

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**PRISCILLA MARYS COSTA DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DO RECEPTOR SENSÍVEL A CÁLCIO EXTRACELULAR (CaSR)  
SOBRE A ATIVIDADE DA H<sup>+</sup>-ATPase VACUOLAR EM CÉLULAS  
DO TÚBULO PROXIMAL**

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Fernández Perez

**CURITIBA  
2012**

**PRISCILLA MARYS COSTA DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DO RECEPTOR SENSÍVEL A CÁLCIO EXTRACELULAR (CaSR) SOBRE A  
ATIVIDADE DA H<sup>+</sup>-ATPase VACUOLAR EM CÉLULAS  
DO TÚBULO PROXIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de Mestre.

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Fernández Perez.

**CURITIBA**

**2012**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

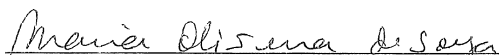


## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **PRISCILLA MARYS COSTA DOS SANTOS** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

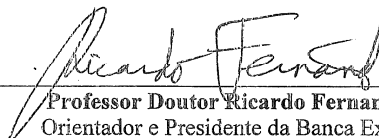
Curitiba, 31 de maio de 2012



Professora Doutora Maria Oliveira de Souza  
USP- Membro Titular



Professora Doutora Viviane Prodocimo  
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Ricardo Fernandez Perez  
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

**DEDICATÓRIA**

---

Aos meus pais, Rubens e Rose, cujo carinho, orientação e dedicação me levaram a desenvolver a curiosidade científica.

*Priscilla Marys Costa dos Santos*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Fernández Perez a orientação e exemplo de dedicação, humanidade e ética dentro da prática científica.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Tararhuch a colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná por partilharem seus conhecimentos e contribuírem para a minha formação. Em especial ao Prof. Dr. Renato Rizzo Ventura que sempre se mostrou muito disponível para sanar minhas dúvidas ao longo do mestrado.

Ao prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes os equipamentos cedidos para a realização do presente estudo.

Aos funcionários do Setor de Ciências Biológicas desta instituição.

Ao estagiário Deividi Jack do Amaral a colaboração nos experimentos bioquímicos envolvendo cálcio extracelular.

Aos colegas de laboratório Henrique Demeneck, Isabela Coelho e Mauro Ricetti a companhia e apoio durante a realização deste projeto. Um agradecimento especial à Anna Gabriele Coutinho pela amizade.

Às amigas Adriana Yamaguchi, Andressa Perin, Anelise Lago, Angela Lago, Dabna Tomim, Eloísa Franco, Evandra Pereira, Fabíola Nihí, Glaucia Tobaldini, Juliane Ceron e ao amigo Fernando Casare o apoio, a atenção e a compreensão durante estes dois anos.

Ao corpo discente do departamento de Fisiologia como um todo pelas companhias agradáveis e as discussões que sempre contribuem para o nosso crescimento e construção do saber.

A CAPES o auxílio financeiro prestado.

À minha cunhada Grace o incentivo e palavras de carinho em momentos difíceis.

Aos meus avós Eletra, Aluízio (*in memoriam*), Maria (*in memoriam*) e Aparecido (*in memoriam*) que desde muito cedo me ensinaram o valor do conhecimento.

À minha irmã Pâmela, ao meu irmão Rubens e aos meus pais Rubens e Rose o amor e o carinho dedicados a mim durante todos os dias de minha vida.

A Deus pela oportunidade de vivenciar todos os desafios que me foram impostos durante esta fase de minha formação acadêmica. Sem eles eu não teria saído do lugar.

A todos meus sinceros agradecimentos.

A tarefa mais importante de um cientista é certamente contribuir para o avanço de sua área de conhecimento. A segunda tarefa mais importante é escapar da visão estreita de uma especialização excessiva, interessando-se ativamente por outros campos em busca do aperfeiçoamento pelo saber que é a missão cultural da ciência. A terceira tarefa é estender aos demais a compreensão de seus conhecimentos, reduzindo ao mínimo o jargão científico, do qual muitos de nós temos orgulho. Um orgulho desse tipo é compreensível. Mas ele é um erro. Deveria ser nosso orgulho ensinar a nós mesmos, da melhor forma possível, a sempre falar tão simplesmente, claramente e despretensiosamente quanto possível, evitando como uma praga a sugestão de que estamos de posse de um conhecimento que é muito profundo para ser expresso de maneira clara e simples. Esta é, eu acredito, uma das maiores e mais urgentes responsabilidades sociais dos cientistas. Talvez a maior. Porque esta tarefa está intimamente ligada à sobrevivência da sociedade aberta e da democracia.

*Karl Raimund Popper*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x-xiii
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	xiv- xv
<b>RESUMO</b> .....	xvi-xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1-13
1.1 Túbulo proximal.....	1-2
1.2 O Receptor Sensível a Cálcio Extracelular (CaSR).....	3-7
1.3 Papel do CaSR nos rins.....	8-13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14-23
3.1 Cultivo Celular.....	14
3.2 Estudos bioquímicos da atividade da H <sup>+</sup> -ATPase <sub>v</sub> .....	14-19
3.2.1 Obtenção do homogenato celular.....	14-15
3.2.2 Obtenção de membrana parcialmente purificada.....	15
3.2.3 Determinação bioquímica da atividade das H <sup>+</sup> -ATPases <sub>v</sub> no homogenato e em membrana parcialmente purificada.....	15-19
3.2.4 Quantificação proteica.....	19
3.3 Determinação do pH e Ca <sup>2+</sup> intracelulares.....	19-22
3.3.1 Mensuração do pH <sub>i</sub> .....	19-21
3.3.2 Mensuração do Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub> .....	21-22
3.4 Reagentes.....	22
3.5 Análise estatística.....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	23-39
4.1 Experimentos bioquímicos.....	23-28
4.1.2 Efeito de agonistas do CaSR sobre a atividade da H <sup>+</sup> -ATPase <sub>v</sub> em homogenato celular.....	23-24
4.1.3 Efeito de agonistas do CaSR sobre a atividade da H <sup>+</sup> -ATPase <sub>v</sub> em membranas parcialmente purificadas.....	25-26
4.1.4 Efeito da variação da [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>o</sub> sobre o CaSR e a atividade da H <sup>+</sup> -ATPase <sub>v</sub> em homogenato celular.....	26-27
4.1.5 Investigação de vias de sinalização envolvidas na ativação de CaSR em homogenato celular.....	27-28
4.2 Mensuração do pH <sub>i</sub> .....	28-32
4.2.1 Curva de calibração de Nigericina.....	29-30
4.2.2 Efeito da adição de agonista do CaSR sobre o pH <sub>i</sub> .....	30-32
4.3 Mensuração do Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub> .....	32-39
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	39-46
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47-55

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Protocolo CaSR $Gd^{3+}$ (300 $\mu$ M) e Neomicina (200 $\mu$ M).....	18
<b>Tabela 2:</b> Protocolo CaSR com $[Ca^{2+}]_o$ variando de 0 a 2Mm.....	18
<b>Tabela 3:</b> Protocolo CaSR PKC e Fosfolipases C e $A_2$ .....	19
<b>Tabela 4:</b> $I_{495} / I_{440}$ em função do $pH_o$ em células OK. Os valores correspondem à média $\pm$ EP. # $p < 0.05$ vs. $I_{495} / I_{440}$ a $pH 7.4$ . * $n=88/4$ .....	29
<b>Tabela 5:</b> Efeito do calcimimético Neomicina 200 $\mu$ M sobre o $pH_i$ na ausência e presença de $Na^+$ . # $p < 0.05$ vs. $\Delta pH_i$ com solução livre de $Na^+$ .....	32



expressar apical e/ou basolateralmente. PCT/PST (túbulo proximal), tDL/tAL (ramo descendente/ascendente espesso).  $mTAL/cTAL$  (ramo ascendente espesso medular/apical). JGA (aparato justaglomerular); TRPV5 (*transient receptor potential vanilloid 5*); PMCA ( $Ca^{2+}$ -ATPases de membrana plasmática); Vit. D (vitamina D); VRD (receptor para vitamina D); NKCC2 (co-transportador  $Na^+-K^+-2Cl^-$ ); ROMK (canal de  $K^+$  na medula renal externa); PTH (hormônio paratireoideo); AQP<sub>2</sub> (Aquaporina 2). (Modificada de Riccardi, 2009.).....10

