

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO AUGUSTO MALAVAZZI CASARE

INFLUÊNCIA DO RECEPTOR EXTRACELULAR SENSÍVEL A CÁLCIO  
(CAR) SOBRE A ATIVIDADE DAS H<sup>+</sup>-ATPASES RENAIIS

CURITIBA  
2011

Fernando Augusto Malavazzi Casare

**Influência do Receptor extracelular Sensível a Cálcio (CaR) sobre a  
atividade das H<sup>+</sup>-ATPases renais**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez

CURITIBA  
2011

“A bondade deve estar ligada ao saber. A simples bondade pouco adianta; é o que tenho constatado.”

Mahatma Gandhi

## **Agradecimentos**

Inicialmente a Deus pelos dons concedidos, pois sem eles nada disso seria possível.

A família pelo apoio ao longo dos anos, sempre incentivando meu crescimento.

Aos amigos pelas palavras de incentivo e momentos de descontração.

Aos mestres que tive durante esse período, não somente aqueles intitulados como tal, mas sim aqueles que me ensinaram algo nesta caminhada.

Aos colegas do setor científico que sabem como poucos a dedicação e os sentimentos que nutrimos pelas pesquisas.

Agradeço a todos que de alguma forma participaram e auxiliaram na realização desse projeto, são tantos que prefiro não citar nomes para não esquecer alguém.

Não poderia me esquecer também daqueles que mesmo não sendo humanos contribuíram, contribuem e contribuirão para muitas pesquisas, aos animais que por mais passageira que seja suas contribuições para este trabalho sempre serão lembrados com carinho.

Um muito obrigado a todos do Laboratório de Fisiologia Renal da UFPR por esses anos maravilhosos em suas companhias. Em especial para o meu orientador, Prof. Ricardo Fernandez Perez que para mim também é um grande mestre. Obrigado Professor.

A todos muito obrigado.

## RESUMO

Os rins são órgãos importantes na manutenção da homeostase hidro-eletrolítica e na regulação do equilíbrio ácido-base. Nos últimos anos estudos demonstraram que o receptor extracelular sensível à  $\text{Ca}^{2+}$  (CaR) está presente em diversos segmentos do néfron, desde o túbulo proximal ao ducto coletor, assim como em outros órgãos. O número de estudos relacionados a esses receptores vêm demonstrando que o mesmo está relacionado ao controle da homeostase mineral e regulação na secreção de hormônios calciotróficos clássicos, como: o PTH, a Calcitonina e  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ , assim como no controle da secreção gástrica. Resultados recentes sugerem que o cálcio extracelular modula a secreção de prótons independente de  $\text{Na}^+$  em células intercalares do ducto coletor cortical e medular externo em camundongos. O objetivo geral deste projeto foi investigar a interação do CaR com o transporte de prótons através da  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo vacuolar ( $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>) e da  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase presentes no rim de camundongo. A determinação bioquímica da atividade destas  $\text{H}^+$ -ATPases foi realizada utilizando frações parcialmente purificadas de membrana plasmática de córtex e medula externa de rim de camundongo, obtidas seguindo um protocolo modificado a partir do empregado por Boumendil-Podevin (1983) e Caruso-Neves (1999). O fosfato liberado na reação foi quantificado através de reação colorimétrica adaptada da metodologia descrita por Fiske e Subbarow. Este método baseia-se em cálculos envolvendo a diferença entre o Pi liberado na ausência e na presença de inibidores específicos das  $\text{H}^+$ -ATPases, Bafilomicina  $10^{-7}\text{M}$  e Concanamicina  $10^{-8}\text{M}$  para  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> e Schering 28080  $10^{-5}\text{M}$  e Orto-Vanadato  $10^{-3}\text{M}$  para  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. A atividade ATPásica é expressa em  $\text{nmol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . A atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>, tanto da região cortical quanto medular externa, foi estimulada de forma significativa ao incrementar a concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , apresentando uma resposta dose-dependente. Assim como para a  $\text{H}^+$ -ATPase, a atividade da  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase do tipo gástrico também demonstrou-se sensível às alterações da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . Quando o CaR foi estimulado pelos agonistas  $\text{Gd}^{3+}$   $3\times 10^{-4}\text{M}$  ou Neomicina  $2\times 10^{-4}\text{M}$  também ocorreu estímulo na atividade das  $\text{H}^+$ -ATPases, tanto na região cortical quanto na região medular externa. Na região cortical a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> foi também estimulada de forma significativa por Angiotensina II  $10^{-9}\text{M}$ , sendo que o estímulo do CaR na presença da Angiotensina potencializou significativamente o efeito sobre a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>, sugerindo interação nas vias de sinalização intracelular envolvidas. Estes resultados nos permitem concluir que o CaR atua na secreção de prótons pelos túbulos renais, estimulando a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> e da isoforma gástrica da  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase localizadas na membrana plasmática dos segmentos tubulares da região cortical e medular externa do rim de camundongos.

Palavras-Chave: Receptor extracelular sensível a cálcio; CaR;  $\text{H}^+$ -ATPase;  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase; Angiotensina II.

## ABSTRACT

The kidneys are important organs in the maintenance of fluid and electrolyte homeostasis and in the regulation of acid-base balance. Recent studies have shown the presence of an extracellular calcium sensing receptor (CaR) in various nephron segments, from the proximal tubule to collecting duct, as in other organs. Recently, has been increasing the number of studies linking these receptors to the control of mineral homeostasis, regulating the secretion of classic calciotropic hormones: PTH, calcitonin, and 1,25 (OH) 2 D3, as well as controlling gastric acid secretion. Recent results suggest that extracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}_o$ ) modulate  $\text{Na}^+$  independent proton secretion in intercalated cells of mouse cortical collecting duct and outer medullary collecting duct. The goal of this project was to investigate the interaction of CaR with the transport of protons through the vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase ( $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>) and  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase present in mouse kidney. The determination of biochemical activity of these  $\text{H}^+$ -ATPase was performed using fractions partially purified of plasma membrane from the cortex and outer medulla of mice kidneys, obtained following a protocol modified from the employee by Boumendil-Podevin (1983) and Caruso-Neves (1999). The phosphate released in the reaction was quantified with a colorimetric reaction adapted from the method described by Fiske and Subbarow. This method is based on calculations involving the difference between the Pi liberated in the absence and presence of specific inhibitors of  $\text{H}^+$ -ATPases,  $10^{-7}\text{M}$  bafilomycin and  $10^{-8}\text{M}$  concanamycin for  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> and  $10^{-5}\text{M}$  Schering 28080 and  $10^{-3}\text{M}$  ortho-vanadate for  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. ATPase activity is expressed in  $\text{nmol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . The  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> activity from cortical and outer medullary region was significantly stimulated by increasing the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, showing a dose-dependent response. As for the  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> activity, gastric  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase also shown to be sensitive to changes in extracellular calcium concentration. When the CaR was stimulated with agonists such as  $3\times 10^{-4}\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  and  $2\times 10^{-4}\text{M}$  neomycin was also observed a stimulation of these proton ATPases, both in the cortex as in the outer medulla. In the cortex,  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> activity was significantly stimulated by  $10^{-9}\text{M}$  angiotensin II, and the stimulation of the CaR in the presence of angiotensin potentiated significantly the effect on  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> activity, suggesting an interaction in the intracellular signaling pathways involved. These results allow us to conclude that the CaR acts on proton secretion by renal tubules, stimulating the activity of  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> and gastric  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase localized in the plasma membrane of cortical and outer medullary tubular segments of mice kidney.

Key-words: Calcium sensing receptor; CaR;  $\text{H}^+$ -ATPase;  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase; Angiotensin II.

## Lista de Abreviações

AA	Aminoácidos
ADH	Hormônio Antidiurético ou Vasopressina
AMPC	AMP cíclico
Ang. II	Hormônio Angiotensina II
AQP	Aquaporinas
AQP2	Aquaporinas tipo 2
CaR	Receptor extracelular sensível a cálcio
Ca <sup>2+</sup> <sub>o</sub>	Cálcio Extracelular
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	Cálcio Intracelular
cDNA	DNA complementar
DCC	Ducto Coletor Cortical
DCMI	Ducto Coletor Medular Interno
FHH	Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar
Gd <sup>3+</sup>	Gadólíneo
H <sup>+</sup>	Próton
H <sup>+</sup> -ATPase <sub>v</sub>	H <sup>+</sup> -ATPase vacuolar
HKα1	H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase gástrica
HKα2	H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase colônica
IC	Células Intercalares
ICα	Células Intercalares alfa
ICβ	Células Intercalares beta
IP <sub>3</sub>	Inositol Trifosfato
LLC-PK1	<i>Lilly Laboratories Cell – Porcine Kidneys</i>
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
mGluR	Receptor metabotrópico para glutamato
Neom.	Neomicina
NHSPT	Hiperparatireoidismo Neonatal Severo
Pi	Fosfato
PLC	Fosfolipase C
PCR	Reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction)
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil Fluorito
PTH	Hormônio Paratireoideo ou Paratormônio
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
TAL	ramo espesso da alça de Henle (thick ascending limb)
cTAL	ramo espesso cortical alça Henle (cortical thick ascending limb)
Vitamina D	Dihidroxicálciferol - 1,25(OH) <sub>2</sub> D

## SUMÁRIO

Introdução .....	5
Rim e suas funções no equilíbrio ácido-base do organismo .....	5
Fatores Homeostáticos – Papel do cálcio intracelular .....	6
Cálcio extracelular – Papel do CaR ( <i>calcium sensing receptor</i> ) .....	8
Estrutura do Receptor Sensível a Cálcio - CaR .....	10
Mecanismo de ação do CaR: .....	12
CaR e o Rim.....	12
Túbulo distal convoluto – Ducto coletor: .....	17
Justificativa e Objetivos .....	20
Materiais e Métodos .....	22
Obtenção de membranas plasmáticas renais: .....	22
1) Dosagem da concentração de proteínas: .....	23
2) Determinação bioquímica da atividade das H <sup>+</sup> ATPases:.....	23
Análise Estatística: .....	27
Resultados .....	28
Concentração extracelular de Cálcio e CaR .....	28
Agonistas de CaR .....	30
H <sup>+</sup> -ATPase e Hormônios .....	33
Discussão.....	35
CaR e Hormônios.....	41
Conclusão .....	43
Bibliografia.....	44



## INTRODUÇÃO

### Rim e suas funções no equilíbrio ácido-base do organismo

Os rins são órgãos vitais para os seres vivos por sua importante contribuição na manutenção da homeostase do meio interno. Entre suas funções, podemos destacar: a osmorregulação, controle da pressão arterial, equilíbrio ácido-base, controle de eletrólitos e excreção de substâncias, sejam elas endógenas, provenientes do metabolismo, ou exógenas, provenientes do ambiente (Mello-Aires, 2008).

A manutenção da concentração de prótons ( $H^+$ ) nas células e fluidos corporais em níveis normais é essencial para o correto funcionamento de vários processos celulares. O papel do rim na homeostase ácido-base consiste basicamente na eliminação diária de uma quantidade de ácido equivalente aos ácidos fixos produzidos pelo metabolismo e a reabsorção do bicarbonato filtrado. Ambos os processos são realizados através da secreção de íons  $H^+$  pela membrana apical das células tubulares renais (Moe & Huang, 2006). O trocador  $Na^+/H^+$  é o principal mecanismo celular para secreção tubular de  $H^+$ , porém há também mecanismos independentes de sódio para esta função, como a  $H^+$ -ATPase vacuolar ( $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>) e a  $H^+/K^+$ -ATPase (Wagner, 2009). A cada  $H^+$  secretado para a luz do túbulo um íon de bicarbonato é reabsorvido, mantendo-se a homeostase ácido-base do organismo. Em mamíferos, os segmentos distais do néfron são responsáveis pela reabsorção e secreção dos íons bicarbonato, controlando o equilíbrio ácido-base do meio interno. Este equilíbrio depende basicamente de dois mecanismos bem estudados e apresentados principalmente em ratos, camundongos e coelhos, constituindo: um mecanismo de secreção de prótons para a luz tubular, realizado principalmente por bombas ATPásicas (Hinton, 2009), e um mecanismo de secreção de bicarbonato através de trocadores  $Cl^-/HCO_3^-$  que secretam  $HCO_3^-$  enquanto absorvem  $Cl^-$  (Levine, 1990; Mello-Aires & Malnic, 2002). Ambos os processos são independentes de sódio, sendo facilitados pela anidrase carbônica. O  $CO_2$  por ter alto coeficiente de dissolução em água transforma-se em ácido carbônico ( $H_2CO_3$ ), que é dissociado em  $H^+$  e  $HCO_3^-$  pela ação enzimática da anidrase carbônica do tipo II nas reações extracelulares ou IV nas reações intracelulares. (Wagner, 2009).

As células responsáveis por estes processos de transporte nos segmentos distais do néfron são as células intercalares (IC), aqui divididas em dois subtipos, o subtipo *alfa* (IC $\alpha$ ) e o subtipo *beta* (IC $\beta$ ). Cada subtipo apresenta morfologia distinta e desempenham diferentes funções (Schuster, 1993 e Brown, 1988). As IC $\alpha$  são secretoras de H $^+$  possuindo tanto a H $^+$ -ATPase<sub>v</sub> quanto a H $^+$ /K $^+$  - ATPase inseridas na membrana apical, e ainda apresentam trocadores HCO $_3^-$ /Cl $^-$  de banda 3, dispostos em sua face basolateral. Já as células IC $\beta$  realizam secreção de HCO $_3^-$  e reabsorção do Cl $^-$  através dos trocadores HCO $_3^-$ /Cl $^-$  presentes na face apical da célula. A IC $\beta$  também possui H $^+$ -ATPase<sub>v</sub>, porém estas se encontram inseridas em sua membrana basolateral (Schuster, 1993; Breton, 2000). Estudos com ratos, coelhos e camundongos demonstram que os trocadores encontrados nas células IC $\alpha$  diferem-se dos encontrados nas células IC $\beta$  (Tsuganezawa, 2001; Kim, 2002). Estudos desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisadores salientaram que a proporção de cada um dos subtipos das células intercalares difere ao longo dos ductos coletores, variando de espécie para espécie e de acordo com a dieta de cada indivíduo, mecanismos para adequar sua distribuição e polaridade para a manutenção da homeostase ácido-base do organismo. (Kim, 1999; Madsen, 1991; Wagner, 2009).

#### Fatores Homeostáticos – Papel do cálcio intracelular

Diversos fatores estão envolvidos com a regulação da atividade das H $^+$ -ATPases e trocadores Na $^+$ /H $^+$  ao longo do néfron, entre os quais se destacam os fatores eletrolíticos e alguns hormônios. Entre os fatores eletrolíticos estão: oscilações do equilíbrio ácido-base e alterações nas concentrações dos íons Cl $^-$  e K $^+$  e a atividade das bombas ATPásicas, que alteram o gradiente eletroquímico. Entre os hormonais estão: aldosterona, vasopressina, também conhecido como hormônio antidiurético (ADH), e a calcitonina (Khadouri, 1989; Palmer & Alpern, 1997; Bailey, 1998; Silver, 2000; Fernandez, 1997, Fernandez & Malnic, 1998; Levine, 1994; Winter, 2004; Barreto–Chaves & Mello-Aires, 1997). Todos estes fatores podem induzir alterações na concentração intracelular de Ca $^{2+}$  (Ca $^{2+}$ <sub>i</sub>), e através desta regular a atividade da H $^+$ -ATPase. Apesar dos estudos com células *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) terem apresentado aumento na concentração de Ca $^{2+}$ <sub>i</sub>, frente

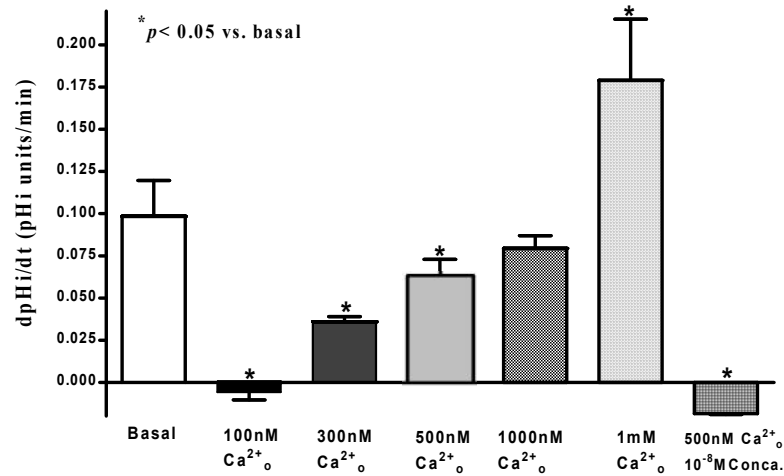
aos hormônios vasopressina e angiotensina, o mesmo ainda não foi demonstrado em tecidos *in-vivo* (Oliveira-Souza, 2000 e 2004). Os mecanismos e vias de sinalização pelos quais estes hormônios desencadeiam o aumento da concentração de  $Ca^{2+}_i$  ainda não foram completamente caracterizados.

