5 \times 10^{-5}M$) no córtex e medula do rim de camundongo expressas em $nMPi.mg^{-1}.min^{-1}$, na presença/ausência, do agonista de CaR (neomicina-200uM). Todos os grupos apresentados possuem $n= 10$. * $p < 0.05$ vs controle.

Outros experimentos ainda foram realizados para testar a influência das diferentes concentrações de cálcio no estímulo do CaR sobre a H^+K^+ ATPase. Foram testados concentrações livres de cálcio ($[Ca^{2+}]$ 0M), baixas concentrações ($[Ca^{2+}]$ $10^{-5}M$), e concentrações fisiológicas ($[Ca^{2+}]$ $10^{-3}M$). No meio de reação comum há presença de cálcio, e para livrar o meio desses íons usou-se EGTA 50 mM, um quelante de Ca^{2+} .

O gráfico 4 apresenta o efeito das diferentes concentrações de cálcio no córtex do rim de camundongo.

H^+K^+ -ATPase córtex: diferentes concentrações de cálcio

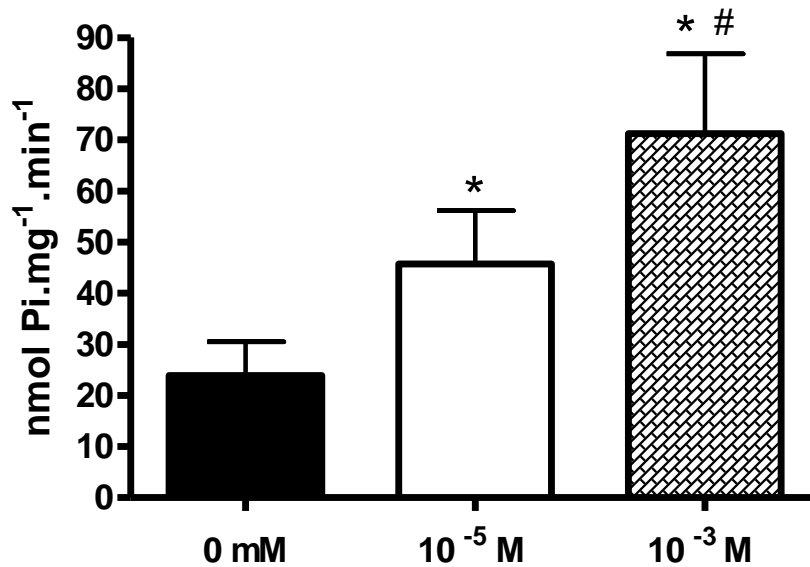


Gráfico 4: Atividade específica da H^+K^+ -ATPase sensível a Schering 28080 ($5 \times 10^{-5}M$) no córtex de rim de camundongo expressa em $nMPi.mg^{-1}.min^{-1}$, frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular. Todos os grupos apresentados possuem $n=7$

* $p < 0.05$ vs 0 mM ; # $p < 0.05$ vs $10^{-5} M$

O gráfico 5 apresenta o efeito das diferentes concentrações de cálcio na medula externa do rim de camundongo.