**Figura 6:** Papel do CaSR na regulação do transporte de íons e na atividade dos segundos mensageiros da porção cortical do ramo espesso de Henle (cTAL). (Modificada a partir de Brown & McLoed, 2001).....12

**Figura 7:** Efeito estimulatório na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>.....24

**Figura 8:** Efeito estimulatório na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>.....24

**Figura 9:** Efeito estimulatório na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em membranas parcialmente purificadas de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>.....25

**Figura 10:** Efeito estimulatório na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em membranas parcialmente purificadas de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>.....26

**Figura 11:** Efeito dose-dependente da concentração de  $Ca^{2+}_o$  (0 a 2.0mM) sobre a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> + 0mM de  $Ca^{2+}$ ; &  $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> +  $Ca^{2+}$  0.5mM.....27

**Figura 12:** Efeito estimulatório sobre a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> pela adição agonista do CaSR ( $Gd^{3+}$  300 $\mu$ M), ativação da via PKC (PMA -  $10^{-7}$ M) e inibição da via PLC (U-73122 -  $5 \times 10^{-7}$ M) em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>; &  $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> +  $Gd^{3+}$ ; # $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> +  $Gd^{3+}$ .....28

**Figura 13:** Gráfico representativo da  $I_{495} / I_{440}$  em função do  $pH_o$  em células OK....29

<b>Figura 14:</b> Curva de regressão linear da $I_{495} / I_{440}$ em função do $pH_i$ em células OK.....	30
<b>Figura 15:</b> Alcalinização de células OK frente à adição de Neomicina $200\mu M$ diretamente no meio de preparação. O $pH_i$ aumentou significativamente com relação ao controle; $n=16/3$ , $p<0.0001$ . Os valores correspondem à média $\pm$ EP.....	30
<b>Figura 16:</b> Efeito da ativação do CaSR sobre os mecanismos de extrusão de prótons dependentes e independentes de $Na^+$ em células OK. Os valores correspondem à média $\pm$ EP.....	31
<b>Figura 17:</b> Aumento da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de $Gd^{3+}$ ( $300\mu M$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%) $\pm$ EP comparado com o valor basal.....	33
<b>Figura 18:</b> Aumento da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de Neomicina ( $200\mu M$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%) $\pm$ EP comparado com o valor basal.....	34
<b>Figura 19:</b> Aumento da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de Neomicina ( $200\mu M$ ) e ativação da via PKC (PMA $10^{-7}M$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%) $\pm$ EP comparado com o valor basal.....	35
<b>Figura 20:</b> A inibição da via PLC (U-73122 $5 \times 10^{-7}M$ ) não evitou o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela adição de Neomicina em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%) $\pm$ EP comparado com o valor basal. ....	36
<b>Figura 21:</b> A inibição da via PLC (U-73122 $5 \times 10^{-8}M$ ) evitou o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela adição de Neomicina em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%) $\pm$ EP comparado com o valor basal. ....	37
<b>Figura 22:</b> Diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ pela incubação com Tapsigargina ( $0.1\mu M$ ) por 15 minutos e posterior efeito da adição de Neomicina ( $200\mu M$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento/diminuição de UFA em percentagem (%) $\pm$ EP comparado com o valor basal.....	38
<b>Figura 23:</b> Diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ pela incubação com Tapsigargina ( $0.1\mu M$ ) por 15 minutos em solução livre de $Ca^{2+}$ e posterior efeito da adição de Neomicina ( $200\mu M$ )	

em células OK. Os valores correspondem à média de diminuição de UFA em percentagem (%)  $\pm$  EP comparado com o valor basal.....39

**Figura 24:** Modulação da atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> e do NHE-3 (contra-transportador  $Na^+/H^+$  isoforma 3) pelo CaSR em células OK. **Legenda:** **AC**, anidrase carbônica; **PKC**, proteína quinase C; **IP<sub>3</sub>**, Inositol 1,4,5 trifosfato; **PLC**, fosfolipase C; **CaSR**, Receptor sensível a Cálcio; **Gd<sup>3+</sup>**, gadolínio; **Neom.**, Neomicina.....46

## LISTA DE AVREVIÇÕES

- AMPC 3',5'-Monofosfato de Adenosina Cíclico
- AQP Aquaporinas
- AQP<sub>2</sub> Aquaporinas tipo 2
- Ba<sup>2+</sup> Bário
- Be<sup>2+</sup> Berílio
- CaSR Receptor extracelular sensível a cálcio
- Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> Cálcio extracelular
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> Concentração de cálcio extracelular
- Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> Cálcio intracelular
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Concentração de cálcio intracelular
- CT Calcitonina
- DAG 1,2 diacilglicerol
- DCC Ducto coletor cortical (*Cortical Collecting Duct*)
- ERK Quinase reguladora de sinal extracelular
- FHH Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar
- Gd<sup>3+</sup> Gadolínio
- H<sup>+</sup> Próton
- H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar
- HEK293 Células embrionárias de rim humano
- IMCD Ducto Coletor Medular Interno (*inner medullary collecting duct*)
- IP<sub>3</sub> Inositol 1,4,5 trifosfato
- JNK Quinase jun amino-terminal
- La<sup>3+</sup> Lantânio
- LLC-PK1 *Lilly Laboratories Cell – Porcine Kidneys*
- MDCK *Madin-Darby canine kidney*
- mGluR Receptor metabotrópico para glutamato
- NBC1 Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- NHE-3 Trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> isoforma 3
- NKCC2 Co-transportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>
- NHSPT Hiperparatireoidismo Neonatal Severo
- OK *Opossum Kidney*
- OMCD Ducto Coletor Medular Externo (*Outer Medullary Collecting Duct*)

PCT Túbulo Contorcido Proximal  
PMA Forbol-12-Miristato-13-Acetato  
PST Túbulo Proximal Reto  
pH<sub>i</sub> pH intracelular  
pH<sub>0</sub> pH extracelular  
P<sub>i</sub> Fosfato inorgânico  
PI3K Fosfatidilinositol 3-quinase-mediada  
PI4K Fosfatidilinositol 4-quinase  
PIP<sub>2</sub> 4,5 – bifosfato MAP quinase  
PKA Proteína Quinase A  
PKC Proteína Quinase C  
PLA<sub>2</sub> Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PLC Fosfolipase C  
PMCA (Ca<sup>2+</sup> -ATPases de membrana plasmática)  
PMSF Fenil-Metil-Sulfonil Fluorito  
PTH Hormônio Paratireoideo ou Paratormônio  
p38 MAP quinase p38  
ROMK Canal de K<sup>+</sup> na medula renal externa  
Sr<sup>2+</sup> Estrôncio  
TAL ramo espesso da alça de Henle (*Thick Ascending Limb*)  
TRPV5 (*transient receptor potential vanilloid 5*)  
Vit. D Dihidroxicálciferol - 1,25(OH)<sub>2</sub>D  
VRD Receptor para vitamina D