Alguns estudos demonstraram que há relação direta entre a concentração de  $Ca^{2+}_i$  e a extrusão de prótons em diferentes tipos celulares. Em fibroblastos, linfócitos T, e células pituitárias, o aumento de  $Ca^{2+}_i$  provoca alcalinização intracelular pelo estímulo do trocador  $Na^+/H^+$  (Poch, 1993; Villereal, 1981; Rosoff & Cantley, 1985; Tornquist & Tashjian, 1991). Em células não pigmentadas do epitélio ciliar de coelho o aumento da concentração de  $Ca^{2+}_i$  aumenta a atividade das  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> presentes na membrana plasmática das mesmas (Hou, 2001).

Estudos utilizando cultura de células primárias a partir do ducto coletor medular interno (DCMI) de ratos demonstraram que o aumento do  $Ca^{2+}_i$  e a alcalinização intracelular estão relacionados com as alterações da condutância e permeabilidade iônica destas células (Slotki, 1989). Outro estudo com células *Lilly Laboratories Cell – Porcine Kidneys* (LLC-PK1), que apresentam funções semelhantes às células dos túbulos proximais demonstrou que a ativação do trocador  $Na^+/H^+$  das mesmas também leva a alcalinização intracelular (Burns, 1991).

No ano de 2005, Fernandez e colaboradores trabalhando com segmentos de Ducto Coletor Cortical (DCC) isolado de camundongos, submeteram células intercalares a ionomicina 2 $\mu$ M (um ionóforo de cálcio que aumenta a permeabilidade da membrana a esse íon), demonstraram que alterações nas concentrações de  $Ca^{2+}_i$  têm influência sobre a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> presentes nas mesmas. (Figura 1). No mesmo estudo demonstrou-se também que a acidificação citoplasmática influencia a concentração de  $Ca^{2+}_i$ , através da liberação das reservas do Retículo Sarcoplasmático e o influxo de íons cálcio.

## Recuperação de pHi por mecanismos independentes de Na<sup>+</sup> em IC de camundongos



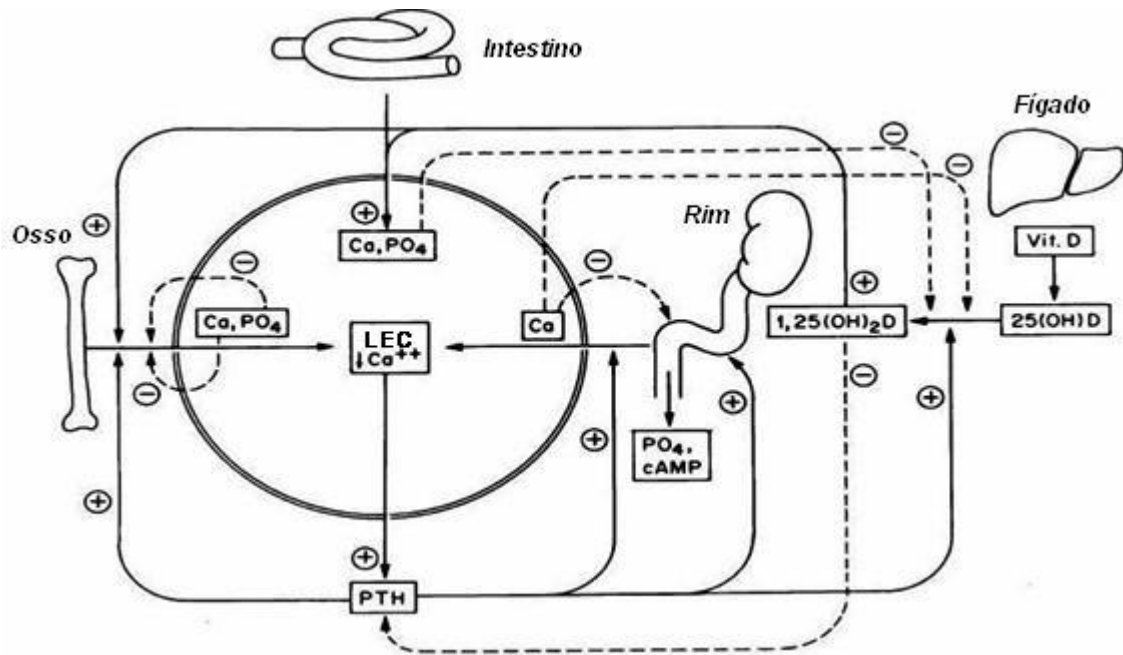
**Figura 1:** A recuperação de pHi foi alterada ao modificar as concentrações de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, e esta alteração pode ser totalmente anulada pelo inibidor de H<sup>+</sup>-ATPase, concanamicina (10<sup>-8</sup>M), (Fernandez, 2005).

### Cálcio extracelular – Papel do CaR (*calcium sensing receptor*)

As oscilações na concentração de cálcio extracelular (Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>) ou cálcio livre são constantemente monitoradas por vários tipos de células especializadas nesta função, e encontram-se dispostas em diferentes regiões e tecidos do organismo, como: células C da tireóide, algumas células tubulares renais e osteoblastos do tecido ósseo, todas estas possuem um importante papel na homeostase de cálcio livre no organismo. (Brown & McLeod, 2001)

O controle de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> cuja concentração é de aproximadamente 1mM, depende principalmente de três fatores: reabsorção renal, deposição no tecido ósseo e absorção intestinal, estes fatores encontram-se regulados por hormônios chamados de calcitróficos, entre eles estão: paratormônio (PTH), e calcitonina.

O PTH aumenta a reabsorção de cálcio renal, mobiliza o cálcio depositado nos ossos e estimula a formação de 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Vitamina D), aumentando a absorção de cálcio intestinal. A calcitonina exerce efeito contrário ao PTH, atuando principalmente sobre os osteoclastos de forma a inibir a reabsorção óssea (Brown & McLeod, 2001). Esses processos aparecem esquematizados abaixo, na figura 2.



**Figura 2:** Sistema de manutenção da Homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ . As linhas sólidas indicam a ação do PTH e da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , enquanto as linhas pontilhadas indicam a ação do  $\text{Ca}^{2+}$  e íons Pi. Abreviações:  $\text{Ca}^{++}$  = Cálcio;  $\text{PO}_4$  = fosfato; LEC = líquido extracelular; PTH = Paratormônio;  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  = Vitamina D3;  $25(\text{OH})\text{D}$  = 25-hidroxivitamina D. Os sinais de negativo indicam inibição e sinais de positivo indicam estímulo. (Retirado e modificado de Brown 1998).

A sensibilidade às alterações das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}_o$  se deve também a presença do Receptor Extracelular Sensível a Cálcio (CaR), um receptor acoplado a proteína G encontrado nas membranas plasmáticas de células sensíveis a cálcio, tais como células C da tireóide, células tubulares renais, e osteoblastos (Brown, 1993; Riccardi, 2009).

Estudos demonstram que além do controle sobre a homeostase mineral de cálcio pela regulação da secreção de hormônios calcitróficos clássicos, tais como: o PTH, a Calcitonina e a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , o próprio  $\text{Ca}^{2+}$  pode atuar como um fator regulador local ou sistêmico através do CaR. (Brown & McLeod, 2001)

Apesar do nome os receptores de CaR não são ativados única e exclusivamente por íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , também podendo ser ativado por cátions divalentes e trivalentes como Magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e Gadolínio ( $\text{Gd}^{3+}$ ) ou por proteínas com carga positiva, como a neomicina e a espermina, (Brown, 1998). Esses agonistas apesar de atuarem estimulando o CaR parecem gerar respostas

intracelulares ligeiramente diferentes quanto ao manuseio da concentração de  $Ca^{2+}_i$ , e em algumas ocasiões pode ocorrer alterações na sensibilidade do receptor, diminuindo ou aumentando as concentrações necessárias para ativação dos mesmos (Nemeth & Scarpa, 1987; Huang, 2007).

### Estrutura do Receptor Sensível a Cálcio - CaR

Os receptores de Cálcio encontram-se acoplados a proteína G de Classe III e foram inicialmente identificados e clonados a partir de células da glândula paratireóide bovina (Ward & Riccardi, 2002). A clonagem de CaR foi realizada inicialmente por Brown e seu grupo em 1993 utilizando ovócitos de *Xenopus laevis*, uma espécie de rã bastante usada nesses tipos de experimento.

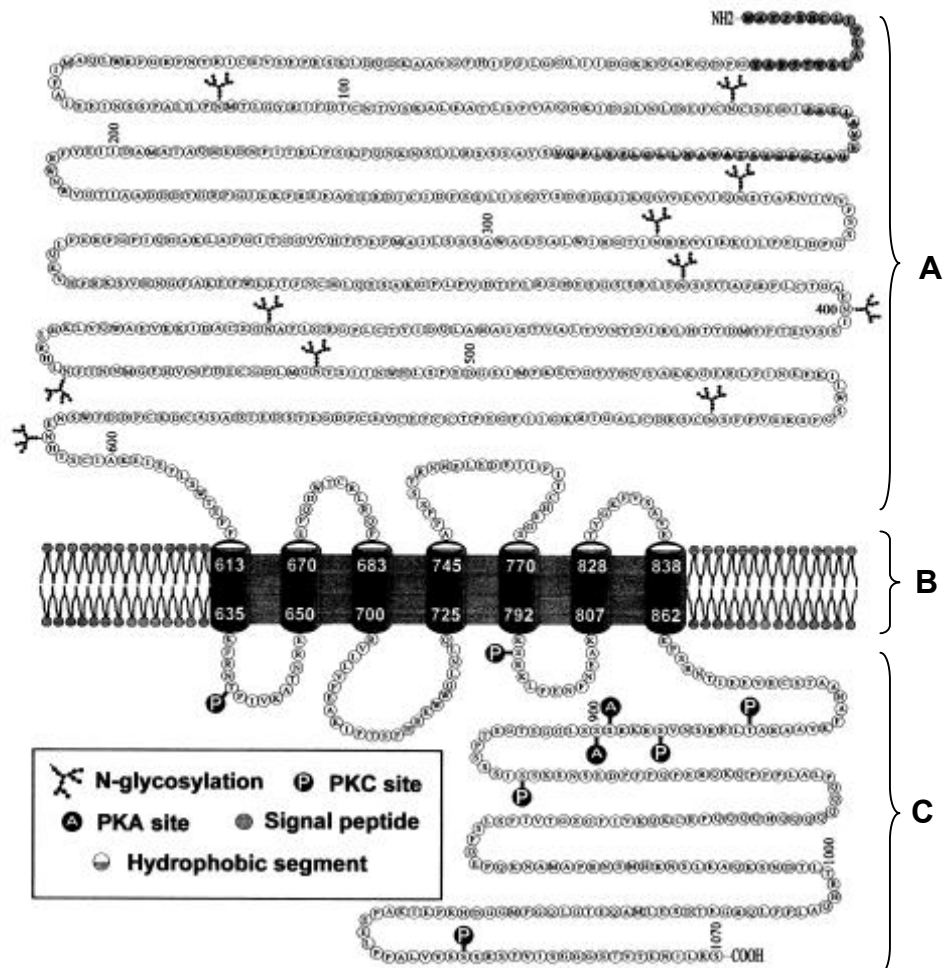
Outro pesquisador a utilizar a clonagem em *X. laevis* foi Thakker que em 1998 que extraiu o mRNA de CaR da glândula paratireóide de bovinos e os inoculou em ovócitos de *X. laevis*, conseguindo que estes expressassem os CaR com as mesmas características e capacidade de resposta das glândulas bovinas.

A técnica de clonagem permite realizar estudos com praticamente qualquer proteína que seja expressa por uma célula, desde que se possua o mRNA da proteína desejada, ou que seu DNA complementar (cDNA) esteja disponível em bibliotecas gênicas. Os cDNAs são basicamente fragmentos de DNA sintetizados a partir dos mRNA, por isso são constituídos apenas pelos éxons do gene que o transcreve (Riccardi & Gamba, 1999; Brown, 1998). Través desta técnica é possível também clonar-se apenas determinadas regiões de uma proteína, por exemplo, clonar apenas a região carboxiterminal do CaR (Huang & Miller, 2007).

Utilizando-se a técnica de clonagem por cDNA foi possível identificar a expressão de CaR em diversos tecidos e espécies, tais como: glândulas paratireóides humanas (Garrett, 1995a); rins de ratos, coelhos, e humanos (Riccardi, 1996; 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). O CaR encontrado nas diferentes espécies apresenta conservação da sua cadeia de aminoácidos chegando a apresentar até 93% de identidade (Thakker, 1998). Tal semelhança ressalta a importância deste receptor para o organismo e garante que respondam de forma

semelhante aos mesmos agonistas, independente da espécie utilizada para a clonagem do CaR.

A estrutura do CaR aparece na figura 3 dividida em três domínios:



**Figura 3:** Representação da sequência dos aminoácidos encontrados em CaR de coelho, salientando glicosilações, PKAs e PKCs. (Retirado e modificado de Butters, 1997)

A) **Domínio extracelular:** com aproximadamente 613 aminoácidos (AA) é também a porção aminoterminal, apresenta sítios de glicosilação. A glicosilação desses sítios parece ser essencial para as funções de endereçamento, conformação e ativação do CaR. (Fan, 1997);

B) **Domínio central ou transmembrana:** com 250 AAs formam sete  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas, que ficam presas a membrana plasmática sendo esta uma característica da superfamília de receptores acoplados a proteína G;

C) **Domínio citosólico:** com aproximadamente 222 AAs é nele que se encontra porção carboxiterminal, contêm várias sequências de AAs que podem desencadear processos de fosforilação, através da Proteína Quinase A (PKA) ou da Proteína Quinase C (PKC). (Thakker, 1998)

Comparando a estrutura do CaR com outros membros da superfamília dos receptores acoplados a proteína G praticamente não se observa homologia entre eles, exceto pelo receptor metabotrópico para glutamato (mGluR), que apresenta identidade entre 23 e 27% em relação ao CaR (Brown, 1993; Masu, 1991).

#### Mecanismo de ação do CaR:

O estímulo do CaR pode ativar diferentes vias de sinalização intracelular e produzir tanto respostas intracelulares quanto efeitos biológicos diferentes, variando de acordo com a célula estimulada (Brown, 1998; Ward, 2004). Entre as respostas intracelulares está a cascata da proteína G, que pode atuar via ativação da subunidade G inibitória, Gi, que causa a inibição da adenilato ciclase e diminui as concentrações de AMP cíclico (AMPC) na célula. Outra possível resposta é ativação da fosfolipase C (PLC) que cliva os fosfolípidios de membrana transformando-os em Inositol-Trifosfato (IP<sub>3</sub>), causando liberação do Ca<sup>2+</sup> armazenado nos retículos sarcoplasmáticos da célula e grande influxo de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>, aumentando a concentração de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>. O aumento nas concentrações de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> ativa a PKC que fosforila as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), e ativação da família SRC das tirosina-quinases. Existem ainda outras vias de ativação e cascatas intracelulares possíveis para o CaR, dependendo da célula em que ele se encontra. (Ward, 2004)

#### CaR e o Rim

Em condições fisiológicas aproximadamente 60% do Ca<sup>2+</sup> plasmático é filtrado nos capilares glomerulares tanto na forma livre (ionizada), como ligado a proteínas (Friedman & Gesek, 1995; Kurokawa, 1994). Entretanto, para evitar a perda de cálcio na urina, o mesmo é reabsorvido de forma seletiva nos túbulos proximais e ramo espesso da alça de Henle (TAL), num processo relacionado ao transporte de Na<sup>+</sup>. A excreção urinária de cálcio apresenta relação linear com a sua concentração plasmática (Friedman & Gesek, 1995).