H⁺-K⁺-ATPase medula: Diferentes concentrações de cálcio

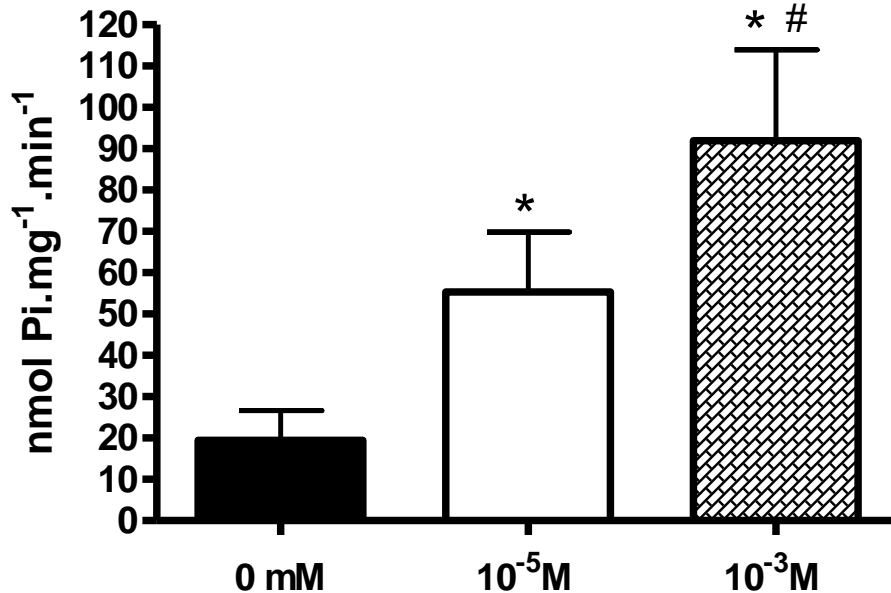


Gráfico 5: Atividade específica da H⁺-K⁺-ATPase sensível a Schering 28080 (5x10⁻⁵M) na medula externa do rim de camundongo expressa em nMPi.mg-1.min-1, frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular. Todos os grupos apresentados possuem n= 7

* $p < 0.05$ vs 0 mM ; # $p < 0.05$ vs 10⁻⁵ M

Observa-se que a atividade da H⁺-K⁺ ATPase é sensível às mudanças nos níveis de Ca²⁺_{extra}, quanto maiores as concentrações de cálcio, maior o estímulo da bomba. No gráfico “*” indica que os valores por ele marcados são significativamente diferentes do controle e “#” indica que há diferença significativa na atividade da ATPase em concentrações de 10⁻⁵ M e 10⁻³ M.

DISCUSSÃO

O receptor sensível a cálcio medeia os efeitos do Ca^{2+} extracelular em diversos órgãos, incluindo os rins. Apesar do nome, estes receptores não são tão seletivos, apresentando também resposta para cátions divalentes, como o Magnésio (Mg^{2+}), trivalentes, como o Gadolínio (Gd^{3+}), e para proteínas com carga positiva, como a neomicina e a espermina (Brown, 1998).

Assim, iniciamos o estudo com a utilização de Gd^{3+} para descobrir se existe algum tipo de influência do receptor sensível a cálcio na atividade das $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase do rim de camundongo. Para tal experimento utilizamos um inibidor inespecífico de ATPases, o vanadato. Esse é um conhecido inibidor inespecífico das ATPases de tipo P de membrana por sua semelhança ao íon fosfato, atuando tanto na $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase quanto na $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase e na Ca^{2+} ATPase. Entretanto nestes experimentos consideramos que sua inibição tenha ocorrido sobre a atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase, pois as preparações utilizadas continham Oubaína, inibidor específico da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase. O resultado obtido, estímulo da atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPase renal por parte do CaR corrobora com os resultados obtidos de outros estudos em estômago de anfíbios e ratos (Geibel & Hebert, 2009). Por exemplo, num destes estudos foi observado que o incremento na concentração extracelular de Ca^{2+} ou a utilização do um potente agonista do CaR (Gd^{3+}), na ausência dos estimulantes extracelulares convencionais (ex. histamina), incrementou a secreção de ácido via a $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPase apical em glandulas gastricas intactas (Geibel, 2001).

Depois de usar esse inibidor inespecífico, passamos a utilizar um inibidor específico da $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase, o composto *Schering 28080*. Esse inibidor foi usado para testar a atividade desta ATPase primeiro na presença do agonista *gadolinium* e depois na presença do agonista *neomicina*. Na presença do mesmo agonista utilizado no primeiro experimento (*gadolinium*) esperava-se que houvesse também diferença significativa na atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase, com resultado mais confiável, por se utilizar um inibidor específico. O resultado foi positivo tanto no cortex como na região medular externa, e corroborou com

o experimento anterior e com os autores Brown (1998), Horisberger & Doucet (2002) e Gumz (2010).

Para concluir sobre o estímulo do CaR testamos também o agonista *neomicina*, que assim como o Gd^{3+} deveria estimular a atividade da H^+-K^+ -ATPase, dessa forma teríamos certeza da imparcialidade dos testes. Os resultados mais uma vez foram favoráveis, observamos incremento significativo na atividade da H^+-K^+ -ATPase sensível a *Schering* 28080 ($5 \times 10^{-5}M$), tanto na região cortical como na medular externa do rim de camundongo.

Visto que no protocolo experimental foi utilizado o composto ouabaína, podemos esclarecer que a atividade ATPásica sensível ao composto *Schering* 28080 corresponde á atividade da isoforma 1 da H^+-K^+ ATPase, também conhecida como isoforma tipo gástrica. De acordo com Gumz e col. (2010), esta isoforma se caracteriza pela sua alta sensibilidade ao composto *Schering* e a sua insensibilidade a ouabaína.