## ABSTRACT

Regulation of transport proteins in renal tubular epithelium is dependent on several factors, including the concentration of ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$ ) and hormones such as antidiuretic hormone (ADH), parathyroid hormone (PTH), angiotensin II and aldosterone. These factors modulates the activity of both apical and basolateral transporters. Recently it has been demonstrated that the calcium sensing receptor (CaSR) is present in several tubular segments from the proximal tubule to the collecting duct. Recent results suggest that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  modulates proton secretion independent of  $\text{Na}^+$  in intercalated cells of cortical collecting duct (CCD) and outer medullary collecting duct OMCD. Thus, increasing the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and/or directly stimulating the CaSR is possible to register a modulation in the flow of ions transported in these tissues. Proximal tubule plays a critical role in tubular transport of ions and expresses the CaSR in the apical membrane. The objectives of the present work were to characterize the biochemical activity of vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase pump in Opossum Kidney (OK) cells and its relationship with the CaSR and register possible changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) from the addition of receptor agonists or drugs involved in the activation of intracellular signaling pathways directly in the preparation using fluorescence microscopy. OK cells from passages 7 to 29 were utilized. Serial cultures were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified 95% air and 5%  $\text{CO}_2$  incubator. The reaction to determine vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase pump activity and its relationship with the CaSR was started by addition of cell homogenates to tubes contained the assay medium. The inorganic phosphate ( $\text{P}_i$ ) release was determined by a colorimetric method. The  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> activity was determined from the differences between  $\text{P}_i$  released in the absence and presence of  $10^{-7}\text{M}$  bafilomycin. The change in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and pH were determined utilizing fluorescence microscopy. The CaSR was stimulated by the agonists Neomycin ( $200\mu\text{M}$ ) or  $\text{Gd}^{3+}$  ( $300\mu\text{M}$ ). Homogenates of OK cells present a bafilomycin-sensitive activity (vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase). Basal vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase activity was significantly stimulated by  $\text{Gd}^{3+}$  and Neomycin. In the experiments with partly purified membrane the basal vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase activity also was significantly stimulated by  $\text{Gd}^{3+}$  and Neomycin. ATPase activity was stimulated in dose-dependent fashion as extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was increased between 0 and  $2\text{ mmol. L}^{-1}$ . The agonists  $\text{Gd}^{3+}$  and Neomycin determined a sustained and significant rise of cytosolic ionized calcium during the period registered. Neomycin with PMA ( $10^{-7}\text{M}$ ) determined a sustained and significant rise of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  during the period registered. The stimulation of CaSR in OK cells leads in enhanced of vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase activity, intracellular alkalinization and increase the levels of cytosolic calcium.

**Keywords:** Calcium Sensing Receptor (CaSR),  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>, OK Cells

## RESUMO

A regulação de proteínas de transporte no epitélio tubular renal é dependente de diversos fatores, incluindo a concentração de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$ ) e hormônios – hormônio antidiurético (ADH), hormônio paratireoideo (PTH), angiotensina II e aldosterona. Estes fatores modulam a atividade de transportadores apicais e basolaterais. Recentemente tem sido demonstrado que o receptor sensível a cálcio (CaSR) está presente em diversos segmentos renais - do túbulo proximal ao ducto coletor. Resultados recentes sugerem que o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular modula a secreção de prótons independente de  $\text{Na}^+$  em células intercalares do ducto coletor cortical (CCD) e do ducto coletor medular externo (OMCD). Então, aumentando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou estimulando diretamente o CaSR é possível registrar uma modulação no fluxo de íons transportados nestes tecidos. O túbulo proximal desempenha um papel crítico no transporte tubular de íons e expressa o CaSR na membrana apical. Os objetivos do presente trabalho foram caracterizar a atividade bioquímica da  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo vacuolar ( $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>) em células OK (*Opossum Kidney*) e sua relação com o CaSR, além de investigar possíveis mudanças no  $\text{Ca}^{2+}$  e pH intracelulares resultantes da adição de agonistas do receptor ou drogas envolvidas na ativação de vias de sinalização intracelulares diretamente nos meios de preparação usando microscopia de fluorescência. Células OK com passagens de 7 a 29 foram utilizadas como modelo. As culturas foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementadas com 10% de soro bovino fetal e mantidas em 95% de umidade do ar e 5% de  $\text{CO}_2$ . A reação para determinar a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> e sua relação com o CaSR era iniciada com a adição de homogenato celular nos tubos contendo o meio de preparação. O fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ) liberado foi determinado por método colorimétrico. A atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> foi determinada pela diferença entre o  $\text{P}_i$  liberado na presença e na ausência de Bafilomicina  $10^{-7}\text{M}$ . Alterações no  $\text{Ca}^{2+}$  e pH intracelulares foram determinados utilizando microscopia de fluorescência. O CaSR foi estimulado pelos agonistas Neom. ( $200\mu\text{M}$ ) ou  $\text{Gd}^{3+}$  ( $300\mu\text{M}$ ). Homogenato de células OK apresentaram atividade sensível a Bafilomicina ( $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>). A atividade basal da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> foi estimulada de forma significativa por  $\text{Gd}^{3+}$  e Neomicina. Nos experimentos com membrana parcialmente purificada a atividade basal da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> também foi estimulada de maneira significativa por  $\text{Gd}^{3+}$  e Neomicina. A atividade ATPásica foi estimulada de maneira dose- dependente da  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  variando de 0 a  $2\text{ mmol. L}^{-1}$ . Os agonistas  $\text{Gd}^{3+}$  e Neomicina determinaram um aumento significativo e sustentado dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Neomicina com PMA ( $10^{-7}\text{M}$ ) determinou um aumento significativo e sustentado do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . A estimulação do CaSR em células OK ocasionou um aumento da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>, alcalinização intracelular e incremento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

**Palavras chave:** Calcium Sensing Receptor (CaSR),  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>, Células OK

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1) O Túbulo Proximal

O túbulo proximal, o primeiro segmento tubular do nefro, consiste num segmento contorcido - o túbulo contorcido proximal (segmentos S1 e S2) –; sendo seguido por um segmento reto – o túbulo proximal reto (segmento S3) - que desce em direção à medula, perpendicular à superfície do rim. Este segmento tubular é responsável pela reabsorção de aproximadamente 67% da água filtrada,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  e outros solutos. Além disso, o túbulo proximal reabsorve quase toda a glicose e aminoácidos filtrados pelo glomérulo. A reabsorção de cada substância, incluindo água, está relacionada, de algum modo, à manutenção da atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase localizada na membrana basolateral (Brenner e Rector, 2008). Por outro lado, este segmento cumpre um papel fundamental na função renal de regulação da homeostase ácido-base através de uma secreção significativa de prótons. O contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (isoforma NHE-3) é a via predominante para a secreção de  $\text{H}^+$  pelo túbulo proximal e usa o gradiente lúmen/célula para  $\text{Na}^+$  como forma de impulsionar este processo (Brenner & Rector, 2008; Mello Aires & Malnic, 1979 e Murer e cols., 2000). Por outro lado, até 40% da secreção de  $\text{H}^+$  neste segmento é independente de  $\text{Na}^+$  e sensível a Bafilomicina, um inibidor da  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo vacuolar ( $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>) (Wagner e cols., 2004; Kinne-Saffran e cols., 1982; Ulate & cols., 1993). Observações imunocitoquímicas utilizando anticorpos específicos contra várias subunidades da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>, tais como numerosos estudos funcionais em túbulos intactos e vesículas de membrana isoladas da borda em escova, têm demonstrado que a  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> está localizada na membrana apical e em organelas intracelulares das células epiteliais do túbulo proximal (Brown e cols., 1988; Wagner e cols., 2004). Na célula,  $\text{H}^+$  e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) são produzidos por uma reação catalisada pela anidrase carbônica (AC). O  $\text{H}^+$  é secretado para o fluido tubular, enquanto o bicarbonato sai da célula pela membrana basolateral e retorna ao sangue peritubular. A maioria do  $\text{HCO}_3^-$  sai via o co-transportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC1). O processo descrito é responsável também pela reabsorção de 80% do bicarbonato filtrado (Brenner & Rector, 2008).