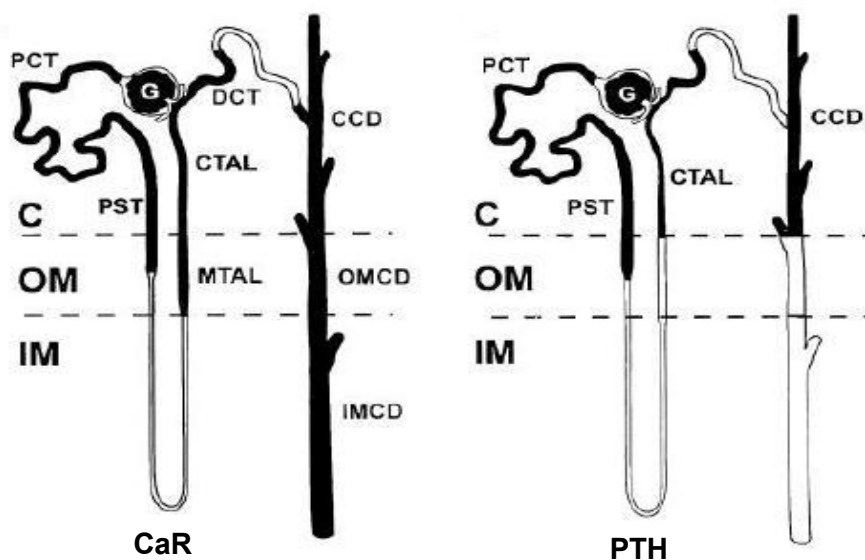


Tanto o PTH como a vitamina D exercem controle sobre a reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$ , entretanto, na ausência destes hormônios a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  torna-se bastante reduzida, mas a relação linear entre sua concentração plasmática e a excreção urinária persiste. Este fato indica a existência de um terceiro mecanismo calciotrófico, provavelmente o próprio  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular atue como tal, via CaR (Kurokawa, 1994; Hebert, 1996). Uma evidencia em favor desta hipótese foi o estudo realizado por El-Hajj no ano de 1998, demonstrando que em humanos a concentração de PTH e a excreção dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  são particularmente sensíveis às variações da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A idéia de que o CaR regula a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  ao longo do rim é especialmente apoiada pela evidencia obtida por estudos com indivíduos heterozigotos, portadores de mutação gênica causadora de insensibilidade ou perda da função do CaR. Esta mutação faz com que aumente a concentração plasmática de Cálcio necessária para suprimir a secreção de PTH (Bai, 1996; Pearce, 1996; Pollak, 1993). Era esperado que a mutação afetasse apenas a paratireóide, fazendo com que os rins simplesmente excretassem mais  $\text{Ca}^{2+}$ , entretanto, o quadro observado era o de hipocalciúria. Esta patologia ficou conhecida como Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (FHH) (Ward & Riccardi, 2002 e Kos, 2003). Quando esta mutação ocorre em homozigose, gera uma patologia conhecida como Hiperparatireoidismo Neonatal Severo (NHSPT), uma quadro muito mais grave. Estudos sobre a NHSPT eram impossíveis pois os modelos animais não sobreviviam por mais de duas semanas, até que grupo de Kos em 2003 desenvolveram uma linhagem de camundongos *knockout* para o gene do PTH ( $\text{PTH}^{-/-}$ ) que sobreviviam a patologia (Ho, 1995; Kos, 2003).

Fora o papel do CaR no controle de cálcio sistêmico através dos rins, sua expressão em diversos órgãos envolvidos na regulação do conteúdo de solutos no organismo de animais aquáticos indicam participação e controle sobre o transporte de  $\text{NaCl}$  além da regulação do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Dados obtidos na alça de Henle de mamífero reforçam esta idéia (Huang & Miller, 2007).

Os grupos de Riccardi em 1996 e Yang em 1997 utilizando a técnica de hibridização *in situ* e a reação em cadeia da polimerase (PCR), estudaram a distribuição do mRNA do CaR e do receptor para PTH (PTH/PTHrP) ao longo do néfron de rato. Ambos receptores foram detectados em co-expressão no glomérulo, túbulo proximal convoluto, proximal reto, porção cortical do ramo espesso da alça de Henle, túbulo distal convoluto e ducto coletor cortical. Os resultados destes estudos podem ser vistos na figura 4. O mesmo estudo demonstra ainda que na porção medular do ramo espesso da alça de Henle e do ducto coletor apenas o CaR parece ser expresso.



**Figura 4:** Representação esquemática da expressão de mRNA para CaR e PTH ao longo do néfron. Sendo: **G** – Glomérulo, **PCT** - Túbulo Proximal Cortical, **PST** – Túbulo Proximal Reto, **TAL** - Ramo Espesso Alça Henle; **DCT** – Túbulo convoluto distal, **CCD** – Ducto Coletor Cortical, **OMCD** – Ducto Coletor Medular Externo, **IMCD** – Ducto Coletor Medular Interno. As regiões do rim aparecem como: **C** - Cortex, **OM** - Medula Externa; **IM** - Medula Interna. (Imagens retiradas de Riccardi, 1996)

Estudos de imunolocalização em rim de rato têm revelado a expressão do CaR ao longo do néfron, o glomérulo expressa poucos CaR, mas há regiões que sua expressão é mais intensa, como: membrana apical do túbulo proximal e ducto coletor medular interno, membrana basolateral do ramo ascendente espesso, e de forma difusa ao longo do túbulo distal convoluto (Riccardi, 1998). No caso das  $IC\alpha$  do ducto coletor cortical a expressão varia entre apical, basolateral ou ambas. Tanto

a expressão quanto a localização diferenciadas do CaR ao longo do néfron apontam para diversidade de suas funções fisiológicas. (Ward & Riccardi, 2002; Brown & McLeod, 2001; Riccardi & Gamba, 1999).

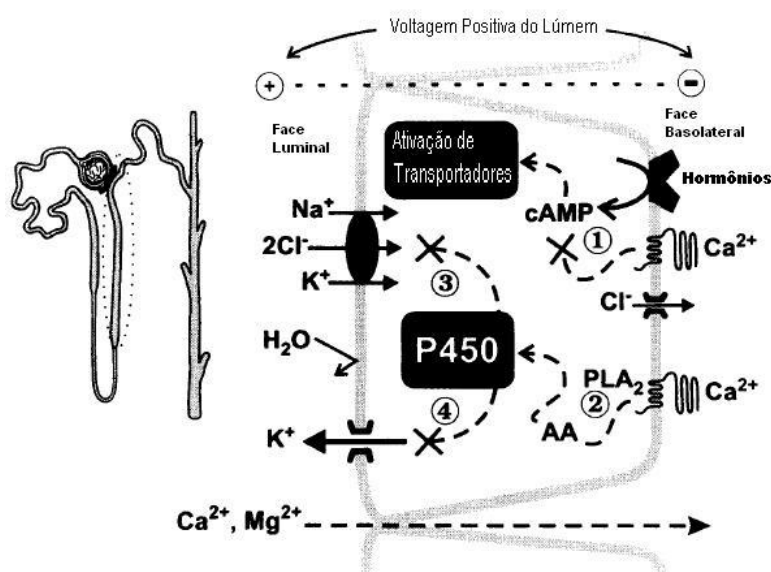
A função do CaR nos diferentes segmentos tubulares tem sido objeto de estudo nos últimos anos, exemplo disso é a descoberta de sua relação com vários transportadores de eletrólitos e nutrientes no túbulo proximal, entre eles o cotransportador Na<sup>+</sup>/Pi do tipo IIa (Riccardi, 1996 e 1998; Murer, 2000; Okuda, 2001; Ba, 2003).

O PTH através do aumento intracelular de AMPc inibe o transportador Na<sup>+</sup>/Pi, sendo esse processo inibido pelo CaR, que diminui a perda excessiva de Pi na urina. Esta atividade inibitória do CaR através da ação mediada pela ativação da porção Gi, sendo comum nas células derivadas do túbulo distal (Arthur, 1997) e nas parafoliculares da tireóide (Tamir, 1996).

Entre as reações ligadas ao Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>, está a sua capacidade de estimular diretamente a captação de Pi dependente de Na<sup>+</sup>, como foi demonstrado por Rouse & Suki em 1985 que através de perfusão de túbulos proximais convolutos de coelho, onde observaram que a elevação da concentração de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> na solução de perfusão incrementava a reabsorção de Pi. Outros efeitos causados pelo estímulo do CaR são: a) regulação negativa na produção renal de Vitamina D (Bland, 1999); b) inibição da atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase (Okuda, 2001); c) endocitose de aquaporinas (AQP), diminuindo assim a absorção tubular de água (Huang, 2010).

No ramo espesso da alça de Henle e no ducto coletor medular interno o receptor está envolvido principalmente na regulação da reabsorção de Ca<sup>2+</sup> e água. As variações nas concentrações plasmáticas de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> podem modular diretamente o transporte de NaCl e íons minerais na alça de Henle em rato (De Rouffignac, 1994; Champigneulle, 1997). Da mesma forma as elevações da concentração de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> ou o tratamento com neomicina, inibem o transporte de Cl<sup>-</sup> no ramo espesso cortical da alça de Henle (cTAL) de rato (Jesus Ferreira & Bailly, 1998). Estes efeitos demonstram uma relação com íons divalentes e agonistas de CaR, devido à presença do CaR na membrana basolateral destas células (Riccardi, 1998), o que permite ao Ca<sup>2+</sup> reabsorvido retroalimentar a célula atenuando a reabsorção de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e prevenir a hipercalcemia (Hebert, 1997; Huang, 2010).

A ativação do CaR pode atenuar os estímulos gerados pelos hormônios PTH, ADH, glucagon e calcitonina via inibição da adenilato ciclase e estimulando a hidrólise de ATP, diminuindo a reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . (Jesus Ferreira, 1998) Outra forma de regulação exercida pelo CaR neste segmento é por meio da redução na atividade do canal de  $\text{K}^+$  apical (Wang, 1996 e 1997; Ward & Riccardi, 2002). Recentemente tem-se descrito o CaR interage e inativa o canal Kir4.1, um canal de potássio responsável pelo influxo de potássio, (canal do tipo retificador para dentro) localizado na membrana basolateral deste segmento, mais o efeito sobre o transporte transepitelial ainda não foi definido (Huang, 2007; Cha, 2011). Na figura 5 encontra-se representado um esquema resumido dos efeitos da ativação do CaR no cTAL, reduzindo a atividade do canal apical de  $\text{K}^+$  e do cotransportador  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  e determinando uma redução na reabsorção tubular de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ .



**Figura 5:** Papel do CaR na regulação do transporte de íons e na atividade dos segundos mensageiros da porção cortical do ramo espesso de Henle (Retirado de Brown, 2001).

Tem-se proposto que a elevação da concentração peritubular de  $\text{Ca}^{2+}$  no ramo espesso da alça de Henle estimularia o CaR o que diminuiria a reabsorção de  $\text{NaCl}$ , comprometendo desta forma o mecanismo de contracorrente. Este efeito diurético da hipercalcemia é favorecido pela presença do CaR na membrana apical das células do DCMI. Nesta membrana o CaR é expresso nas mesmas vesículas que as aquaporinas do tipo 2 (AQP2) (Riccardi & Gamba, 1999).

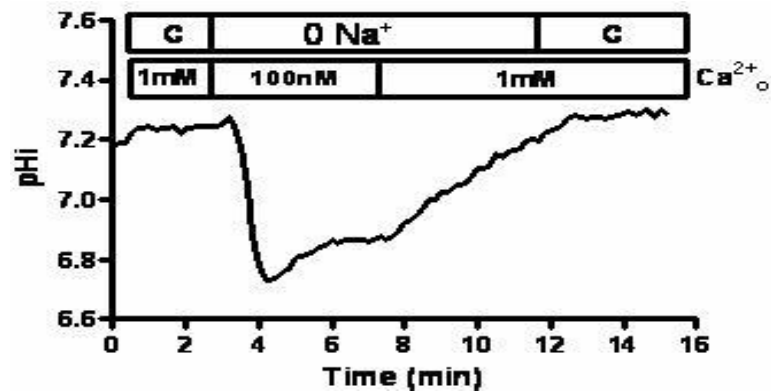
Em 1997 Sands e colaboradores demonstraram que o estímulo do CaR presente no DCMI de rato reduz o aumento de permeabilidade osmótica a água induzido pela vasopressina neste segmento. Em 1998 o mesmo grupo apresentou evidências de que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro do fluido tubular do DCMI regula a inserção apical das vesículas contendo AQP2 através do CaR, onde incrementos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  levariam a migração das mesmas para um compartimento submembrana com a conseqüente redução na reabsorção de água, resultando num mecanismo renoprotetor contra a formação de cálculos. Estes achados experimentais em ratos explicam as observações clínicas em pacientes com hipercalcemia severa ( $>14\text{mg/dl}$ ) que frequentemente apresentam diminuição anormal na capacidade de concentração urinária e, ocasionalmente, fraca diabetes insípida neurogênica (Gill & Batter, 1961; Suki, 1969). Indivíduos com mutações no CaR que inativa (Marx, 1981), ou estimulam o mesmo (Pearce, 1996) apresentam transtornos condizentes com as observações experimentais em animais descritas acima.

#### Túbulo distal convoluto – Ducto coletor:

Este segmento reabsorve de 8-10% do total de  $\text{Ca}^{2+}$  filtrado, num processo de transporte transcelular ativo que pode ser regulado independentemente da reabsorção de  $\text{Na}^+$ . Existem várias evidências de que o  $\text{Ca}^{2+}_o$  exerce efeito direto na reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  através de sua ligação ao CaR. Por exemplo, em células MDCK a exposição da membrana basolateral às concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  ou neomicina capazes de estimular o CaR, determinam inibição na reabsorção unidirecional de  $\text{Ca}^{2+}$  (Blankenship, 2001). Por outro lado, é conhecido que a calcitonina no túbulo distal convoluto estimula a reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$ , por um mecanismo dependente de  $\text{HCO}_3^-$  e independente de  $\text{Na}^+$ , num mecanismo relacionado ao aumento de AMPc (Dagher, 1997). O CaR poderia, também, ter um papel na regulação do balanço ácido-base urinário ao inibir acúmulo do AMPc induzida por calcitonina durante a hipercalcemia.

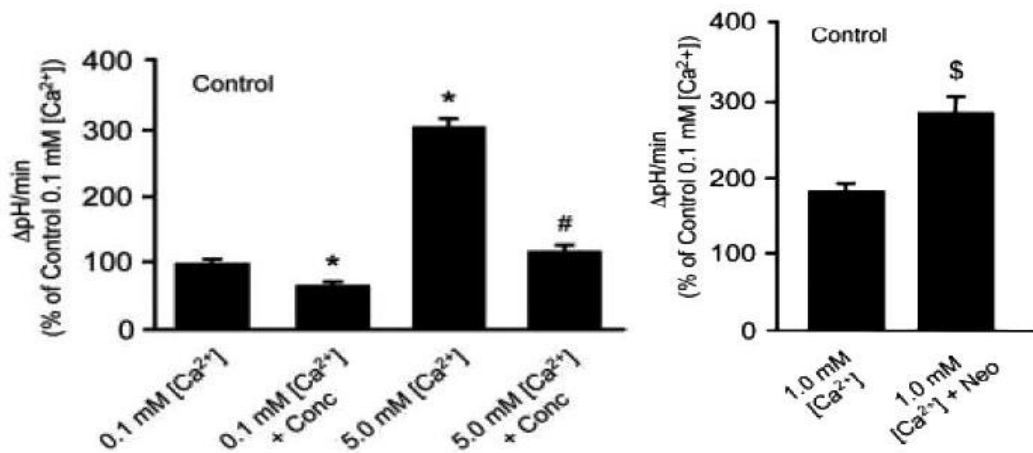
Trabalhando com DCC de camundongo, isolado e subperfundido, foi demonstrado que a recuperação do  $\text{pHi}$  independente de  $\text{Na}^+$ , atribuída a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>, aumenta significativamente quando a concentração extracelular de

$\text{Ca}^{2+}$  passa de baixa concentração (100nM) para normal (1mM) (Figura 6). Este efeito pode ser explicado pelas maiores concentrações de  $\text{Ca}^{2+}_i$  observadas durante a perfusão com soluções contendo concentrações de cálcio à 1mM, se comparadas às obtidas quando se perfunde com baixas concentrações de cálcio. Outra possibilidade talvez seja a presença do CaR na membrana das células intercalares deste segmento, que estas sejam sensíveis às alterações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}_o$ , e modulem a concentração de  $\text{Ca}^{2+}_i$  alterando a secreção de prótons nas células intercalares (Fernandez, 2005).



**Figura 6:** Registro do  $\text{pH}_i$  de célula intercalar do DCC de rim de camundongo, submetido a perfusão com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (100nM e 1mM), em ausência de sódio. (Retirado de Fernandez, 2005).

Um estudo com ducto coletor medular externo (DCME) de camundongo também demonstrou a influencia do CaR na regulação do pH urinário (Renkema, 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<sup>+</sup>-ATPase vacuolar foi estimulada tanto pelo aumento na concentração de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> quanto por neomicina 200μM, um agonista de CaR. Este resultado aparece abaixo ilustrado na figura 7.



**Figura 7:** Influência da concentração de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> e Neomicina, agonista de CaR, sobre a recuperação de pH<sub>i</sub> através da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar presente no ducto coletor medular. (retirado e adaptado de Renkema, 2009)

## JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A regulação das proteínas de transporte no epitélio tubular renal está a cargo de diversos fatores, como: concentrações de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  e de hormônios, entre eles a vasopressina, o PTH, a angiotensina II (Ang II) e a aldosterona. Estes fatores podem modular direta ou indiretamente a disposição e atividade dos transportadores nas membranas apicais e basolaterais. Recentemente demonstrou-se que os receptores sensíveis a  $\text{Ca}^{2+}$  estão presentes em diversos segmentos tubulares, desde o túbulo proximal até o ducto coletor. No caso do ducto coletor cortical o CaR está presente tanto na membrana apical quanto na basolateral das células intercalares, tal fator aponta para uma relação entre o CaR e o transporte de bicarbonato, sobre a regulação do pH urinário, um dos mecanismos de regulação de ácido-base do organismo.