Renkema e colaboradores (2009) utilizando diferentes concentrações de Ca^{2+} extracelular demonstraram que o pH urinário é alterado por estímulo do CaR. Assim, a fim de continuar testando a influencia do Receptor Sensível a Cálcio sobre a H^+-K^+ -ATPase, testamos a atividade da H^+-K^+ -ATPase em diferentes concentrações de cálcio. Tanto no córtex quanto na medula observamos significativo aumento na atividade da H^+-K^+ -ATPase, atividade que se deve essencialmente ao estímulo do CaR (Brown, 1998; El-Hajj, 1998; Kurokawa, 1994; Hebert, 1996).

Em resumo, os resultados discutidos acima nos permitem afirmar que:

- 1) A preparação utilizada apresenta uma atividade significativa para H^+-K^+ ATPase tipo 1 (gástrica), tanto na região cortical como na medular externa.
- 2) O estímulo do CaR incrementou a atividade da H^+-K^+ ATPase tipo 1 (gástrica) presente tanto no cortex como na medula externa de rim de camundongo.

- 3) O aumento na concentração de $\text{Ca}^{2+}_{\text{extra}}$ estimulou de forma significativa a $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPase tipo 1 (gástrica) presente no cortex e na medula externa de rim de camundongo, provavelmente via o CaR.

CONCLUSÃO

Depois de observados todos os resultados acerca da possível influencia do Receptor Sensível a Cálcio sobre a atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase, concluímos com grande grau de confiança que houve estímulo do receptor sobre a atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase tipo 1 (gástrica) tanto no córtex quanto na medula externa de rim de camundongo.

REFERÊNCIAS

BOUMENDIL-PODEVIN, E.F. & PODEVIM, R.A. **Isolation of basolateral and brush-border membranes from the rabbit kidney cortex vesicle integrity and membrane sidedness of basolateral fraction** *Biochimica et Biophysica Acta*, 735:86-94, 1983.

BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.

BROWN, E.M.; POLLAK, M.; HEBERT, S.C. **The extracellular calcium-sensing receptor: Its role in health and disease.** *Annu. Rev. Med.*, 49:15-29, 1998.

BROWN, E.M. & McLEOD, R.J. **Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling.** *Physiological Reviews*, 81:240-297, 2001.

BROWN, D.; HIRSCH, S.; GLUCK, S. **Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney.** *J. Clin. Invest.*, 82:2114-2126, 1988.

CARUSO-NEVES, C.; SIQUEIRA, A.; ISO-COHEN, G.. LOPES, A. **Bradykinin modulates the ouabain-insensitive $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ activity from basolateral membrane of the proximal tubule.** *Biochem. et Biophys. Acta*, 1431:483-491, 1999.

CHATTOPADHYAY, N.; CHENG, I.; ROGERS, K.; RICCARDI, D.; HALL, A.; DIAZ, R.; HEBERT, SC.; SOYBEL, DI.; BROWN, EM. **Identification and localization extracelular calcium-sensing receptor in rat intestine.** *Am. J. Physiol.*, 274:G122-G130, 1998.

DAGHER, G.; THOMAS, SR.; GRIFFITHS, N.; SIAUME-PEREZ, S.; SAUTEREY, C. **Calcitonin activates an Na⁺ independent HCO₃⁻ dependent pathway in the rabbit distal convoluted tubule.** *Am. J. Physiol.*, **273**:F97-F104, 1997.

EL-HAJJ, FULEIHAN, G.; SEIFTER, J.; SCOTT, J.; BROWN, E. M. **Calcium-regulated renal calcium handling in healthy men: relationship to sodium handling.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**:2366-2372, 1998.

GARRETT, J.; CAPUANO, I.; HAMMERLAND, L.; HUNG, B. C.; BROWN, E. M.; HEBERT, S. C.; NEMETH, E. F.; FULLER, F. **Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs.** *J. Biol. Chem.*, **270**:12919-12925, 1995a.

GEIBEL JP, WAGNER CA, CAROPPO R, QURESHI I, GLOECKNER J, ET AL. **The stomach divalent ion-sensing receptor scar is a modulator of gastric acid secretion.** *J. Biol. Chem.* 276:39549–52, 2001.

GEIBEL, JP., HEBERT, S. **The Functions and Roles of the Extracellular Ca²⁺-Sensing Receptor along the Gastrointestinal Tract.** *Annu. Rev. Physiol.* **71**:205–217, 2009.