Os transportadores de prótons e bicarbonato presentes no túbulo proximal são regulados por diversos fatores que possibilitam a manutenção da homeostase ácido-base do organismo (Brenner & Rector, 2008). Dentre esses fatores, podemos destacar: 1) alterações no pH e na  $p\text{CO}_2$  peritubulares; 2) hipokalemia; 3) alterações no volume extracelular; 4) modificações na carga luminal de bicarbonato; 5) vários hormônios: Endotelina-1, Glicocorticoides, Angiotensina II, Aldosterona (via não-genômica), dopamina e Hormônio Paratireoide (PTH) (Laghmani e cols., 2002; Bobulescu e cols., 2005; Geibel e cols., 1990; Perger e cols., 2009; Bacic e cols., 2003; McKinney e cols., 1980; Leite-Dellova e cols., 2011). Muitos dos efeitos destes hormônios constituem respostas a situações de acidose ou alcalose; mas outros não estão relacionados à homeostase ácido-base, que se expressa de forma colateral. Vários destes hormônios e, possivelmente, outros sinais, compartilham fatores de sinalização intracelulares no túbulo proximal. Por exemplo, PTH, catecolaminas e angiotensina II, funcionam, ao menos em parte, através de modificações nos níveis intracelulares de AMPc (3',5'-Monofosfato de Adenosina Cíclico) e proteína quinase A (PKA). Estas vias estão envolvidas em parte na regulação do NHE-3 (Moe, 1999). Uma relação direta entre a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e a extrusão de prótons tem sido sugerida em vários tipos celulares (Poch, 1993; Villereal, 1981; Rosoff, 1985; Tornquist, 1991), incluindo células renais (Slotki, 1989; Burns, 1991), como as células intercalares do ducto coletor cortical (DCC) de camundongo (Fernandez, 2005).

Um dos hormônios supracitados, o PTH, constitui um bom exemplo de um fator que primariamente está vinculado ao controle do transporte tubular de dois elementos não relacionados ao equilíbrio ácido-base (cálcio e fosfato); mas que também afetam o transporte de bicarbonato neste segmento tubular. O PTH (hormônio paratireoideo ou paratormônio) de forma aguda reduz a reabsorção de  $\text{HCO}_3^-$  através de um incremento nos níveis de AMPc, o que ativa a via da PKA e leva a uma fosforilação do NHE-3 (Collazo e cols., 2000). O PTH inibe também o co-transportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  na membrana basolateral (Pastoriza-Munoz e cols., 1992; Ruiz e cols., 1996). Recentemente tem sido demonstrado que a síntese, secreção e ação do PTH no nefro são regulados por proteínas de membrana sensíveis a cálcio, CaSR (Brown, 2001). Desta forma, em tese, o CaSR poderia interferir no transporte ácido-base no túbulo proximal.

## 1.2 O Receptor sensível a cálcio extracelular (CaSR)

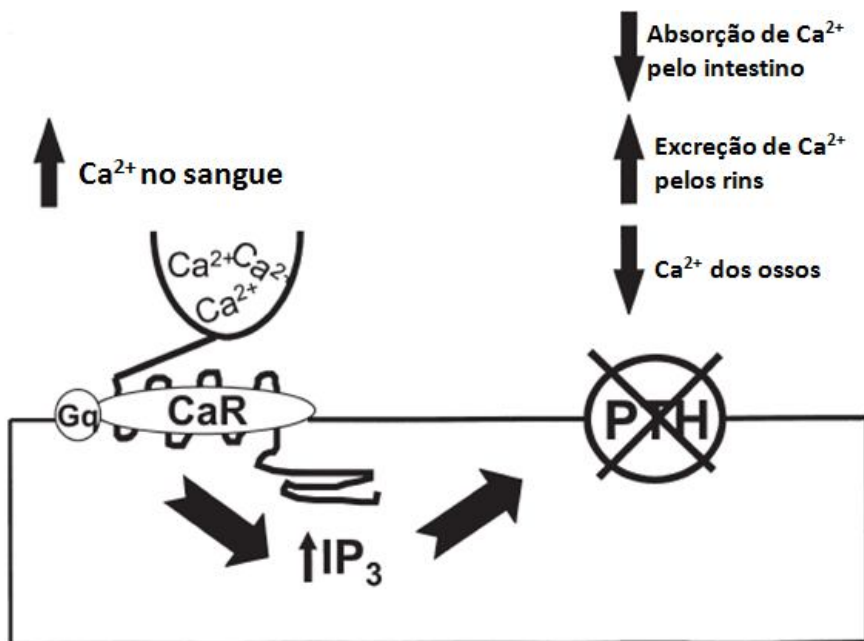
A importância do íon cálcio na regulação de funções fisiológicas no organismo foi apontada pela primeira vez no século XIX quando Sydney Ringer observou a importância deste íon para a contração do coração isolado (Ringer, 1883). Hoje já se sabe que a homeostase do cálcio tem grande importância na manutenção dos sistemas biológicos; e pode ser mantida por hormônios como o PTH, calcitonina e vitamina D<sub>3</sub> (Magno e cols., 2011). O íon cálcio tem papel importante nos meios intra e extracelular, desempenhando diversas funções essenciais nos organismos: cofator alostérico em várias reações enzimáticas (Sitaramayya, 2002; Nelson, 1976); transdução neural (Svoboda, 1997); coagulação sanguínea e contração muscular (Ganitkevich, *et. al.* 2002.; Gordon *et. al.* 2000). Além disso, o Ca<sup>2+</sup> é um componente extracelular crítico na constituição da matriz óssea, cartilagem e dentes (Wuthier, 1993; Boskey, 1992). Enquanto as variações dos níveis de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> 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 ajuste fino sobre as concentrações de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> é importante, pois é ele que desencadeia os principais mecanismos relacionados com a ação do Ca<sup>2+</sup> no organismo (Brown, 1998).

A homeostase do Ca<sup>2+</sup> é mantida pelo controle do transporte do íon em diferentes locais do organismo: intestino delgado, onde a absorção do cálcio é modulada; pelos ossos, onde pode ocorrer tanto a resorção quanto deposição de Ca<sup>2+</sup>; e pelos rins, onde a reabsorção tubular de cálcio do filtrado é controlada de acordo com as necessidades do organismo em reter ou eliminar o íon (Friedman & Gesek, 1993). Assim, os rins apresentam um papel dominante na regulação do metabolismo do cálcio; principalmente pela sua função como órgão excretor (Friedman & Gesek, 1995). Os túbulos renais possuem a capacidade de variar a reabsorção de cálcio do filtrado como forma de ajuste frente a alterações na sua ingestão ou aumento das necessidades do Ca<sup>2+</sup>. Sob condições normais, menos que 1% do cálcio filtrado é excretado na urina (Friedman & Gesek, 1995).

Nemeth e Scarpa, em 1987, utilizando o marcador para cálcio FURA-2, demonstraram que cátions divalentes no meio extracelular evocam um rápido e

transiente incremento na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}_i$  em células paratireoides de bovinos na ausência do influxo de cálcio transmembrana. Esta observação, em conjunto com outros estudos, demonstrou a existência de um receptor sensível a cálcio extracelular na superfície da membrana de células paratireoides que regularia a secreção de PTH mobilizando  $\text{Ca}^{2+}_i$  (Nemeth & Carafoli, 1990).