Como a solubilidade de cátions divalentes na urina está relacionada com o pH urinário, a produção endógena de ácido pode aumentar a excreção urinária de  $\text{Ca}^{2+}$ , isto possibilita que o CaR exerça papel de retroalimentação na excreção de íons  $\text{H}^+$  diminuindo as chances de ocorrência de certas patologias relacionadas ao acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no organismo, como nefrolitíases ou nefrocalcinose (Riccardi & Gamba, 1999).

Alguns estudos demonstraram que além de suas funções de reabsorção tubular de sais e controle da volemia, tanto a angiotensina II como a vasopressina também estão envolvidas na regulação do transporte tubular de prótons e bicarbonato (Lee Hamm & Nakhoul, 2008), e possuem efeito estimulante sobre a extrusão de prótons, seja pelo trocador  $\text{N}^+/\text{H}^+$  ou pela  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> (Mello-Aires & Malnic, 2002; Wagner, 2001; Santos, 2009).

Nos últimos anos estudos sobre o CaR demonstraram que o cálcio extracelular está envolvido com a secreção de prótons por meio de mecanismos independentes de  $\text{Na}^+$  nas células intercalares do DCC (Fernandez, 2005) e do DCME (Renkema, 2009).



Devido às recentes descobertas envolvendo o CaR e suas funções, este trabalho foi desenvolvido tendo como principal objetivo estudar a relação entre o CaR e os mecanismos de extrusão de prótons que independem de sódio, como as H<sup>+</sup>-ATPases, principalmente nas regiões do córtex e medula externa de camundongos. Dentro deste estudo há também interesses como:

1. Estudar a relação entre ativação do CaR e atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> e da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, presentes nas regiões do córtex e da medula externa em rins de camundongo;

2. Testar se as respostas moduladas pelos hormônios ADH e angiotensina II sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>, podem ser influenciadas pelo CaR, nas regiões corticais e medulares externa em rins de camundongo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

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. Durante este estudo foi utilizado um total de 35 animais, sendo todos camundongos *swiss* adultos com peso variando entre 25 e 35 gramas. Os animais foram mantidos no biotério da própria instituição, em salas climatizadas com controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12hs, com dieta padrão livre acesso a água até o início dos experimentos.

### Obtenção de membranas plasmáticas renais:

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 de Obtenção de Homogenados Renais, adaptado de Boumendil-Podevin & Podevim em 1983 e Caruso-Neves em 1999 e segue abaixo.

Os rins de cada animal foram transferidos para placa de Petri de vidro com Solução de Separação a 4°C e pH de 7,4 (Solução de Separação: 250mM sacarose, 10mM Hepes-tris, 2mM EDTA e 1mM PMSF - Fenil-Metil-Sulfonil Fluorito) com a ajuda de uma gilete as regiões da pélvis renal e a parte da medula interna foram removidas, enquanto pequenas porções do córtex e da medula externa eram separadas e armazenadas em microtubos mantidos no gelo, contendo 800µL de solução de separação cada. A manutenção das baixas temperaturas foi importante para evitar qualquer reação ou degradação dos tecidos.

Cada amostra obtida era constituída das porções retiradas de ambos os rins de um único animal, as porções obtidas eram homogeneizadas por cerca de 1 minuto em homogeneizador para tecidos. A solução homogênea resultante era então submetida à centrifugação fracionada para a obtenção de porções de membrana parcialmente purificadas, para ser utilizada nos testes de atividade ATPásica.

A centrifugação fracionada foi feita seguindo processo abaixo:

1. O homogenado inicial foi centrifugado a 2.500 g por 15 min em 4° C, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, enquanto o sedimento que é constituído principalmente por organelas pesadas e o núcleo celular, foi descartado.

2. O sobrenadante resultante foi então centrifugado a 20.500 g por 25 min, também a 4° C, ao final desta centrifugação o sobrenadante foi descartado utilizando-se uma micropipeta, enquanto a porção do sedimento foi mantida.

3. A porção superficial e mais clara do sedimento foi então ressuspensa em 700 µL de solução tampão de sacarose a pH 7.4, (Tampão de Sacarose: 0,25M sacarose, 2mM Hepes-Tris e 1mM de PMSF).

O armazenamento das soluções contendo as frações de membranas plasmáticas foi mantida em Freezer a -20° C para a conservação das mesmas.

#### 1) Dosagem da concentração de proteínas:

Para a medida das concentrações protéicas obtidas foi utilizado o método de reação colorimétrica de Bradford (Bradford, 1976).

#### 2) Determinação bioquímica da atividade das H<sup>+</sup> ATPases:

Através de experimentos bioquímicos pode-se estimar a atividade de uma determinada ATPase, desde que se conheça a quantidade de íons fosfato (Pi) liberados pela mesma durante a reação. O protocolo utilizado para mensurar a atividade ATPásica foi adaptado a partir da utilizada por Fiske & Subbarow no ano de 1925, e já foi utilizada anteriormente em nosso laboratório (Santos 2009).

Neste estudo a determinação da atividade de cada ATPase estudada foi baseada na relação entre fosfato liberado ao longo de certo período de tempo por uma determinada porção de membrana plasmática parcialmente purificada obtida das regiões do córtex e da medula externa dos rins de camundongo.

Para medir as concentrações de Pi inorgânico liberado foi realizada uma reação colorimétrica com a solução chamada de Reativo de Cor, que possui em sua fórmula Molibdato de Amônio e Metovanadato de Amônio, compostos que apresentam interação colorimétrica com os íons de Pi inorgânico.

No procedimento utilizado para as reações bioquímicas de atividade ATPásica foram utilizados tubos de ensaio contendo: 0,1mL do meio de reação comum (MRC), e completada com inibidores, agonistas, hormônios, ou água. O MRC variou de acordo com os protocolos empregados. A cada 15 segundos era adicionado 20µL da solução de homogenado de cada região renal, córtex ou medula externa, disparando a reação nos tubos, em seguida eram transferidos para banho Maria a 37°C, onde eram mantidos por 30 minutos, nos “tubos brancos” a reação era disparada somente ao final da incubação, juntamente com o início da parada das mesmas que era feita através da adição de 1mL de Ácido Tricloroacético (TCA) 12%, para que não houvesse atividade ATPásica nestes tubos. Conforme cada tubo recebia TCA era também transferido para um recipiente com gelo a fim de deter qualquer reação remanescente. É importante que os tubos brancos não apresentem reação durante a incubação para que se possa medir a concentração de fosfato proveniente da hidrólise espontânea do ATP presente na solução.

Após a parada da reação os tubos eram submetidos à centrifugação em velocidade de 2.000 RPM (438 g) durante 5 minutos a 4°C, para que o ATP não hidrolisado e as proteínas sedimentassem. Após a centrifugação, 500µL do sobrenadante contendo o Pi liberado era transferido para novos tubos de ensaio e completado com 500µL da solução Reativo de Cor (1,02mM Metovanadato de amônio, 21,2 mM Mobilidato de amônio e 37mM de ácido nítrico), deixando reagir por 20 minutos em temperatura ambiente, para se fazer a leitura em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 380nm.

Em todos os testes bioquímicos foi utilizado um meio de reação comum (MRC), contendo: CaCl<sub>2</sub> 1mM, Oligomicina 1µM, Azida de Na<sup>+</sup> 10mM (inibidores da ATPase mitocondrial), Ouabaína 1mM (para inibir a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase), MgCl<sub>2</sub> 4mM, ATP<sub>Na+</sub> 4mM, Hepes 50mM (tampão com pH ajustado para 7,0), e KCl 50mM.

Nos experimentos com variações nas concentrações extracelulares de Cálcio e a atividade das H<sup>+</sup>-ATPases a solução de MRC não podia conter cálcio, portanto o CaCl<sub>2</sub> foi substituído por água destilada, e um quelante de cálcio (EGTA 5 mM) foi adicionado em alguns tubos de reação.

Os tubos para reação de  $\text{Ca}^{2+}_o$  foram divididos em três grupos com diferentes concentrações de cálcio: livre de cálcio (0 M), baixas concentrações ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}\text{M}$ ) e fisiológica ( $10^{-3}\text{M}$ ).

#### PROTOCOLO Cálcio Extracelular ( $\text{Ca}^{2+}_o$ )

	MRC	Inibidor*	EGTA $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$	$\text{CaCl}_2$ $10^{-9}\text{M}$	$\text{CaCl}_2$ $10^{-7}\text{M}$	$\text{CaCl}_2$ $10^{-5}\text{M}$	$\text{CaCl}_2$ $10^{-3}\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	Proteína	V. Total (mL)
<b>Br</b>	0,1	-	-	-	-	-	-	0,08	0,02	0,2
<b>1</b>	0,1	-	0,02	-	-	-	-	0,06	0,02	0,2
<b>2</b>	0,1	0,02	0,02	-	-	-	-	0,04	0,02	0,2
<b>3</b>	0,1	0,02	-	0,02	-	-	-	0,04	0,02	0,2
<b>4</b>	0,1	0,02	-	-	0,02	-	-	0,04	0,02	0,2
<b>5</b>	0,1	0,02	-	-	-	0,02	-	0,04	0,02	0,2
<b>6</b>	0,1	0,02	-	-	-	-	0,02	0,04	0,02	0,2

\* Concanamicina  $10^{-8}\text{M}$  ou Schering 28080  $10^{-5}\text{M}$  para  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

Nos experimentos visando confirmar a relação entre ativação do CaR e a atividade das  $\text{H}^+$ -ATPases renais foram utilizados protocolos envolvendo gadolínio ( $\text{Gd}^{3+}$ )  $300\mu\text{M}$  e neomicina (Neom.)  $200\mu\text{M}$ , ambos agonistas do CaR. Estas concentrações são semelhantes às utilizadas previamente em outros estudo (Champegneulle, 1997; Renkema, 2009).

#### PROTOCOLO Gadolínio ( $\text{Gd}^{3+}$ $300\mu\text{M}$ )

TUBOS	MRC	Baf. $10^{-7}\text{M}$	Vanad. $10^{-3}\text{M}$	$\text{Gd}^{3+}$ $3 \cdot 10^{-4}\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	Proteína	Vol. Total (mL)
<b>Br</b>	0,1	-	-	-	0,08	0,02	0,2
<b>1</b>	0,1	-	-	-	0,08	0,02	0,2
<b>2</b>	0,1	0,02	-	-	0,06	0,02	0,2
<b>3</b>	0,1	-	0,02	-	0,06	0,02	0,2
<b>4</b>	0,1	-	-	0,02	0,06	0,02	0,2
<b>5</b>	0,1	0,02	-	0,02	0,04	0,02	0,2
<b>6</b>	0,1	-	0,02	0,02	0,04	0,02	0,2

#### PROTOCOLO Neomicina (Neom. $200\mu\text{M}$ )

TUBOS	MRC	Baf. $10^{-7}\text{M}$	Schering $10^{-5}\text{M}$	Neom. $2 \times 10^{-4}\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	Proteína	V. Total (mL)
<b>Br</b>	0,1	-	-	-	0,08	0,02	0,2
<b>1</b>	0,1	-	-	-	0,08	0,02	0,2
<b>2</b>	0,1	0,02	-	-	0,06	0,02	0,2
<b>3</b>	0,1	-	0,02	-	0,06	0,02	0,2
<b>4</b>	0,1	-	-	0,02	0,06	0,02	0,2
<b>5</b>	0,1	0,02	-	0,02	0,04	0,02	0,2
<b>6</b>	0,1	-	0,02	0,02	0,04	0,02	0,2

Para a avaliação da influência Hormonal sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar, foram realizados experimentos com ADH e Angiotensina II, uma vez que há estudos relacionando esses hormônios com a manutenção do pHi, seja por meio desta ATPase ou por estímulo do trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. (Oliveira-Souza, 2000 e 2004). Durante o experimento também foi testada a existência de uma possível ação conjunta entre esses hormônios e o CaR, utilizando para tal agonistas do CaR:

PROTOCOLO ADH (10<sup>-11</sup>M)

TUBOS	MRC	Baf. 10 <sup>-7</sup> M	ADH 10 <sup>-11</sup> M	Gd <sup>3+</sup> 3.10 <sup>-4</sup> M	H <sub>2</sub> 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	0,06	0,02	0,2
5	0,1	-	0,02	0,02	0,04	0,02	0,2
6	0,1	0,02	0,02	-	0,04	0,02	0,2
7	0,1	0,02	-	0,02	0,04	0,02	0,2
8	0,1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,2

PROTOCOLO Angiotensina II (10<sup>-9</sup>M)

TUBOS	MRC	Baf. 10 <sup>-7</sup> M	Ang. II 10 <sup>-9</sup> M	Gd <sup>3+</sup> 300uM	H <sub>2</sub> 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
5	0,1	0,02	0,02	-	0,04	0,02	0,2
6	0,1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,2

### Calculo da atividade das H<sup>+</sup>-ATPases:

As concentrações de Pi obtidas nas leituras dos tubos brancos foram subtraídas dos demais tubos para obtenção do valor de Pi liberado apenas pela atividade da ATPase. A atividade de cada ATPase estudada foi calculada através da diferença entre o Pi liberado em cada tubo de reação. Para cálculos de atividade da H<sup>+</sup>-ATPase foi utilizado Bafilomicina 10<sup>-7</sup>M, ou Concanamicina 10<sup>-8</sup>M, e para a H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase foi utilizado Orto-Vanadato de Sódio 10<sup>-3</sup>M e Schering 28080 10<sup>-5</sup>M. Os valores foram expressos em nM de Pi liberados por mg de proteína por unidade de tempo (nMPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

### Análise Estatística:

Os experimentos bioquímicos foram conduzidos em duplicata. 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* pareado. Para análises com mais de dois grupos foi feita análise de variância de uma via, seguida do teste de *Student-Newman-Keulls* quando esta análise foi estatisticamente significativa. A significância estatística é considerada a partir dos valores de  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad InStat 3.10 (*GraphPad Software*, San Diego, California - EUA).

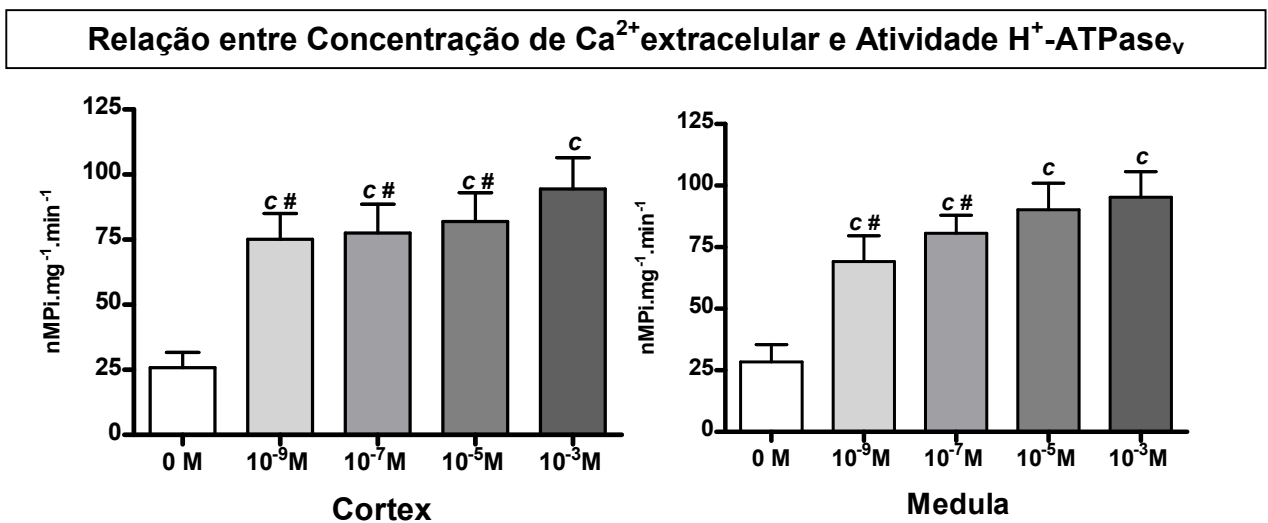
## RESULTADOS

### Concentração extracelular de Cálcio e CaR

Visto que o CaR é sensível às mudanças nas concentrações fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular decidimos estudar como essas variações afetam a atividade das  $\text{H}^+$ -ATPases renais.