GUMZ, MICHELLE L. **The renal H⁺-K⁺ ATPases: physiology, regulation and structure.** *Am J Physiol.*, 298 F12-21, 2010.

HORISBERGER, J.D ; DOUCET, A. **Renal Ion-translocating ATPases: The P-type family.** In: SELDIN, D.W; GIEBISCH, G. (Ed). **The Kidney: Physiology and Pathophysiology.** 3ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.139-70.

HUANG, C., SINDIC, A.; HILL, C.E.; et al. **Interaction of the Ca-sensing receptor with the inwardly-rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function.** *Am. J. Physiol.*, 292:F1073-F1081, 2007.

HUANG, C., MILLER, R.T. **Regulation of renal ion transport by the calcium-sensing receptor: an update.** *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*, 16:437-443, 2007.

KINNE-SAFFRAN, E.; BEAUWENS, R.; KINNE, R. **An ATP driven proton pump in brush-border membranes from rat renal cortex.** *J. Membr. Biol.*, **64**:67-77, 1982.

KOS, CH.; KARAPLIS, A.C.; PENG, J.; HEDIGER, MA.; GOLTZMAN, D.; MOHAMMAD, KS.; GUISE, TA.; POLLAK, MR. **The calcium-sensing receptor is required for normal calcium homeostasis independent of parathyroid hormone.** *J. Clin. Invest.*, **111**:1021-1028, 2003.

KUROKAWA, K. **The kidney and calcium homeostasis.** *Kidney Int.* **44**:S97-

S105, 1994.

LEE HAMM, L. & NAKHOUL, N.L. Renal **acidification**. In **Brenner and Rector's The Kidney**. 8^a. Editado por Barry M. Brenner. Capítulo 9, Ed. Saunders, 2008.

LEVINE, D.Z.; VANDORPE, D.; IACOVITTI, M. **Luminal chloride modulates rat distal tubule bidirectional bicarbonate flux in vivo**. *J. Clin. Invest.*, **85**:1793-1798, 1990.

MELLO AIRES, M. & MALNIC, G. Sodium in renal tubular acidification kinetics. *Am. J. Physiol.*, **236**:F434-41, 1979.

MELLO-AIRES M, MALNIC G. **Distal tubule bicarbonate transport**. *J Nephrol*. Mar-Apr;15 Suppl 5:S97-111. Review, 2002.

MURER, H.; HOPFER, V.; KINNE, R. **Sodium-proton antiport in brush-border membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney**. *Biochem. J.*, **154**:597-614, 1976.

RICCARDI, D.; LEE, WS.; LEE, K.; SEGRE, G. V.; BROWN, EM.; HEBERT, S. C. **Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney**. *Am. J. Physiol.*, **271**:F951-F956, 1996.

RUAT, M.; MOLLIVER, M.; SNOWMAN, A.; SNYDER S. H. **Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:3161-3165, 1995.

SANTOS, P.; FREITAS, F.; MENDES, J.; TARARTHUCH, A.L.; FERNANDEZ, R. **Modulation of proton ATPase activity in MDCK-C11 cells**. *Can J Physiol Pharmacol*, 87(9):653-665, 2009.

SCHUSTER, V.L. **Function and regulation of collecting duct intercalated cells**. *Annu. Rev. Physiol.*, **55**:267-288, 1993.

SUGIMOTO, T.; BROWN, E. M. **Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells**. *J. Bone Miner. Res.*, **13**:1530-1538, 1998.

ULATE, G.; FERNANDEZ, R.; MALNIC, G. **Effect of bafilomycin on proximal bicarbonate absorption in the rat**. *Brazilian J. Med. Res.*, **26**:773-777, 1993.

WAGNER CA, FINBERG KE, BRETON S, MARSHANSKY V, BROWN D, GEIBEL JP: **Renal vacuolar H⁺-ATPase**. *Physiol Rev* **84**:1263-1314, 2004.

WINGO, CHARLES S. AND SMOLKA, ADAM J. **Function and structure of H-K-ATPase in the kidney** *Am J Physiol Renal Physiol*; 269: F1-F16; 1995.

YAMAGUCHI, T.; CHATTOPADHYAY, N.; KIFOR, O.; BUTTERS, R. R. Jr.; SUGIMOTO, T.; BROWN, E. M. **Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells.** *J. Bone Miner. Res.*, **13**:1530-1538, 1998.