Atualmente já está bem estabelecido que incrementos na concentração de cálcio extracelular estimulam proteínas de membrana sensíveis a  $\text{Ca}^{2+}$  (CaSR) em células das glândulas paratireoides (Riccardi, 1999). O  $\text{Ca}^{2+}$  diminui devido ao aumento na sua excreção renal, diminuição de sua absorção pelo intestino, bem como diminuição da sua liberação pelos ossos. Estas alterações fisiológicas são todas devidas a uma redução nos níveis de PTH plasmáticos que o estímulo do CaSR promove. (Riccardi, 1999) (fig.1).



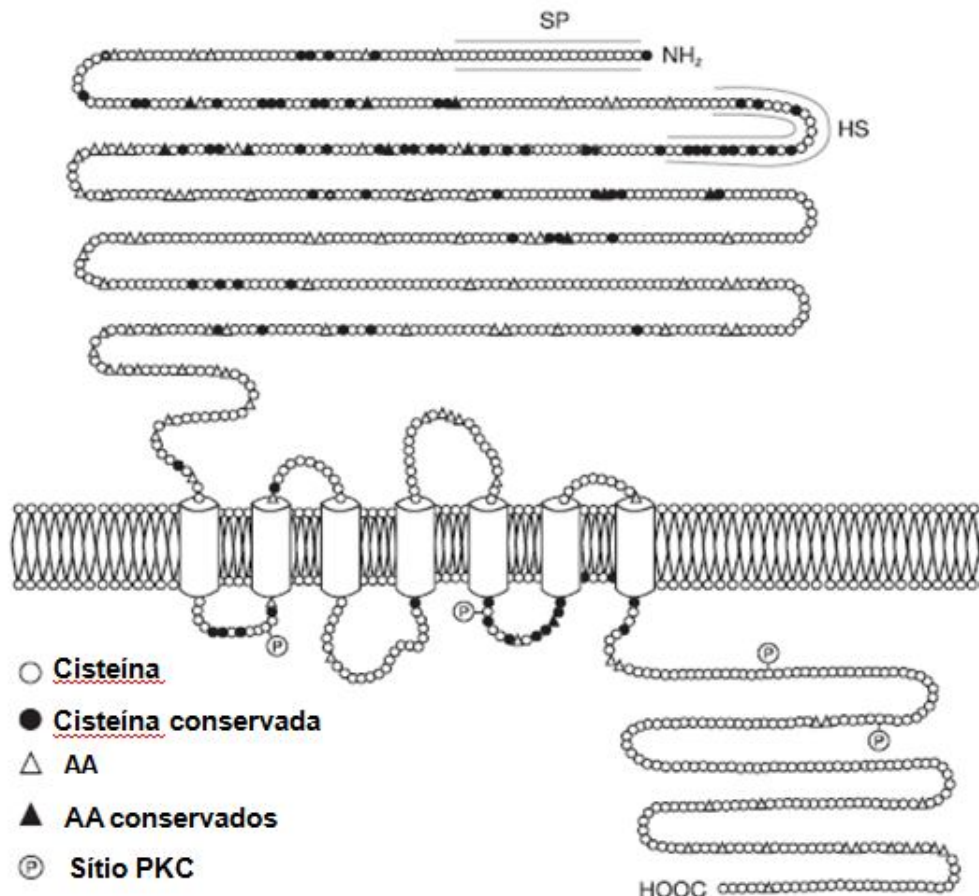
**Figura 1:** A  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  regula a secreção de PTH por estimulação de CaSR. (Modificada a partir de Riccardi, 1999).

A clonagem de CaSR foi realizada inicialmente em 1993 por Brown e seu grupo utilizando oócitos de *Xenopus laevis*, uma espécie de rã comumente usada neste tipo de experimento. Thakker (1998), utilizando esta mesma técnica, extraiu o mRNA de CaSR das glândulas paratireoides de bovinos e o inoculou em oócitos de *X. laevis*, conseguindo que estes expressassem o CaSR com as mesmas características e capacidade de resposta das glândulas bovinas. Atualmente o CaSR já foi identificado em vários tecidos: renal, ósseo, trato gastrointestinal, cardíaco,

pulmonar, pele, sistema nervoso central e periférico (Riccardi, e cols., 2009). Nos rins, o CaSR tem sido identificado com sua expressão frequentemente relacionada ao metabolismo do  $\text{Ca}^{2+}$  (Riccardi, e cols., 1996). Além disso, sabe-se que o receptor está presente em uma grande diversidade de vertebrados tais como bovinos, humanos, roedores, cães, gatos, frangos, salamandras e em várias espécies de peixes (Magno e cols., 2011). O CaSR encontrado nas diferentes espécies apresenta grande conservação da sua cadeia de aminoácidos chegando a apresentar até 93% de similaridade estrutural (Thakker, 1998). Tal semelhança ressalta a importância deste receptor para os organismos.

Um significativo nível de homologia foi identificado entre sequências de aminoácidos do CaSR bovino e dos receptores metabotrópicos para glutamato (mGluRs), os quais são parte da superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Brown e cols., 1993). CaSR e mGluR pertencem ao subgrupo de GPCRs, conhecidos como família Glutamato ou Família C; esta família tem como principal característica a presença de um grande domínio extracelular. Embora CaSR seja o primeiro membro da família C identificado que, apesar da grande homologia, diferia do mGluR, o número de membros da família C cresceu, sendo atualmente dividido em seis subgrupos: mGluRs, CaSR, Receptores GABA<sub>B</sub> (Ácido<sub>B</sub>  $\gamma$ -aminobutírico), receptores de feromônios, receptores gustativos e receptores órfãos (Pin, *et. al.*, 2003).

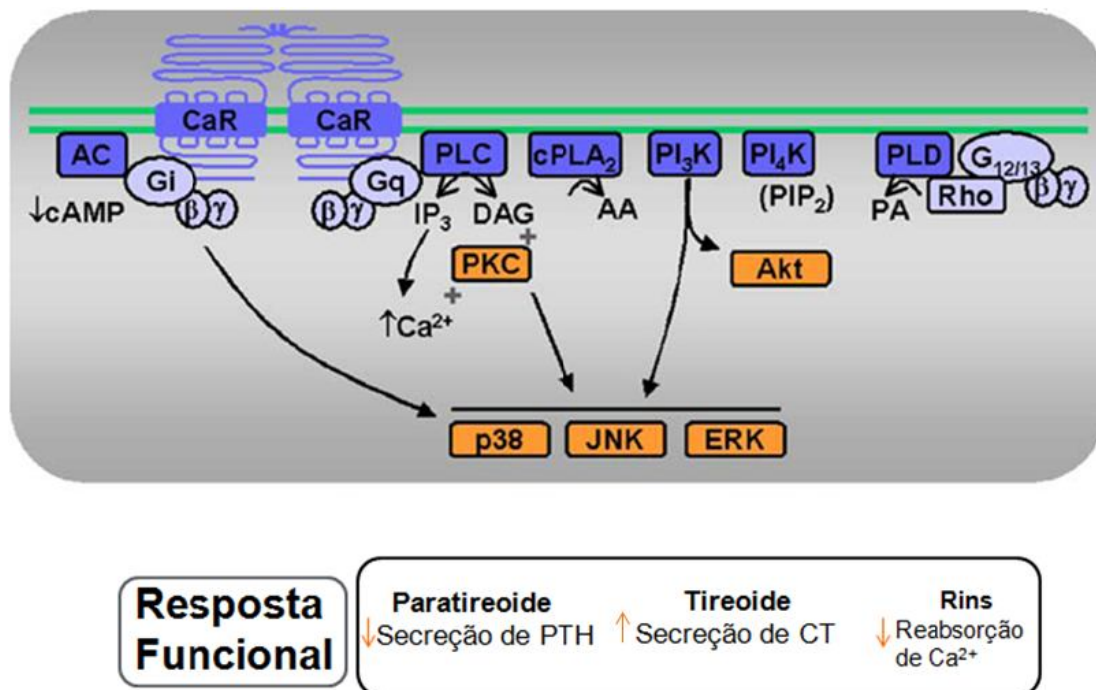
Isto posto, podemos generalizar que o CaSR integra a superfamília dos receptores transmembrana acoplados a proteína G e se apresenta dividido em três domínios: **1) domínio extracelular**, o maior, com 612 aminoácidos (AAs) ligados a esta porção (Rodriguez, 2004). É a porção aminoterminal, apresentando sítios de glicosilação que parecem ser essenciais para as funções de endereçamento, conformação e ativação do CaSR (Fan, 1997); **2) domínio transmembrana**, com 250 AAs formando 7  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas que ficam presas à membrana plasmática – característica da superfamília dos receptores acoplados a proteína G -; **3) domínio citosólico**, com uma cauda carboxi-terminal de aproximadamente 250AAs (Rodriguez, 2004). Contem sequências de AAs que podem desencadear cascatas de sinalização intracelulares (fosforilação via PKA ou PKC) (Thakker, 1998) (fig. 2).