Nestes experimentos foram utilizadas as seguintes concentrações extracelulares: livre de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$  0M), baixas concentrações ( $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ) e fisiológica ( $10^{-3}\text{M}$ ). Para assegurar um meio livre de cálcio foi utilizado 50mM de EGTA, um quelante de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Os resultados obtidos para  $\text{Ca}^{2+}_o$  aparecem abaixo nos Gráficos 1 e 2 e na Tabela 1.

No gráfico 1 observamos que a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolar, tanto no córtex como na região medular externa, é estimulada de forma significativa ao modificar a concentração de cálcio extracelular, demonstrando uma resposta dose-dependente.

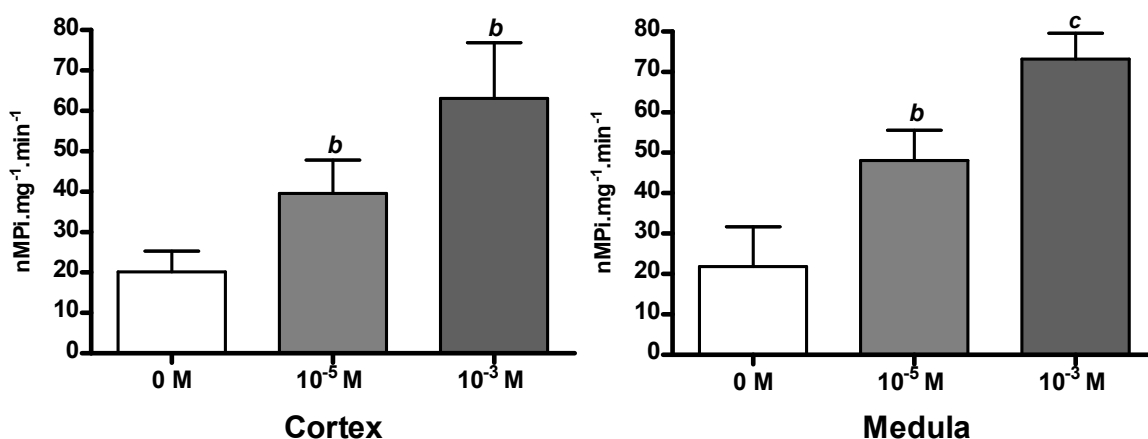


**Gráfico 1:** Atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular: 0M à  $10^{-3}\text{M}$ , sendo o  $n = 7$  para Córtex e Medula. Onde  $c = p < 0,001$  vs  $\text{Ca}^{2+}$  0M, e  $\# = p < 0,05$  vs  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-3}\text{M}$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  EPM.



Assim como para a  $H^+$ -ATPase, a atividade da  $H^+$ - $K^+$ -ATPase também demonstrou-se sensível às alterações dos níveis de  $Ca^{2+}_o$ , sendo que quanto maior a concentração de cálcio, maior é a atividade desta bomba. Para a medida da atividade da  $H^+$ - $K^+$ -ATPase foi utilizado o composto Schering 28080 como inibidor. (Gráfico 2).

**Relação entre Concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular e Atividade da  $H^+/K^+$  - ATPase**



**Gráfico 2:** Atividade da  $H^+$ - $K^+$  - ATPase em diferentes concentrações de cálcio, como: ausência de  $Ca^{2+}$  (0M), hipocalcemia ( $10^{-5}$ M) e normal ( $10^{-3}$ M), sendo o  $n = 7$  para Córtex e Medula. Onde **b** =  $p < 0,01$  e **c** =  $p < 0,001$  comparada a 0M. Os valores correspondem à média  $\pm$  EPM.

Os valores médios de atividade ATPásica representados nos gráficos 1 e 2 são apresentados na Tabela 1.

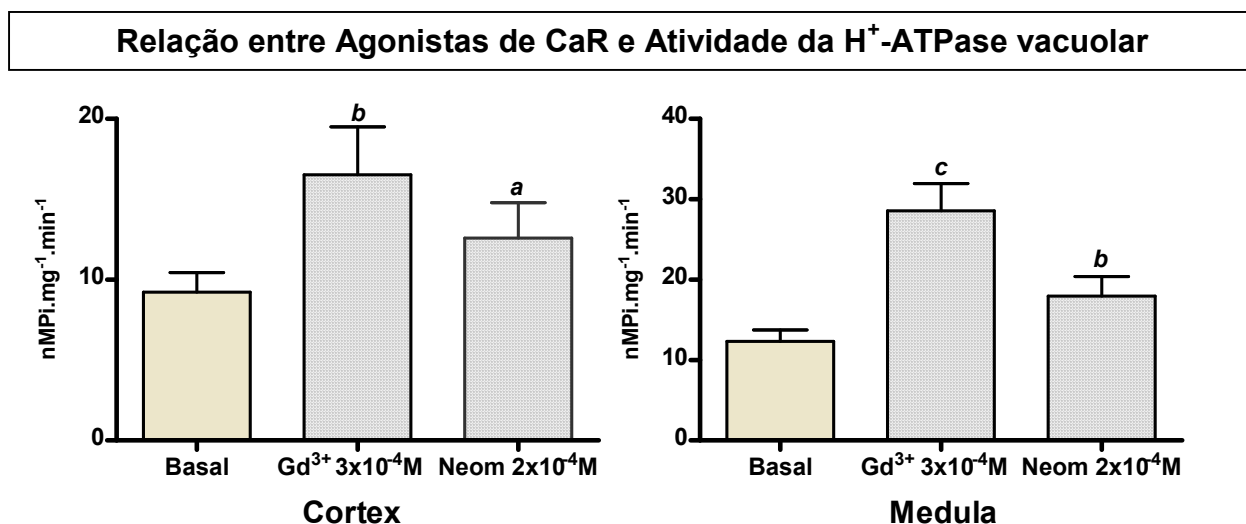
**Tabela 1:** Atividades das  $H^+$ -ATPase em relação as concentrações de  $Ca^{2+}$  extracelular e o CaR. Valores representados como Média  $\pm$  EPM, sendo  $n = 7$  para  $H^+$ -ATPase, e  $n = 5$  para  $H^+/K^+$ -ATPase. Onde **b** =  $p < 0,01$  **c** =  $p < 0,001$  vs  $Ca^{2+}$  0M, e **#** =  $p < 0,05$  vs  $Ca^{2+}$   $10^{-3}$ M.

Atividade ATPásica		Concentrações de $Ca^{2+}$ extracelular				
		0 M	$10^{-9}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-3}$ M
$H^+$ - ATPase <sub>v</sub>	Córtex	25,87 $\pm$ 5,85	75,11 $\pm$ 9,94 <sup>c#</sup>	77,56 $\pm$ 11,08 <sup>c#</sup>	81,97 $\pm$ 10,95 <sup>c#</sup>	94,41 $\pm$ 12,09 <sup>c</sup>
	Medula	28,35 $\pm$ 7,14	69,12 $\pm$ 10,57 <sup>c#</sup>	80,68 $\pm$ 7,25 <sup>c#</sup>	90,19 $\pm$ 10,78 <sup>c</sup>	95,21 $\pm$ 10,46 <sup>c</sup>
$H^+/K^+$ - ATPase	Córtex	20,14 $\pm$ 5,81	-	-	39,53 $\pm$ 8,27 <sup>b</sup>	63,13 $\pm$ 13,76 <sup>b</sup>
	Medula	21,83 $\pm$ 9,87	-	-	48,11 $\pm$ 7,48 <sup>b</sup>	73,17 $\pm$ 6,42 <sup>c</sup>

## Agonistas de CaR

A relação entre a ativação do CaR e a atividade das ATPases pode ser testada utilizando agonistas de CaR, entre os agonistas mais conhecidos estão: íons divalentes e trivalentes (Magnésio -  $Mg^{2+}$  e Gadolinio -  $Gd^{3+}$ ) e compostos proteicos de carga positiva (espermina e neomicina). Entre os agonistas de CaR foram utilizados nesse estudo os seguintes: Gadolinio a  $300\mu M$  ( $Gd^{3+} 3 \times 10^{-4} M$ ) e Neomicina a  $200\mu M$  (Neom.  $2 \times 10^{-4} M$ ), sendo estas concentrações retiradas da bibliografia consultada. Foi estudado o efeito destes agonistas do CaR na atividade bioquímica das ATPases secretoras de prótons presentes numa preparação de membrana plasmática obtida da região cortical ou da região medular externa de camundongos, os resultados são demonstrados abaixo: Gráficos 3-5; Tabelas 2 e 3.

No gráfico 3 observamos que tanto  $Gd^{3+} 300\mu M$  como Neomicina a  $200\mu M$  estimularam de forma significativa a atividade das  $H^+$ -ATPases vacuolares presentes nas membranas plasmáticas obtidas das regiões cortical e medular externa de camundongos. Os resultados obtidos utilizando tanto o gadolínio quanto a neomicina correspondem com os resultados obtidos anteriormente com diferentes concentrações de cálcio, demonstrando que quando há ativação do CaR, o mesmo aumenta a atividade da  $H^+$ -ATPase vacuolar de forma significativa.



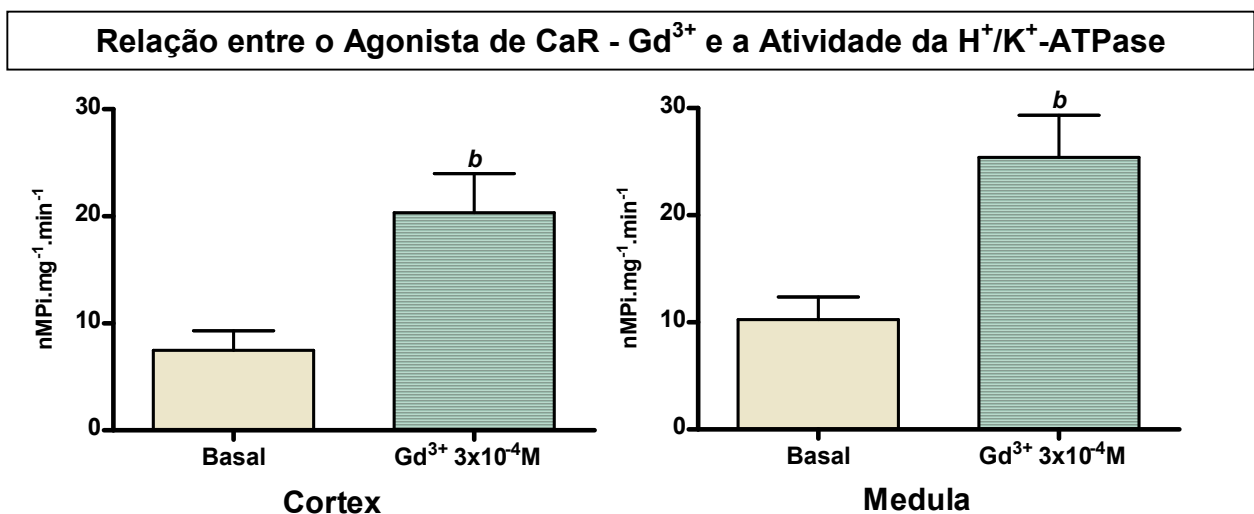
**Gráfico 3:** Atividade da  $H^+$ -ATPase vacuolar na presença dos agonistas de CaR: Gadolínio ( $Gd^{3+} 3 \times 10^{-4} M$ ) e Neomicina (Neom  $2 \times 10^{-4} M$ ), sendo o  $n = 10$  para CórTEX e Medula. Onde  $a = p < 0,05$ ;  $b = p < 0,01$  e  $c = p < 0,001$  vs Basal. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  EPM.

**Tabela 2:** Resultados numéricos da Relação entre Agonistas de CaR e Atividade da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar. Valores representados como Média ± EPM, sendo n = 10 para Córtex e Medula. Onde **a** = p<0,05 e **b** = p<0,01 vs Basal.

Atividade ATPásica		Agonistas de CaR		
		Basal	Gadolínio	Neomicina
H <sup>+</sup> -ATPase <sub>v</sub>	Córtex	9,223 ± 1,22	16,53 ± 2,98 <sup>b</sup>	12,59 ± 2,20 <sup>a</sup>
	Medula	12,33 ± 1,43	28,59 ± 3,37 <sup>c</sup>	17,95 ± 2,44 <sup>b</sup>

Nos experimentos destinados a estudar a influencia CaR sobre a atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase foram utilizados dois inibidores diferentes: Orto-vanadato Sódico, um inibidor inespecífico que devido a sua semelhança com o íon fosfato acaba competindo com as moléculas de ATP para as ATPases de tipo P (H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e Ca<sup>2+</sup> ATPase); e o composto Schering 28080, um inibidor específico desta ATPase.

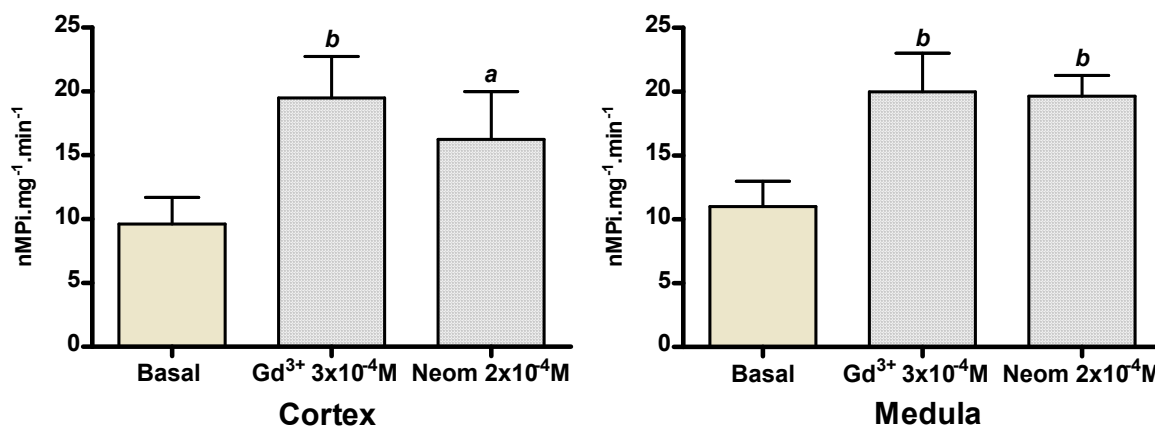
No gráfico 4 os resultados foram obtidos utilizando-se Orto-Vanadato Sódico a 10<sup>-4</sup>M como inibidor da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, o Gadolínio a 300µM causou aumento significativo da atividade, tanto na região cortical quanto na medular externa.



**Gráfico 4:** Atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase na presença do agonista de CaR: Gadolínio (Gd<sup>3+</sup> 3x10<sup>-4</sup>M), quando utilizado Orto-Vanadato 10<sup>-4</sup>M como inibidor, sendo n = 10 para Córtex e Medula. Onde **b** = p<0,01 vs Basal. Os valores apresentados correspondem à média ± EPM.

No gráfico 5 utilizou-se Schering 28080 a  $10^{-5}$ M, um inibidor específico da  $H^+K^+$  ATPase observou-se que ambos agonistas do CaR, Gadolínio e Neomicina, estimularam de forma significativa a atividade da  $H^+K^+$  ATPase no córtex e na região medular externa, sendo consistente com o resultado do grupo anterior.

**Relação entre Agonista de CaR -  $Gd^{3+}$  e Neom. e a Atividade da  $H^+/K^+$ -ATPase**



**Gráfico 5:** Atividade da  $H^+K^+$ -ATPase na presença de agonistas de CaR: Gadolínio ( $Gd^{3+} 3 \times 10^{-4} M$ ) e Neomicina (Neom  $2 \times 10^{-4} M$ ), quando utilizado Schering 28080 ( $5 \times 10^{-5} M$ ) como inibidor específico. Sendo  $n = 7$  para Córtex e Medula. Onde  $a = p < 0,05$  e  $b = p < 0,01$  vs Basal. Os valores apresentados correspondem à média  $\pm$  EPM.

**Tabela 3:** Média  $\pm$  EPM dos valores da atividade da  $H^+K^+$ -ATPase (atividade sensível a Schering 28080) quando CaR é estimulado por diferentes agonistas, sendo  $n = 9$  para Gadolínio e Neomicina. Onde  $a = p < 0,05$  e  $b = p < 0,01$  vs Basal.