**Figura 2:** O Receptor Extracelular Sensível a Cálcio. SP, peptídeo sinal; HS, segmento de AAs hidrofóbicos. (Modificada a partir de Rodriguez, 2004).

Agentes que estimulam diretamente o receptor por interação com o domínio extracelular são calcimiméticos do tipo I. Já os calcimiméticos do tipo II ligam-se ao domínio transmembrana e induzem uma mudança conformacional no receptor tornando-o mais sensível (Nemeth e cols., 1998; Nemeth e cols., 1999) (fig. 2). Os íons cálcio e magnésio são os únicos cátions divalentes endógenos que ativam o CaSR. Porém, existe uma série de cátions di e trivalentes capazes de atuar como agonistas do CaSR (Brown & MacLeod, 2001):  $\text{La}^{3+} > \text{Gd}^{3+} > \text{Be}^{2+} > \text{Ca}^{2+} = \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  (Riccardi, 2002). Antibióticos aminoglicosídeos também foram confirmados como ativadores do CaSR em experimentos utilizando células HEK293 (células embrionárias de rim humano): Neomicina, Tobramicina, Gentamicina e Kanamicina, que apresentam eficiência na ativação do CaSR proporcional a quantidade de grupos amino (McLarnon, 2002). Além destes calcimiméticos, existe uma série de outras substâncias agonistas de CaSR: aminoácidos, agentes farmacológicos, polipeptídeos e poliaminas (Magno, 2011).

A ativação do CaSR por cálcio extracelular envolve, na maior parte dos modelos celulares estudados, a ativação de proteína  $G_q$  que ativa Fosfolipase C (PLC) que age ativando  $IP_3$  (Inositol 1,4,5 tri-fosfato) - mobilizando cálcio dos estoques intracelulares - e produzindo diacilglicerol (DAG). DAG ativa proteína quinase C (PKC) dependente de  $Ca^{2+}$  (Ricarddi, 2009). A secreção de PTH, por exemplo, é inibida quando o CaSR é ativado por altas concentrações de cálcio extracelular. Além disso, há também aumento da secreção de calcitonina (CT) e diminuição da reabsorção de cálcio pelos rins (Ward, 2004). (ver detalhes na fig. 3).



**Figura 3:** Visão esquemática das vias de sinalização intracelulares envolvidas com o CaSR. CaSR induz um complexo conjunto de vias intracelulares que vão deflagrar, em última instância, as funções fisiológicas apresentadas na figura. Os efetores induzidos pela ativação de CaSR inclui **(i)** proteína  $G_i$  mediando a inibição da AC (adenilato ciclase); **(ii)** proteína  $G_q$  mediando a ativação de PLC (Fosfolipase C) levando a produção de  $IP_3$  (Inositol trifosfato) e DAG (1,2 diacilglicerol); **(iii)** produção de  $cPLA_2$  (Fosfolipase  $A_2$  citosólica) que leva a produção do AA (ácido aracdônico); **(iv)** ativação de  $PI_3K$  (Fosfatidilinositol 3-quinase-mediada), **(v)** Akt (ou proteína quinase B) e **(vi)** PKC (proteína quinase C); **(vii)** ativação de  $PI_4K$  (fosfatidilinositol 4-quinase) levando a produção  $PIP_2$  (4,5-bifosfato MAP quinase); **(viii)** ativação de P38 MAP quinase (p38), JNK (quinase jun amino-terminal), ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e **(ix)**  $G_{12/13}$  mediando a ativação de Fosfolipase D e levando a produção de PA (ácido fosfatídico). (Modificada a partir de Ward 2004).

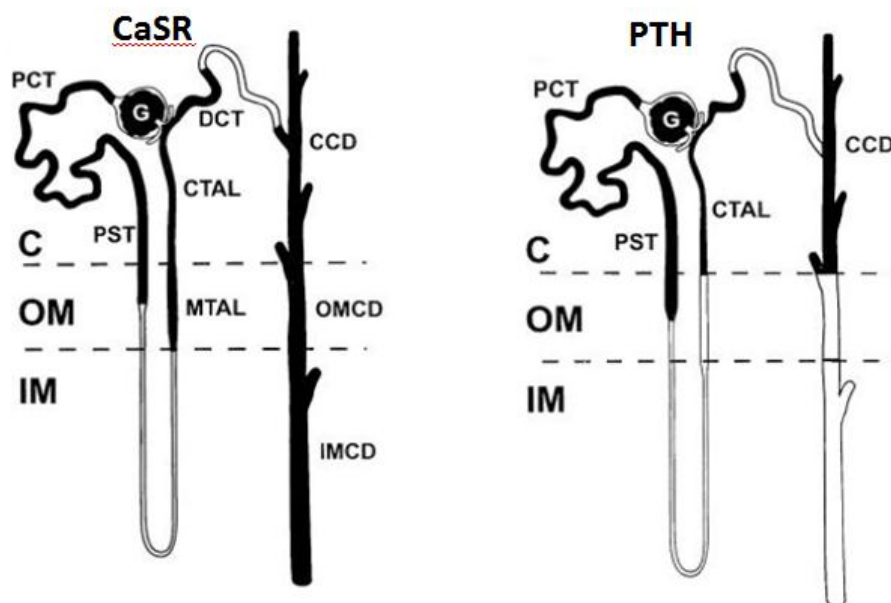
### 1.3 Papel do CaSR nos rins

Em condições fisiológicas, aproximadamente 60% do  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático é filtrado nos capilares glomerulares tanto na forma livre (ionizada), como ligado a ânions (Friedman, 1995; Kurokawa, 1994). Entretanto, a maior parte do mesmo deve ser reabsorvida de forma seletiva para evitar a sua perda na urina. O túbulo proximal e o ramo espesso da alça de Henle (TAL) são responsáveis pela maior parte deste processo, ocorrendo secundariamente o transporte de  $\text{Na}^+$ . A excreção urinária se correlaciona de forma linear com a sua concentração plasmática (Friedman, 1995). Tanto o PTH quanto a vitamina D, controlam o *set point* para reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$ . Entretanto, na ausência destes o *set point* se reduz a um valor baixo; porém, surpreendentemente, a relação linear entre a concentração plasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  e a sua excreção urinária persiste. Isto sugere a presença de um terceiro mecanismo calcitrófico. Provavelmente, o  $\text{Ca}^{2+}$  persiste via o CaSR (Kurokawa, 1994; Hebert, 1996). Uma evidência a favor desta hipótese é a observação feita em humanos, nos quais os níveis de PTH foram clampeados, com a excreção de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  ficando particularmente sensível às variações agudas na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (El-Hajj, 1998).

A ideia de que o CaSR regularia o manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos rins é especialmente apoiada pela evidência obtida de estudos com indivíduos heterozigotos para uma mutação gênica que leva a uma perda de função do mesmo. Esta mutação diminui a sensibilidade do CaSR a  $\text{Ca}^{2+}$  e determina que seja necessária uma concentração plasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  elevada para suprimir a secreção de PTH (Bai, 1996; Pearce, 1996; Pollak, 1993). Se a mutação só afetasse a paratireoide, os rins simplesmente excretariam mais  $\text{Ca}^{2+}$ ; entretanto, o que acontece é uma hipocalciúria, a qual é associada a uma patologia denominada de Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (FHH). Atualmente, conhecem-se modelos nocaute em camundongos (CaSR<sup>-/-</sup>) que exibem hipocalciúria e outros sintomas similares a FHH (Ho, 1995; Kos, 2003).

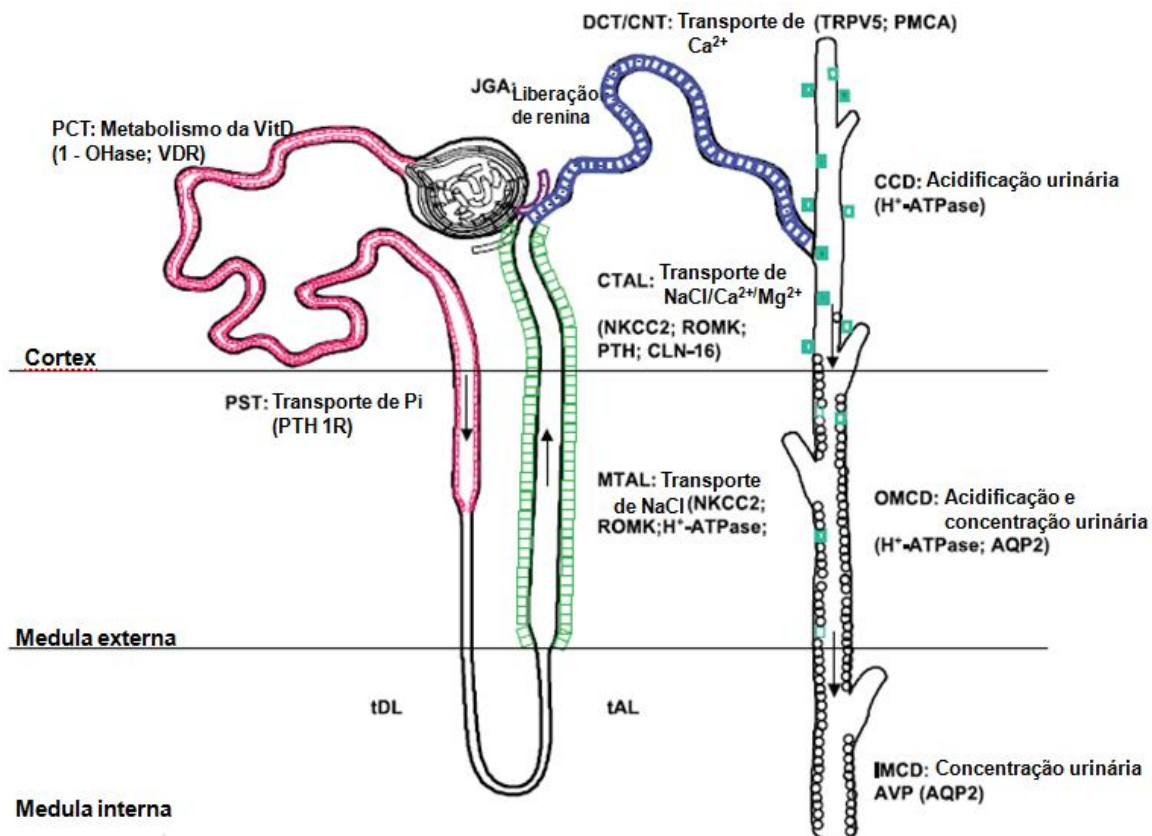
Os grupos de Riccardi (1996) e Yang (1997), utilizando a técnica de hibridização *in situ* e a reação em cadeia com a transcriptase reversa, estudaram a distribuição do RNAm do CaSR e do receptor para PTH (PTH/PTHrP) ao longo do nefro de rato. Ambos receptores são co-expressos no glomérulo, túbulo proximal convoluto, proximal reto, porção cortical do ramo espesso da alça de Henle, túbulo distal convoluto e ducto coletor cortical (fig. 4). O CaSR foi encontrado isolado na

porção medular do ramo espesso da alça de Henle e no ducto coletor. Estudos de imunolocalização do CaSR no rim de rato têm revelado a expressão deste receptor na membrana apical do túbulo proximal e ducto coletor medular interno (IMCD), na região basolateral do TAL, e de forma difusa no túbulo distal convoluto (Riccardi, 1998). No caso das células intercalares  $\alpha$  do ducto coletor cortical, a expressão é variável, tanto apical como basolateralmente. O glomérulo praticamente não expressa o CaSR (fig. 4). A expressão diferenciada e a localização do CaSR ao longo do nefro é indicativa da diversidade nas funções fisiológicas nas quais atua (Ward, 2002; Brown, 2001; Riccardi, 1999; Riccardi & Brown, 2010).



**Figura 4:** Esquema da colocalização de CaSR e receptores para PTH ao longo do nefro com expressão de mRNA. Legenda: **G**, Glomérulo; **PCT**, Túbulo Contorcido Proximal; **PST**, Túbulo Proximal Reto; **mTAL**, Ramo medular Espesso Alça Henle; **cTAL**, Ramo Cortical Espesso Alça Henle; **DCT**, Túbulo convoluto distal; **CCD**, Ducto Coletor Cortical; **OMCD**, Ducto Coletor Medular Externo; **IMCD**, Ducto Coletor Medular Interno. **C**, córtex renal; **OM**, medula externa renal; **IM**, medula interna renal. (Modificada a partir de Riccardi, 1996)

A função do CaSR nos diferentes segmentos tubulares tem sido objeto de estudo nos últimos anos (fig. 5). No Túbulo proximal, o receptor está localizado na membrana apical e sua expressão diminui do segmento S1 para o segmento S3 (Riccardi, 1996 e 1998; Okuda, 2001; Ward, 2002). Nesta localização reside uma estreita correlação com numerosos transportadores de eletrólitos e nutrientes - entre eles o co-transporte  $\text{Na}^+/\text{P}_i$  do tipo IIA (Murer, 2000).