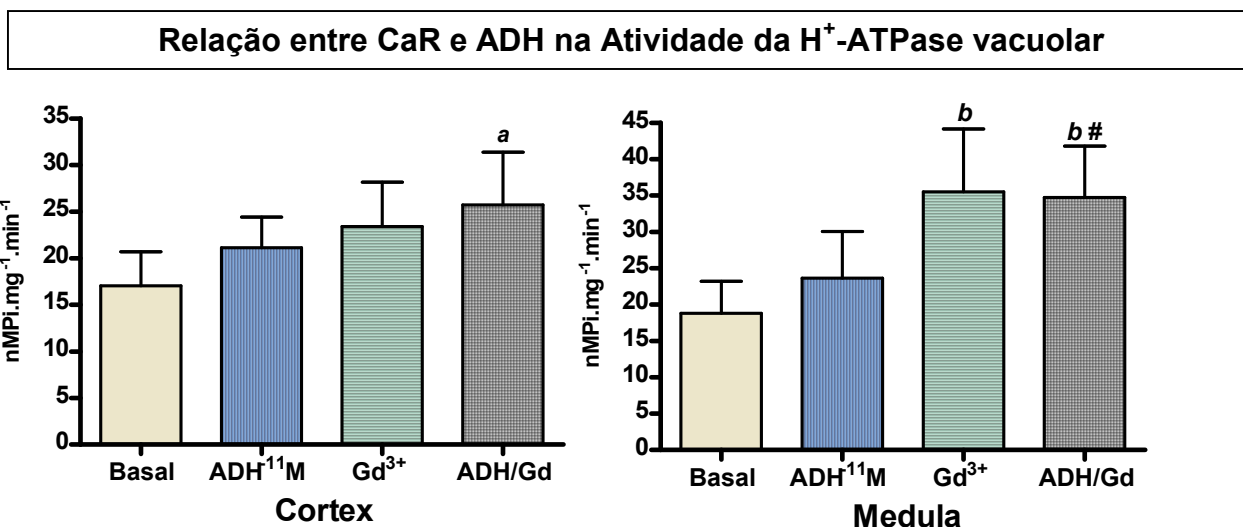
Atividade ATPásica	Agonistas de CaR e $H^+/K^+$ -ATPase		
	Basal	Gadolínio	Neomicina
Córtex	9,618 $\pm$ 2,07	19,50 $\pm$ 3,24 <sup>b</sup>	16,23 $\pm$ 3,76 <sup>a</sup>
Medula	11,00 $\pm$ 2,00	19,99 $\pm$ 3,01 <sup>b</sup>	19,65 $\pm$ 1,64 <sup>b</sup>

Os resultados com ambos agonistas demonstraram que o CaR possui uma influência positiva sobre a  $H^+K^+$  ATPase tanto na região do córtex quanto na medula externa. Quando comparados estes resultados e os obtidos com cálcio fica evidente a relação entre a ativação do CaR e a atividade das  $H^+$ -ATPases vacuolares e das  $H^+K^+$ -ATPas renais.

## H<sup>+</sup>-ATPase e Hormônios

Estudos com angiotensina II e vasopressina têm demonstrado que sua participação no controle da homeostase do meio interno vai além da reabsorção tubular de sal e água, estando envolvidas também no transporte tubular de prótons e bicarbonato (Lee Hamm & Nakhoul, 2008). Nos segmentos distais demonstrou-se que a angiotensina II e a vasopressina possuem efeitos positivos sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase (Mello-Aires & Malnic, 2002; Rothenberger, 2007; Santos, 2009). Desta forma, decidimos abordar seus efeitos na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar, e uma possível interação entre o CaR e esses hormônios (Tabela 4).

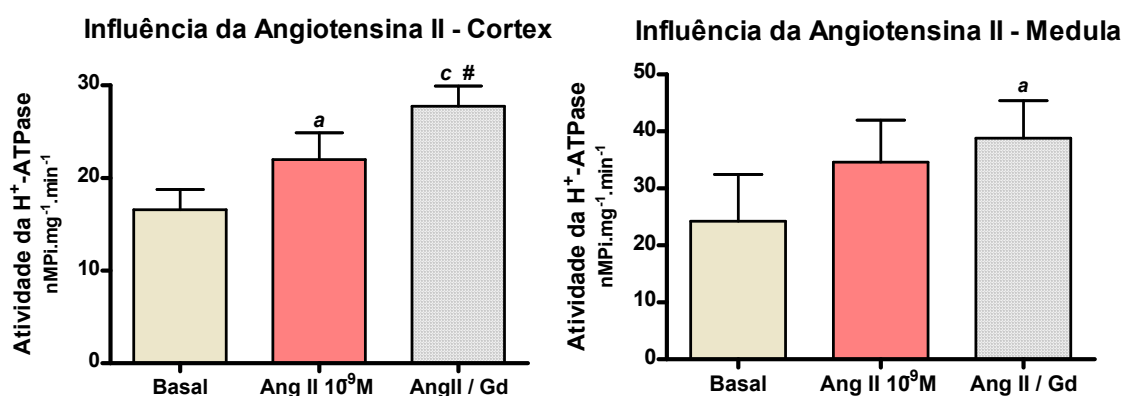
No gráfico 6 observamos que vasopressina 10<sup>-11</sup>M provocou um incremento não significativo na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar, tanto no córtex como na medula. A presença da vasopressina não potencializou o estímulo do CaR sobre a mesma.



**Gráfico 6:** Atividade da H<sup>+</sup>-ATPase na presença do Hormônio Antidiurético 10<sup>-12</sup>M (ADH 10<sup>-12</sup>), Gadolínio 3x10<sup>-4</sup>M (Gd<sup>3+</sup>) ou ambos em conjunto, (ADH/Gd), sendo o n = 9 para Córtex e Medula. Onde *a* = p<0,05; *b* = p<0,01 vs Basal e # = p<0,05 vs ADH. Os valores apresentados correspondem à média ± EPM.

Nos testes de atividade com a H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>, sensível a bafilomicina 10<sup>-7</sup>M, os resultados para a região do córtex foram positivos quanto ao aumento de atividade desta ATPase quando estimulada por angiotensina II (10<sup>-9</sup>M), sendo que esta resposta pode ser ampliada de forma significativa se ocorrer juntamente o estímulo do CaR. A região da medula externa apesar de manter o mesmo padrão de resposta, não demonstrou significância estatística.

### Relação entre o CaR e a Angiotensina II na Atividade da H<sup>+</sup>-ATPase



**Gráfico 7** – Atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> submetida à Angiotensina II 10<sup>-9</sup>M (Ang II 10<sup>-9</sup>M) ou Ang II e Gadolínio 3x10<sup>-4</sup>M (AngII/Gd) em conjunto, n = 7 para Córtex e Medula. Onde **a** = p<0,05, **c**=p<0,001 vs Basal, e **#** = p<0,05 vs AngII 10<sup>-9</sup>M. Os valores apresentados correspondem à média ± EPM.

Os valores médios de atividade ATPásica representados nos gráficos 6 e 7 são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Atividades da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> na relação entre o CaR e ação hormonal de ADH e Angiotensina II. Valores representados como Média ± EPM, sendo n = 9 para ADH e n = 7 para Ang. II. Onde **a** = p<0,05, **b** = p<0,01 e **c** = p<0,001 vs Basal, e **#** = p<0,05 vs ADH ou Ang II.

Atividade ATPásica	Hormônios e H <sup>+</sup> -ATPase vacuolar						
	Vasopressina - ADH				Angiotensina II		
	Basal	ADH	Gd <sup>3+</sup>	ADH/Gd	Basal	Ang II	Ang II/Gd
Córtex	17,05±3,63	21,14±3,30	23,42±4,75	25,74±5,67 <sup>a</sup>	16,60±2,15	22,00±2,89 <sup>a</sup>	27,77±2,16 <sup>c#</sup>
Medula	17,05±3,63	21,14±3,30	23,42±4,75 <sup>b</sup>	25,74±5,67 <sup>b#</sup>	24,23±8,20	34,61±7,38	38,83±6,56 <sup>a</sup>

## DISCUSSÃO

A manutenção da vida depende de um processo conhecido como homeostase, um processo envolvendo constantes ajustes do meio interno de um organismo visando manter níveis aceitáveis de pH, concentrações iônicas e osmóticas para a sobrevivência do mesmo. O íon cálcio é vital para algumas funções básicas como: regulação hormonal, contração muscular, liberação de neurotransmissores, sinalização intracelular, formação óssea e coagulação sanguínea; sendo um dos parâmetros do meio interno sob controle homeostático. (Karp, 2005)

O cálcio, apesar de estar presente em grandes quantidades no organismo, encontra-se em maior parte ligado a proteínas ou armazenado em tecidos, como nos ossos ou retículos sarcoplasmáticos. As atividades desempenhadas pelo cálcio intracelular e extracelular são diferentes, sendo as respostas desencadeadas pelo cálcio intracelular, variáveis de acordo com o tecido e as necessidades momentâneas das células. O  $\text{Ca}^{2+}_i$  atua principalmente como segundo mensageiro através de variações de sua concentração, sendo este o fator desencadeador das respostas que causam a extrusão de vesículas contendo neurotransmissores, proteínas transportadoras ou receptores extracelulares, dependendo do tipo de célula excitada. (Sands , 1997; Champegneulle, 1997; Karp, 2005)

Enquanto as variações dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}_i$  são importantes para desencadear uma resposta intracelular os níveis de cálcio livre extracelular encontram-se sob constante monitoramento e controle para que suas concentrações fiquem próximas a 1mM. Esse controle rigoroso sobre as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}_o$  é importante, pois é ela que desencadeia os principais mecanismos relacionados com a ação de cálcio no organismo. (Brown, 1998) Entre os mecanismos responsáveis por este rígido controle destacam-se a ação dos hormônios Paratireóideo, Calcitonina e vitamina D3, que atuam na reabsorção e deposição óssea, excreção renal e absorção intestinal. Outro fator que desempenha um papel fundamental na regulação do  $\text{Ca}^{2+}_o$  é o Receptor Extracelular sensível a Cálcio, CaR, que tem sido

estudado cada vez mais a fundo desde sua descoberta. (Huang & Miller, 2007; Riccardi, 2009; Bland, 1999; Brown & McLeod, 2001)

Os estudos com CaR vêm demonstrando que este receptor é altamente sensível ao íon cálcio, e que ele desempenha um importante papel no organismo envolvendo muito mais que apenas os controles das concentrações de cálcio. As metodologias empregadas para se estudar este receptor envolvem métodos que abrangem desde clonagem e imunohistoquímica até reações bioquímicas e medidas de pH<sub>i</sub>. (Thakker, 1998 ; Riccardi, 1996; Renkema, 2009).

Através dos métodos de imunohistoquímica e clonagem foi demonstrado que o CaR encontra-se espalhado por diferentes tecidos e regiões do organismo, desempenhando diferentes funções dependendo de sua localização, isso porque ele está ligado à proteína G, e apresenta cascatas de ativação variáveis, podendo ativar diferentes cascatas quando estimulado, gerando assim diferentes respostas (Ward, 2004; Riccardi, 2009). Por exemplo, quando o CaR de células OK (modelo celular de túbulo proximal) foram estimulados com 5mM de Cálcio ou neomicina, suas vias apresentaram relação com PLC e a ERK, enquanto o CaR presente nas células do ramo espesso da alça de Henle desencadeia uma resposta através da PLA<sub>2</sub>, gerando Ácido Araquidônico (Ward, 2004).

Os estudos genéticos e de clonagem demonstraram a influencia do CaR em patologias como a FHH (Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar), onde as concentrações de Ca<sup>2+</sup> encontram-se ligeiramente aumentadas, e na NSPTH (Hiperparatireoidismo Neonatal Severo), onde ocorre má formação óssea e vários outros fatores agravantes para a saúde de seu portador. Essas patologias estão ligadas a mutações nos genes que codificam o CaR, e podem causar desde mau funcionamento até inativação completa do receptor, onde a mudança de um simples aminoácido pode inativar este receptor. (Renkema, 2009; Kos, 2003; Thakker 1998) Talvez por esse motivo a seqüência dos aminoácidos do CaR se apresente muito pouco alterada mesmo em diferentes espécies de mamíferos estudados, como: rato, boi, humanos e coelhos, onde geralmente o CaR mantém um grau de semelhança entre elas de mais de 90% dos aminoácidos. Essa semelhança é um indicativo de sua fundamental importância para os seres vivos, outra prova disso são as graves



patologias relacionadas à inativação do mesmo, e há estudos também que apontam o CaR como fator importante para a osmorregulação em peixes. (Butters, 1997)

Pessoas com hipercalciúria apresentam maiores chances de desenvolverem nefrolitíases, que é o depósito ou formação de pedras de fosfato de cálcio nos rins e sistema urinário. (Sands, 1997) Essa patologia está relacionada diretamente às concentrações urinárias de cálcio e fosfato e também pode ser influenciada pelo pH tubular. O grupo de Renkema em 2009 desenvolveu um estudo utilizando segmentos do DCME isolados de camundongos *knockout* para TRVP5, demonstrando que meios ácidos diminuem a precipitação do fosfato de cálcio, e a diluição urinária facilita a eliminação do mesmo. O CaR presente na membrana apical das células do DCME atua como mecanismo de prevenção à formação de cálculos, pois sua ativação parece aumentar a secreção de  $H^+$  e diminuir a concentração de AQP2. Outro possível mecanismo de prevenção a essa patologia desencadeado pelo CaR é a sua capacidade de aumentar a reabsorção de Pi no túbulo proximal, modulando o trocador Na/Pi e a ação do PTH. (Ba, 2003)

Conforme as concentrações de cálcio aumentaram durante nossos experimentos também houve aumento da atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> e da  $H^+$ -K<sup>+</sup>-ATPase, dois dos mecanismos responsáveis pela acidificação ao longo do néfron. A ativação do CaR, mesmo em baixas concentrações de cálcio, como  $10^{-9}M$  causou um aumento significativo na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>, demonstrando que este receptor possui alta sensibilidade ao íon cálcio e que seu mecanismo de sinalização pode desencadear respostas mesmo sob pouco estímulo.

Diversos estudos têm demonstrado que o CaR não é sensível exclusivamente a  $Ca^{2+}$ , podendo ser estimulado por outros cátions como  $Mg^{2+}$  e  $Gd^{3+}$  e até antibióticos como Neomicina. (Brown, 1998) No presente trabalho ao utilizar outros agonistas do CaR como  $Gd^{3+}$  e Neomicina também foram observados efeitos positivos sobre as atividades tanto da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>, quanto da  $H^+$ /K<sup>+</sup>-ATPase. Champegneulle e col. (1997) sugerem que o CaR responde de maneiras diferentes conforme o ligante que o ativa, provocando efeitos diversos na concentração intracelular de cálcio. Entretanto, nossos resultados sobre a atividade das

H<sup>+</sup>-ATPases foram qualitativamente semelhantes, independente da forma de estímulo do CaR utilizada.

Estudos de imunolocalização foram realizados por Brown e seu grupo no ano de 1988 na tentativa de demonstrar e melhor compreender a distribuição da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> ao longo do néfron, tendo encontrado evidências de sua presença na membrana apical do Túbulo Proximal, Ramo descendente e espesso ascendente da alça de Henle, e principalmente no túbulo convoluto distal e ductos coletores, sendo neste último segmento a marcação restrita as células intercalares. Do ponto de vista funcional, unicamente no túbulo proximal e no ducto coletor a H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> cumpre um papel significativo na secreção de prótons. (Lee Hamm & Nalhound, 2008; Wagner, 2004) As células intercalares podem ser classificadas de acordo com a distribuição da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> entre as membranas apical e basolateral, sendo dividida por Brown em 1988 em três tipos: Apical, Basolateral e Difusa, enquanto que Bailey em 1998 apresenta uma classificação envolvendo 5 subtipos, adicionando apical-basolateral e intermediária à classificação. Como em nossa preparação trabalhamos com vesículas plasmáticas derivadas da região cortical e medular externa, e não com segmentos tubulares isolados, não é possível atribuir os resultados à atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> a um segmento tubular específico.

Estudos de imunomarcação desenvolvido por Brown e colaboradores (1987) em rins de ratos demonstraram a presença das H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> tanto nas membranas plasmáticas quanto armazenadas em vesículas próximas as membranas, que podem ser endereçadas para face apical ou basolateral de acordo com a necessidade fisiológica em que o organismo se encontra. Entre os papéis que podem ser atribuídos a essa ATPase estão: acidificação do fluido tubular, acidificação de vesículas citoplasmáticas envolvidas no processo de endocitose e lisossomos (Wagner, 2004).

Quadros de alcalose ou hipocalemia podem causar hiperplasia das IC e aumento na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> por fusão de vesículas com a membrana plasmática. (Bailey, 1998; Wagner, 2004) Além destes fatores, estudos num modelo celular dos segmentos distais do néfron envolvendo vasopressina demonstraram influencia positiva sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>, pela extrusão de vesículas

relacionada ao aumento do  $\text{Ca}^{2+}_i$  e AMPc. (Oliveira-Souza, 2004) Esta relação direta e positiva entre o incremento do  $\text{Ca}^{2+}_i$  e a atividade da  $\text{H}^+\text{-ATPase}_v$  tem sido demonstrada em várias preparações (Poch, 1993; Villereal, 1981; Rosoff & Cantley, 1985; Tornquist & Tashjian, 1991; Hou, 2001), incluindo DCC de camundongo isolado (Fernandez, 2005). Visto que um dos mecanismos de ação do CaR envolve o incremento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , é possível inferir que este seria o processo responsável pelo incremento na atividade da  $\text{H}^+\text{-ATPase}_v$  observado em nossa preparação ao estimular o CaR. Entretanto, novos estudos serão necessários para confirmar esta hipótese.

As P-ATPase são divididas em 2 grupos as do tipo I com 6  $\alpha$ -hélices transmembrana e as do tipo II que são caracterizadas por apresentarem 10  $\alpha$ -hélices em seu domínio transmembrana, ambas possuem as regiões carboxi e N-terminal citosólicas, e seus loops citosólicos são importantes para sua ativação, pois são neles que ocorrem as reações de fosforilação que ativam essas ATPases. (Horisberger & Doucet, 2000) A  $\text{H}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  é uma P-ATPase tipo II, sendo sua subunidade  $\alpha$  constituída por aproximadamente 100kDa e representa o domínio transmembrana, enquanto a subunidade  $\beta$  pesa apenas 30KDa, mas apesar de seu tamanho reduzido essa região é extremamente importante pois é ela quem sofre a glicosilação que garante o endereçamento correto da  $\text{H}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ . (Gumz, 2009).

A  $\text{H}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  forma-se através da união de 2 subunidades e cada subunidade apresenta diferentes formas, que ao se combinarem podem gerar várias isoformas da  $\text{H}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ , mas suas principais organizações são as que resultam em: isoforma gástrica ( $\text{HK}\alpha 1$ ), presente em abundância no estomago e que também pode ser encontrada em epidídimo e ao longo dos néfrons, principalmente no ducto coletor; e a isoforma colônica ( $\text{HK}\alpha 2$ ), que foi clonada inicialmente de células intestinais. (Gumz, 2010) Um dos métodos utilizados para identificar qual o tipo de isoforma, é a sensibilidade ou não a ouabaina, pois a isoforma gástrica é sensível à Omeprazol e Schering e insensível a Ouabaína, enquanto a isoforma colônica é sensível a Ouabaína. (Codina & DuBose Jr, 2006) Ambas isoformas acidificam o fluído tubular e reabsorvem  $\text{K}^+$  no rim.

Em nossos experimentos utilizamos Ouabaína na concentração de 1mM a fim de inibir a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, essa concentração de ouabaína é eficaz na inibição tanto da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase quanto da isoforma colônica da  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. (Codina & DeBose, 2006; Horisberger & Doucet, 2000) Desta forma a atividade ATPásica inibida por Vanadato e pelo composto Schering 28080 no presente trabalho deve corresponder a isoforma gástrica da  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPase.

Estudos envolvendo principalmente ratos, coelhos e camundongos tentam mapear a distribuição das  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPases ao longo do néfron, para tal utilizam-se técnicas de presença e transcrição de mRNAs. (Gumz, 2010) Ambas isoformas localizam-se primariamente no ducto coletor, entretanto alguns estudos sugerem a expressão da isoforma colônica no ramo espesso ascendente de Henle (Verlander, 2001) e no túbulo conector (Ahn, 1995). A expressão do mRNA e da proteína da  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase gástrica tem sido identificada no córtex de ratos e coelhos, na medula externa de ratos, camundongos e coelhos, e na medula interna de camundongos e ratos. (Ahn, 1995; Gumz, 2010) Em animais submetidos a dietas pobres em potássio a expressão da isoforma colônica aumenta ao longo do néfron e mesmo regiões que não a expressavam passam a fazê-lo, na tentativa de aumentar a recaptção de  $\text{K}^+$ . Especificamente, a isoforma gástrica foi localizada nas células intercalares do DCC e DCME de rato, camundongo e coelho. Entretanto a isoforma 2 (colônica) se expressa no DCC de camundongos, ratos e coelhos, especialmente em situações de hipocalemia (Gumz, 2010; Codina & DuBose 2006)

Os mecanismos intracelulares responsáveis pela ativação da isoforma gástrica da  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase ainda não estão totalmente claros, mas já se sabe que a extrusão de suas vesículas esta relacionada ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}_i$  e queda do AMPc, mediados por PKC e PKA, e ativação de subunidades da proteína G respectivamente. (Kopic, 2010) O CaR também apresenta relação com sua extrusão e ativação pois entre seus mecanismos de resposta intracelular, estão alguns capazes de estimular a  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. (Horisberger & Doucet, 2000; Remy, 2007) Diversos estudos utilizando estômago de ratos e anfíbios demonstraram que a ativação do CaR localizado na membrana basolateral das células parietais resultava em aumento da secreção ácida por parte destas células, mesmo na ausência de secretagogos fisiológicos como a Histamina. (Kirchhoff & Geibel, 2006) No ano de

2007 Remy e colaboradores demonstraram a relação entre o CaR e a HK $\alpha$ 1 em células parietais humanas, sendo a expressão da HK $\alpha$ 1 apical incrementada ao estimular o CaR basolateral nestas células. Durante os experimentos eles mantinham baixas concentrações de cátions (Cálcio 100 $\mu$ M e Mg $^{2+}$  0M) para que houvesse mínima atividade do CaR, e mensuravam a velocidade de recuperação do pH quando o CaR era estimulado por Gd $^{3+}$  a 100  $\mu$ M, sendo essa recuperação atribuída principalmente a HK $\alpha$ 1.

### CaR e Hormônios

O ADH é um hormônio que atua principalmente sobre os rins estimulando a reabsorção distal de água e NaCl, e regulando a secreção tubular de prótons através do aumento na atividade da H $^{+}$ -ATPase $_v$ . (Wagner, 2004) O ADH em concentrações picomolares (10 $^{-12}$ ) ativa receptores do tipo V1 que estão ligados ao aumento das concentrações de Ca $^{2+}_i$  através da cascata G $_{q11}$ -PLC-PKC, enquanto em concentrações de micromolares 10 $^{-6}$ , ele ativa os receptores V2 que são responsáveis por uma cascata de AMPc e PKA, que causa a endocitose de vesículas, mas essa resposta pode variar de acordo com o tipo celular, exemplo disso são os segmentos do Ramo Ascendente da alça de Henle e Ducto coletor nos néfrons onde o estímulo de V2 tem efeito positivo sobre a H $^{+}$ -ATPase. (Oliveira-Sousa, 2004; Wagner, 2004).

No ano de 2004 Oliveira-Souza e colaboradores utilizando células MDCK realizaram estudos relacionando a ativação dos dois receptores de ADH, V1 e V2, e a recuperação do pH $_i$  através da atividade da H $^{+}$ -ATPase. O estudo demonstrou que independente da concentração de ADH utilizada, 10 $^{-12}$ M ou 10 $^{-6}$ M, há resposta positiva na atividade da H $^{+}$ -ATPase, dada pela ação conjunta do aumento de Ca $^{2+}_i$  e AMPc. Trabalhando com um clone das células MDCK que apresenta características semelhantes às células intercalares (MDCK C11), Santos e col. (2009) observaram um incremento significativo na atividade da H $^{+}$ -ATPase $_v$  unicamente com a dose de 10 $^{-11}$ M. Embora estes estudos tenham encontrado um estímulo da atividade bioquímica e funcional da H $^{+}$ -ATPase $_v$  com doses fisiológicas de ADH, nossos

resultados não demonstraram a mesma influência, o que pode ser atribuído a diferença nas preparações.

Os experimentos utilizando estímulos simultâneos de ADH e  $Gd^{3+}$  demonstraram que há um aumento na atividade de  $H^+ATPase_v$  quando comparada aos níveis basais, e até com o ADH sozinho, porém este aumento não foi significativamente maior quando comparado à atividade obtida a partir do estímulo com o agonista gadolínio. Isto é compatível com um efeito isolado do estímulo do CaR na atividade da  $H^+ATPase_v$ .

A angiotensina II apresenta 2 tipos de receptores que podem ser ativados nos segmentos renais, AT1 e AT2. O AT1 é ativado por baixas concentrações ( $10^{-12}M$  a  $10^{-9}M$ ) e sua cadeia de resposta esta ligada com o aumento do  $Ca^{2+}_i$  pela cascata de PLC-IP<sub>3</sub> e DG. Diversos estudos têm encontrado um efeito estimulatório da Angiotensina II, via receptor AT1, na reabsorção de bicarbonato e secreção de prótons ao longo do néfron. (Wagner, 2004) Este estímulo na secreção de prótons tem sido observada tanto no túbulo proximal como nas células intercalares do DCC, através do estímulo na atividade do trocador  $Na^+/H^+$  e da  $H^+ATPase_v$ . (Oliveira-Souza, 2000; Wagner, 2004). Os nossos resultados utilizando Ang II  $10^{-9}M$  na região cortical demonstraram o envolvimento da angiotensina com o estímulo da  $H^+ATPase$  no rim de camundongo. Talvez esse resultado seja proveniente da ação do segundo mensageiro gerado na ativação do receptor AT1, entretanto este ponto não foi estudado no presente trabalho. O estímulo do CaR na presença da Angiotensina potencializou significativamente o incremento na atividade da  $H^+ATPase_v$ . Isto poderia ser explicado por uma complementação nas vias de sinalização, que merecem futuros estudos.

## CONCLUSÃO

Ficou evidente que o CaR além de desempenhar papéis importantes para o organismo na homeostase de cálcio, também atua na regulação do pH nos segmentos tubulares renais, estimulando a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> e da isoforma gástrica da  $H^+/K^+$ -ATPase, localizadas na membrana plasmática dos segmentos tubulares da região cortical e medular externa do rim de camundongos. Mesmo que o CaR não seja específico para cálcio sua sensibilidade a esse íon é notável, pois mesmo em baixas concentrações de cálcio como  $10^{-9}M$ , ele apresentou uma capacidade de resposta significativa, aumentando tanto a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> quanto da  $H^+/K^+$ -ATPase.

O estímulo do CaR também demonstrou capacidade para potencializar a resposta gerada pela Angiotensina II sobre a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> na região cortical, o que sugere uma correlação das vias de sinalização e possivelmente uma interação destes fatores na regulação da secreção tubular de prótons.

## BIBLIOGRAFIA

- AHN, K. Y. & KONE, B. C. **Expression and cellular localization of mRNA encoding the "gastric" isoform of H(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit in rat kidney.** *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **268**:99-109, 1995.
- AIDA, K.; KOISHI, S.; TAWATA, M.; ONAYA, T.;. **Molecular cloning of a putative Ca<sup>2+</sup> sensing receptor cDNA from human kidney.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**:524-529, 1995.
- ARTHUR, J. M.; COLLINSWORTH, G. P.; GETTYS, T. W.; QUARLES, L. D.; RAYMOND, J. R. **Specific coupling of a cation-sensing receptor to G protein alpha-subunits in MDCK cells.** *Am. J. Physiol.*, **273**:129-135, 1997.
- BA, J.; BROWN, D.; FRIEDMAN, P. A. **Calcium-sensing receptor regulation of PTH-inhibitable proximal tubule phosphate transport.** *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **285**:1233-1243, 2003
- BAI, M.; QUINN, S.; TRIVEDI, S.; KIFOR, O.; PEARCE, S. H.; POLLAK, M. R.; KRAPCHO, K.; HEBERT, S. C.; BROWN, E. M. **Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca<sup>2+</sup> sensing receptor.** *J. Biol. Chem.*, **271**:19537-19545, 1996.
- BAILEY, M. A.; FLETCHER, R. M.; WOODROW, D. F.; UNWIN, R. J.; WALTER, S. J. **Up regulation of H<sup>+</sup> ATPase in the distal nephron during potassium depletion: structural and functional evidence.** *Am. J. Physiol.*, **275**:878-884, 1998.
- BARRETO-CHAVES, M. L. & MELLO-AIRES, M. **Luminal arginine vasopressin stimulates Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> exchange and H<sup>+</sup> - ATPase in cortical distal tubule via V1 receptor.** *Kidney Int* **52**:1032-1041, 1997.
- BLAND, R.; WALKER, E. A.; HUGHES, S. V.; STEWART, P. M.; HEWISON, M. **Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$  hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium.** *Endocrinology*, **140**:2027-2034, 1999.
- BLAKENSHIP, K. A.; WILLIAMS, J. J.; LAWRENCE, M. S.; McLEISH, K. R.; DEAN, W. L.; ARTHUR, J. M. **The calcium-sensing receptor regulates calcium absorption in MDCK cells by inhibition of PMCA.** *Am. J. Physiol.*, **280**:815-822, 2001.
- 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.



BRETON, S.; WIEDERHOLD, T.; MARSHANSKY, V.; NSUMU, N. N.; RAMESH, V.; BROWN, D. **The B1 subunit of the H<sup>+</sup>ATPase is a PDZ domain-binding protein. Colocalization with NHE-RF in renal B-intercalated cells.** *J. Biol. Chem.*, **275**:18219-18224, 2000.

BROWN, D.; GLUCK, S.; HARTWIG, J.; **Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H<sup>+</sup> ATPase.** *J. Cell Biol.*, **105**:1637-1648, 1987.

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

BROWN, E. M. **Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing, regulation of parathyroid cell function and role of Ca<sup>2+</sup> and other ions as extracellular (first) messenger.** *Physiol. Reviews*, **71**:371-411, 1991.

BROWN, E. M.; GAMBA, G.; RICCARDI, D.; LOMBARDI, M.; BUTTERS, R.; KIFOR, O.; SUN, A.; HEDIGER, M. A.; LYTTON, J.; HEBERT, S. C. **Cloning and characterization of na extracellular Ca<sup>2+</sup> - sensing receptor from bovine parathyroid.** *Nature*, **366**:575-580, 1993.

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.** *Physiol. Reviews*, **81**:240-297, 2001.

BURNS, K. D.; HOMMA, T.; BREYER, M. D.; HARRIS, R. C. **Cytosolic acidification stimulates a calcium influx that activates Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in LLC-PK1.** *Am. J. Physiol.*, **261**:617-625, 1991.

BUTTERS, R.; CHATTOPADHYAY, N.; NIELSEN, P.; SMITH, C. P.; MITHAL, A.; KIFOR, O.; QUINN, S.; GOLDSMITH, P.; HURWITZ, S.; KRAPCHO, K.; BUSBY, J.; BROWN, E. M. **Cloning and characterization of a calcium-sensing receptor from the hypercalcemic New Zealand white rabbit reveals unaltered responsiveness to extracellular calcium.** *J. Bone Mineral Res.*, **12**:568-579, 1997.

CARUSO-NEVES, C.; SIQUEIRA, A.; ISO-COHEN, G.; LOPES, A. **Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule.** *Biochem. et Biophys. Acta*, **1431**:483-491, 1999.

CHA, S.; HUANG, C.; DING., Y.; QI, X.; HUANG, C.; MILLER, R. T. **Calcium-sensing receptor decreases cell surface expression of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir4.1.** *J. Biol. Chemistry*, **286**:1828-1835, 2011.

CHAMPIGNEULLE, A.; SIGA, E.; VASSENT, G.; IMBERT-TEBOUT, M **Relationship between extra and intracellular calcium in distal segments of the renal tubule. Role of the Ca<sup>2+</sup> receptor RaKCaR.** *J. Membr. Biol.*, **156**:117-129, 1997.

CHATTOPADHYAY, N.; CHENG, I.; ROGERS, K.; RICCARDI, D.; HALL, A.; DIAZ, R.; HEBERT, S. C.; SOYBEL, D. I.; BROWN, E. M. **Identification and localization extracellular calcium-sensing receptor in rat intestine.** *Am. J. Physiol.*, **274**:122-130, 1998.

CODINA, J. & DUBOSE Jr, T. D. **Molecular regulation and physiology of the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases in kidney.** *Semin. Nephrol.* **26**:345-351, 2006

DAGHER, G.; THOMAS, S. R.; GRIFFITHS, N.; SIAUME-PEREZ, S.; SAUTEREY, C. **Calcitonin activates an Na<sup>+</sup> independent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dependent pathway in the rabbit distal convoluted tubule.** *Am. J. Physiol.*, **273**:97-104, 1997.

De ROUFFIGNAC, C.; & QUAMME, G. **Renal magnesium handling and its hormonal control.** *Physiol. Rev.*, **74**:305-322, 1994.

EL-HAJJ, F. 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.

FAN, G.; GOLDMISTH, P. K.; COLLINS, R.; DUNN, C. K.; KRAPCHO, K. J.; ROGERS, K. V.; SPIEGEL, A. M. **N-linked glycosylation of the lumen Ca<sup>2+</sup> receptor is essential for its expression of the cell surface.** *Endocrinology*, **138**:1916-1922, 1997.

FERNANDEZ, R. & MALNIC, G. **H<sup>+</sup> ATPase and Cl<sup>-</sup> interaction in regulation of MDCK cell pH.** *J. Membr. Biol.* **163**: 137-145, 1998.

FERNANDEZ, R.; GIEBISCH, G.; GEIBEL, J. P. **Intracellular Ca<sup>2+</sup> modulates H<sup>+</sup> ATPase activity in intercalated cells from mouse cortical collecting duct (CCD).** *Faseb Journal* **19** (4): A139-A139, 2005.

FISKE, C. H. & SUBBAROW, Y. **The colorimetric determination of phosphorus.** *J. Biol. Chem.*, **66**(2):375-400, 1925.

FRIEDMAN, P., A. & GESEK, F., A. **Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms and regulation.** *Physiol. Rev.*, **75**:429-471, 1995.

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.

GARRETT, J.; TAMIR, H.; KIFOR, O.; SIMIN, R. T.; ROGERS, K. V.; MITHAL, A.; GAGEL, R. F.; BROWN, E. M. **Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene.** *Endocrinology*, **136**:5202-5211, 1995b.

GILL, J. J. & BARTTER, F. **On the impairment of renal concentrating ability in prolonged hypercalcemia and hypercalciuria in man** *J. clin. Invest.*, **40**:716-722, 1961

- GUMZ, M. L.; LYNCH, J.; GREENLEE, M. M.; CAIN, B. D.; WINGO, C. S. **The renal H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases: physiology, regulation and structure.** *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**:12-21, 2010
- HEBERT, S., C. **Extracellular calcium-sensing receptor: implications for calcium and magnesium handling in the kidney.** *Kidney Int.*, **50**:2129-2139, 1996.
- HEBERT, S. C.; BROWN, E. M.; HARRIS, H. W. **Role of Ca<sup>2+</sup> sensing receptors in divalent mineral ion homeostasis.** *J. Exp. Biol.*, **200**:295-302, 1997.
- HEBERT, S. C.; CHENG, S.; GEIBEL, J. **Functions and roles of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in the gastrointestinal tract.** *Cell Calcium*, **35**:239-247, 2004
- HINTON, A.; BOND, S.; FORGAC, M. **V-ATPase functions in normal and disease processes.** *Pflugers Arch - Eur. J. Physiol.*, **457**:589-598, 2009
- HO, C.; CONNER, D. A.; POLLAK, M. R.; LADD, D. J.; KIFOR, O.; WARREN, H. B.; BROWN, E. M.; SEIDMAN, J. G.; SEIDMAN, C. E. **A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism.** *Nat. Genet.*, **11**:389-394, 1995.
- HORISBERGER, J. D. & DOUCET, A. **Renal Ion-translocating ATPases: The P-type family.** In: SELDIN, D.W; GIEBISCH, G. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology.* 3<sup>a</sup> Ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 139-170.
- HOU, Y.; WU, Q.; DELAMERE, N. A. **H<sup>+</sup>-ATPase-mediated cytoplasmic pH-responses associated with elevation of cytoplasmic calcium in cultured rabbit nonpigmented ciliary epithelium.** *J. Membr. Biol.*, **182**:81-90, 2001.
- 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.
- HUANG, C.; SINDIC, A.; HILL, C. E.; HUJER, K. M.; CHAN, K. W.; SASSEN, M.; WU, Z.; KURACHI, Y.; NIELSEN, S.; ROMERO, M. F.; MILLER, R. T. **Interaction of the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor with the inwardly-rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function.** *Am. J. Physiol.*, **292**:1073-1081, 2007.
- HUANG, C. & MILLER, R., T. **Novel Ca receptor signaling pathways for control of renal ion transport.** *Curr. Opin. Nephrol. Hyperten.* **19**:106-112, 2010.
- JESUS FERREIRA, M. C. & BAILLY, C. **Extracellular Ca<sup>2+</sup> decreases chloride reabsorption in rat CTAL by inhibiting cAMPc pathway.** *Am. J. Physiol.*, **275**:F198-F203, 1998.
- JESUS FERREIRA, M. C.; HELICS-TOUSSAINT, C.; IMBERT-TEBOUL, M.; BAILLY, C.; VERBAVATZ, J. M.; BELLANGER, A. C.; CHABARDES, D. **Coexpression of a Ca<sup>2+</sup> - inhibitable adenylyl-cyclase and of a Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of**

**hormone-dependent camp accumulation by extracellular Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.*, 273:15192-15202, 1998.**

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos.** Tradução: Maria Dalva et. Al - Barueri, SP. **Ed. Manole**, 2005.

KHADOURI, C.; MARSY, S.; BARLET-BAS, C.; DOUCET, A. **Short-term effect of aldosterone on NEM sensitive ATPase in rat collecting tubule. *Am. J. Physiol.*, 257:177-181, 1989.**

KIM, J.; KIM, Y. H.; CHA, J. H.; TISHER, C. C.; MADSEN, K. M. **Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10:1-12, 1999.**

KIM, Y.; KWON, T.; FRISCHE, S.; KIM, J.; TISHER, C.; MADSEN, K.; NIELSEN, S. **Immunocytochemical localization of pendrin in intercalated cell subtypes in rat and mouse kidney. *Am. J. Physiol.*, 283:744-754, 2002.**

KIRCHHOFF, P. & GEIBEL, J. P. **Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology. *World J. Gastroenterol.*, 12:3229–3236, 2006**

KOPIC, S.; MUREK, M.; GEIBEL, J., P. **Revisiting the parietal cell. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 298:1-10, 2010**

KOS, C. H.; KARAPLIS, A. C.; PENG, J.; HEDIGER, M. A.; GOLTZMAN, D.; MOHAMMAD, K. S.; GUISE, T. A.; POLLAK, M. R. **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.*, 44:97-105, 1994.**

LEE HAMM, L. & NAKHOUL, N. L. **Renal acidification.** In *The Kidney*. 8<sup>a</sup> ED. – BRENNER, B. M. Editora 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.**

LEVINE, D. Z.; IACOVITTI, M.; BUCKMAN, S.; HARRISON, V. **In vivo modulation of rat distal tubule net HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> flux by VIP, isoproterenol, angiotensin II and ADH. *Am. J. Physiol.*, 266:878-883, 1994.**

MADSEN, K. M.; VERLANDER, J. W.; KIM, J.; TISHER, C. C. **Morphological adaptation of the collecting duct to acid-base disturbances. *Kidney Int. Suppl.*, 33:57-63, 1991.**

MARX, S. J.; ATTIE, M. F.; STOCK, J. L.; SPIEGEL, A. M.; LEVINE, M. A. **Maximal urine-concentrating ability: familial hypocalciuric hypercalcemia versus typical primary hyperparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52:736-740, 1981.**

MASU, M.; TANABE, Y.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; NAKAMISHI, S. **Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor.** *Nature*, **349**:760-764, 1991.

MELLO-AIRES, M. & MALNIC, G. **Distal tubule bicarbonate transport.** *J. Nephrol.*, **5**:97-111, 2002. - Review

MELLO AIRES, M. **Fisiologia.** 3ª. Ed. , Rio de Janeiro. Editora Guanabara - Koogan, 2008.

MOE, O. W. & HUANG, C.L. **Hypercalciuria from acid load: renal mechanisms.** *J. Nephrol.*, **9**:53-61, 2006

MURER, H.; HERNANDO, N.; FORSTER, I.; BIBER, J. **Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms.** *Physiol. Rev.*, **80**:1375-1409, 2000.

NEMETH, E. F. & SCARPA, A. **Rapid mobilization of cellular Ca<sup>2+</sup> in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor.** *J. Biol. Chem.*, **202**:5188-5196, 1987.

OLIVEIRA-SOUZA, M. & MELLO-AIRES, M. **Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on pHi regulation in MDCK cells.** *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **279**:944-953, 2000

OLIVEIRA-SOUZA M.; MUSA-AZIZ, R.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES M. **Arginine vasopressin stimulates H<sup>+</sup>-ATPase in MDCK cells via V1 (cell Ca<sup>2+</sup>) and V2 (cAMP) receptors.** *Am. J. Physiol.*, **260**:402-408, 2004.

OKUDA, M.; CHENG, S.; HALL, A. E.; HEBERT, S. C. **Calcium-sensing receptor regulates the activity of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase in the renal proximal tubule (abstract).** *J. Am. Soc. Nephrol.*, **12**:3956, 2001.

PALMER, B. F. & ALPERN, R., J. **Metabolic alkalosis.** *J. Am. Soc. Nephrol.*, **8**:1462-1469, 1997.

PEARCE, S. H.; WILLIAMSON, C.; KIFOR, O.; BAI, M.; COULTHARD, M. G.; DAVIES, M.; LEWIS-BARNED, N.; MCCREDE, D.; POWELL, H.; KENDALL-TAYLOR, P.; BROWN, E. M.; THAKKER, R. V. **A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor.** *N. Engl. J. Med.*, **335**:1115-1122, 1996.

POCH, E.; BOTEY, A.; GAYA, J.; CASES, A.; RIVERA, F.; REVERT, L. **Intracellular calcium mobilization and activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in platelets.** *Biochem. J.*, **290**:617-622, 1993.

POLLAK, M. R.; BROWN, E. M.; CHOU, Y.; HEBERT, S. C.; MARX, S. J.; STEINMANN, B.; LEVY, T.; SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J. G. **Mutations in the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism.** *Cell.*, **75**:1297-1303, 1993.

- RAY, J. M.; SQUIRES, P. E.; CURTIS, S. B.; MELOCHE, M. R.; BUCHAN, A. M. **Expression of the calcium-sensing receptor on human antral gastrin cells in culture.** *J. Clin. Invest.*, **99**:2328-2333, 1997.
- REMY, C.; KIRCHHOFF, P.; HAFNER, P.; BUSQUE, S. M.; MULLER, M. K.; GEIBEL, J. P.; WAGNER, C., A. **Stimulatory pathways of the calcium-sensing receptor on acid secretion in freshly isolated human gastric glands.** *Cell Physiol. Biochem.* **19**:33-42, 2007
- RENKEMA, K. Y.; VELIC, A.; DIJKMAN, H. B.; VERKAART, S.; VAN DER KEMP, A., W.; NOWIK, M.; TIMMERMANS, K.; DOUCET, A.; WAGNER, C. A.; BINDELS, R., J.; HOENDEROP, J. G. **The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis** *J.Am.Soc.Nephrol.-Express.*, May, 21, 2009.
- RICCARDI, D.; LEE, W. S.; LEE, K.; SEGRE, G. V.; BROWN, E. M.; HEBERT, S. C. **Localization of the extracellular Ca<sup>2+</sup>/polyvalent cation-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney.** *Am. J. Physiol.*, **271**:951-956, 1996.
- RICCARDI, D.; HALL, A. E.; CHATTOPADYHAY, N.; XU, J. Z.; BROWN, E. M.; HEBERT, S. C. **Localization of the extracellular Ca<sup>2+</sup>/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney.** *Am. J. Physiol.*, **274**:611-622, 1998.
- RICCARDI, D. & GAMBA, G. **The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease.** *Arch. Med. Res.*, **30**:436-448, 1999.
- RICCARDI, D.; FINNEY, B., A.; WILKINSON, W., J.; KEMP, P., J. **Novel regulatory aspects of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor, CaR.** *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* **458**: 1007-1022, 2009
- ROSOFF, P. M. & CANTLEY L. C. **Stimulation of the T3-T cell receptor-associated Ca<sup>2+</sup> influx enhances the activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a leukemic human T cell line.** *J. Biol. Chem.*, **260**:14053-14059, 1985.
- ROTHENBERGER, F.; VELIC, A.; STEHBERGER, P. A.; KOVACIKOVA, J.; WAGNER, C. A. **Angiotensin II stimulates vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity in renal acid-secretory intercalated cells from the outer medullary collecting duct.** *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**:2085-2093, 2007
- ROUSE, D. & SUKI, WN. **Modulation of phosphate absorption by calcium in the rabbit proximal convoluted tubule.** *J. Clin. Invest.*, **76**:630-636, 1985.
- 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.
- SANDS, J. M.; NARUSE, M.; BAUM, M. A.; JO, I.; HEBERT, S. C.; BROWN, E. M.; HARRIS, H. W. **Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeabilities in rat kidney inner medullary collecting duct.** *J. Clin. Invest.*, **99**:1399-1405, 1997.

- SANDS, J. M.; FLORES, F. X.; KATO, A.; BAUM, M.A.; BROWN, E.M.; WARD, D. T.; HEBERT, S. C.; HARRIS, H. W. **Vasopressin-elicited water and urea permeabilities are altered in the inner medullary collecting duct in hypercalcemic rats.** *Am J. Physiol.*, **274**:978-985, 1998.
- 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**:653-665, 2009.
- SCHUSTER, V. L. **Function and regulation of collecting duct intercalated cells.** *Annu. Rev. Physiol.*, **55**:267-288, 1993.
- SILVER, R. B.; BRETON, S.; BROWN, D. **Potassium depletion increases proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) activity in intercalated cells of cortical collecting duct.** *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**:195-202, 2000.
- SLOTKI, I. N.; SCHWARTZ, J. H.; ALEXANDER, E. A. **Effect of increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> on inner medullary collecting duct cell pH.** *Am. J. Physiol.* **257**:210-217, 1989.
- SUKI, W., N.; EKNOYAN, G.; RECTOR Jr, F., C.; SELDIN, D., W. **The renal diluting and concentrating mechanism in hypercalcemia.** *Nephron*, **6**:50-61, 1969.
- TAMIR, H.; LIU, K. P.; ADLERSBERG, M.; HSIUNG, S. C.; GERSHON, M. D. **Acidification of serotonin-containing secretory vesicles induced by a plasma membrane calcium receptor.** *J. Biol. Chem.*, **271**:6441-6450, 1996.
- THAKKER, R. V. **Disorders of the calcium-sensing receptor.** *Biochim. et Biophys. Acta.*, **1448**:166-170, 1998.
- TORNQUIST, K. & TASHJIAN Jr, A. H. **Importance of transients in cytosolic free calcium concentrations on activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in GH4C1 pituitary cells.** *Endocrinology*, **128**:242-250, 1991.
- TSUGANEZAWA, H.; KOBAYASHI, K.; IYORI, M.; ARAKI, T.; KOIZUMI, A.; WATANABE, S.I.; KANEKO, A.; FUKAO, T.; MONKAWA, T.; YOHIDA, T.; KIM, D. K.; KANAI, Y.; ENDOU, H.; HAYASHI, M.; SARUTA, T. **A new member of the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-Intercalated cells in the kidney.** *J. Biol. Chem.*, **276**:8180-8189, 2001.
- 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.
- YANG, T.; HASSAN, S.; HUANG, Y. G.; SMART, A. M.; BRIGGS, J. P.; SCHINERMANN, J. B. **Expression of PTHrP, PTH/PTHrP receptor, and Ca<sup>2+</sup> sensing receptor mRNAs along the rat nephron.** *Am. J. Physiol.*, **272**:751-758, 1997.

VERLANDER JW; MOUDY RM; CAMPBELL WG; CAIN BD; WINGO CS. **Immunohistochemical localization of H-K-ATPase alpha(2c)-subunit in rabbit kidney.** *Am.J.Physiol.*, **281**:357-365, 2001.

VILLERREAL, M. L, **Sodium fluxes in human fibroblasts: effect of serum, Ca<sup>2+</sup>, and amiloride.** *J. Cell. Physiol.*, **107**:359-369, 1981.

WAGNER, C. A.; BRETON, S.; BROWN, D.; GIEBISCH, G.; GEIBEL, J. **Stimulation of H<sup>+</sup> -ATPase in intercalated cells from isolated mouse cortical collecting ducts by Angiotensin.** *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**:A0054, 2001.

WAGNER, C., A.; FINBERG, K., E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; GEIBEL, J., P. **Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase.** *Physiol. Rev.*, **84**:1263-1314, 2004.

WAGNER, C., A.; DEVUYST, O.; BOURGEOIS, S.; MOHEBBI, N. **Regulated acid-base transport in the collecting duct.** *Pflugers Arch - Eur. J. Physiol.*, **458**:137-156, 2009.

WANG, W. H.; LU, M.; HEBERT, S. C. **Cytochrome P-450 metabolites mediate extracellular Ca<sup>2+</sup> induced inhibition of apical K<sup>+</sup> channels in the TAL.** *Am. J. Physiol.*, **271**:103-111, 1996.

WANG, W. H.; LU, M.; BALAZI, M.; HEBERT, S. C. **Phospholipase A2 is involved in mediating the effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> on apical K<sup>+</sup> channels in rat TAL.** *Am. J. Physiol.*, **273**:421-429, 1997.

WARD, D. T. & RICCARDI, D. **Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor.** *Pflugers Arch.- Eur. J. Physiol.*, **445**:169-176, 2002.

WARD, D., T. **Calcium receptor-mediated intracellular signaling.** *Cell Calcium*, **35**: 217-228, 2004.

WINTER, C.; SCHULZ, N.; GIEBISCH, G.; GEIBEL, J., P.; WAGNER, C., A. **Nongenomic stimulation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases in intercalated renal tubule cells by aldosterone.** *Proc. Natl. Acad. Sci. US.A*, **101**:2636-2641, 2004.