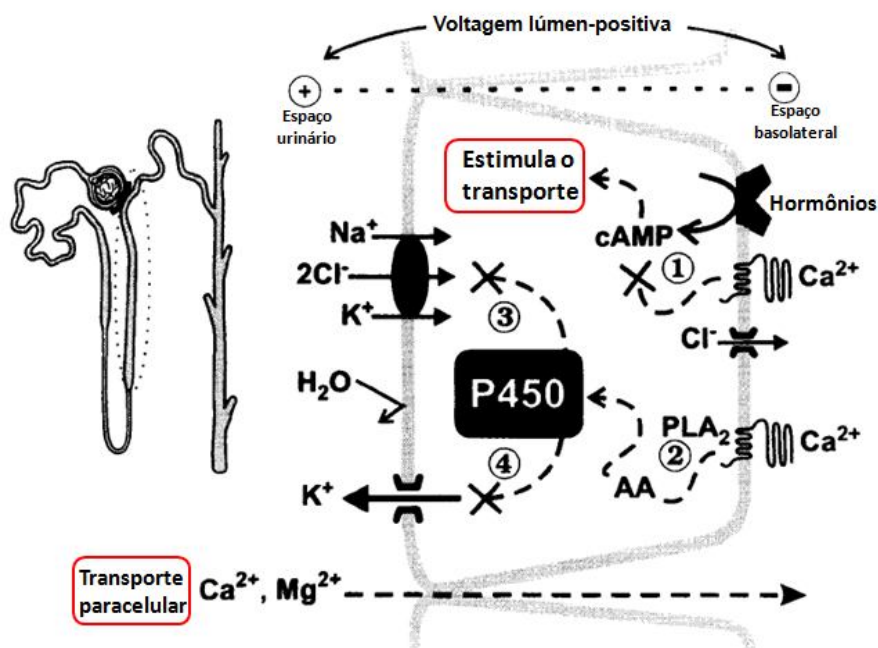
**Figura 5:** Localização e funções do CaSR ao longo do nefro. **Polaridade celular:** Apical (no túbulo proximal, ducto coletor medular externo e interno); Basolateral (no ramo ascendente espesso (TAL) e, ocasionalmente no ducto coletor cortical (DCC)). No túbulo convoluto distal (DCT) e segmento conector (CNT), o CaSR pode se expressar apical e/ou basolateralmente. PCT/PST (túbulo proximal), tDL/tAL (ramo descendente/ascendente espesso). <sub>M</sub>TAL/<sub>C</sub>TAL (ramo ascendente espesso medular/apical). JGA (aparato justaglomerular); TRPV5 (*transient receptor potential vanilloid 5*); PMCA ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de membrana plasmática); Vit. D (vitamina D); VRD (receptor para vitamina D); NKCC2 (co-transportador  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ ); ROMK (canal de  $\text{K}^+$  na medula renal externa); PTH (hormônio paratireoideo); AQP<sub>2</sub> (Aquaporina 2). (Modificada de Riccardi, 2009.)

O PTH inibe este transportador via a produção de AMPc, num processo que pode ser inibido pela ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  ao CaSR, o que diminuiria a perda excessiva de  $\text{P}_i$  na urina. Confirmando este ponto, em túbulos proximais isolados de camundongos,  $\text{Gd}^{3+}$  300 $\mu\text{M}$  (um agonista do CaSR) no fluido luminal abole o efeito “fostatúrico” do PTH na superfície basolateral (BA, Brown & Friedman, 2003). Além disso, altos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  extracelulares – íons divalentes - inibe a formação de AMPc mediado por PTH em células do túbulo proximal, o que sugere uma relação com a atividade do CaSR (Mathias & Brown, 1991); sendo possível, assim, que no túbulo proximal o  $\text{Ca}^{2+}_o$  reduza os níveis de AMPc via CaSR num processo mediado pela ativação da proteína  $\text{G}_i$ , tal como encontrado em células derivadas do

túbulo distal (Arthur, 1997) e nas parafoliculares da tireoide (Tamir, 1996). Por outro lado, o  $\text{Ca}^{2+}_o$  poderia estimular diretamente a captação de  $\text{P}_i$ , já que em túbulos proximais convolutos de coelho perfundidos observou-se que a elevação na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na perfusão (*i. e.*, um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) incrementa o fluxo de fosfato do lúmen para o banho (Rouse, 1985). Outros efeitos propostos da estimulação do CaSR são: 1) regulação negativa na produção renal de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Bland, 1999); e 2) inibição da atividade da  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPase, o que provocaria uma diminuição na absorção tubular de volume (Okuda, 2001). O CaSR tem sido localizado também em modelos celulares de túbulo proximal, tais como as células OK (*Opossum Kidney*) - derivadas dos rins de gambás fêmeas adultas norte-americanas (Ward e cols, 2002). Estudos demonstraram que a exposição de células OK a  $\text{Ca}^{2+}_o$  e aminoglicosídeos (*e.g.*, neomicina, gentamicina) estimula a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}_i$  e ativa a fosforilação da ERK - uma quinase reguladora de sinais no meio intracelular - de forma aguda, o que demonstraria a expressão do CaSR endógeno. (Ward e cols., 2002). Desta forma, o tipo celular OK - um estabelecido epitélio celular que apresenta diversas características de células do túbulo proximal - constituiria um bom modelo para estudo *in vitro* da modulação via CaSR do transporte de prótons neste segmento.

No ramo espesso da alça de Henle e no ducto coletor medular interno o receptor está envolvido principalmente na regulação da reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  e água (fig. 5). Incrementos na concentração plasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  modulam diretamente o transporte de NaCl e íons minerais na alça de Henle de ratos (De Rouffignac, 1994; Champigneulle, 1997; Jesus Ferreira, 1998a). A ativação do CaSR no cTAL (ramo espesso cortical da alça de Henle) reduz a atividade do canal apical de  $\text{K}^+$  (ROMK) e do cotransporte  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  (NKCC2), o que determina uma redução na reabsorção tubular de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Jesus Ferreira, 1998b; Wang, 1996 e 1997; Ward, 2002; Huang, 2007). Brown & McLoad (2001) descreveram mais detalhadamente este mecanismo em TAL e estabeleceram que um aumento extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  na região basolateral ativaria CaSR levando a uma redução na absorção de NaCl - intermediada por hormônios - pela inibição do segundo mensageiro AMPc. O  $\text{Ca}^{2+}$  ativando CaSR geraria ácido aracdônico via estimulação de PLA<sub>2</sub>. O ácido aracdônico produziria metabólitos P450 (provavelmente 20-HETE) que inibiriam NKCC2 na membrana apical. O metabólito de P450 inibiria também os

canais ROMK, reduzindo o gradiente lúmen-positivo favorável a reabsorção de NaCl (fig. 6).



**Figura 6:** Papel do CaSR na regulação do transporte de íons e na atividade dos segundos mensageiros da porção cortical do ramo espesso de Henle (cTAL). (Modificada a partir de Brown & McLoed, 2001).

No caso do ducto coletor cortical, o CaSR está presente na membrana apical e basolateral das células intercalares  $\alpha$ , o que sugere um papel do CaSR no transporte de bicarbonato e, conseqüentemente, na regulação do pH urinário. Como a produção endógena de ácido incrementa a excreção urinária de  $\text{Ca}^{2+}$  da mesma forma que o pH urinário regula a solubilidade de cátions bivalentes, é plausível formular a hipótese de que o CaSR exerça um papel de retroalimentação na excreção de  $\text{H}^+$  a fim de prevenir nefrolitíase ou nefrocalcinose (Riccardi, 1999) (fig. 5). Trabalhando com DCC de camundongo, isolado e subperfundido, observamos que a recuperação do  $\text{pH}_i$  independente de  $\text{Na}^+$  nas células intercalares (resultante da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>) incrementou-se significativamente quando a  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  passou de uma concentração baixa (100nM) para uma normal (1mM). Este efeito pode ser explicado pelas maiores concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares observadas ao perfundir com soluções contendo cálcio 1mM – comparando-se com as observadas ao perfundir com baixos níveis de cálcio - ou seja, pelas alterações na concentração de cálcio realizadas na perfusão. Outra possibilidade é que o CaSR presente na membrana das células intercalares deste segmento registre as

alterações na  $[Ca^{2+}]_o$ , module a  $[Ca^{2+}]_i$  e, conseqüentemente, altere a secreção de prótons nas células intercalares (Fernandez, 2005). Na mesma preparação, estudamos o efeito de estimular diretamente o CaSR com  $Gd^{3+}$  ou com o composto R-568 (um agonista específico do CaSR), sobre a extrusão de prótons dependente e independente de  $Na^+$  (Fernandez e cols., 2006). A subperfusão com  $Gd^{3+}$  300 $\mu$ M incrementou a extrusão de prótons independente de  $Na^+$ , o que foi confirmado ao utilizar o composto R-568. As velocidades de recuperação do  $pH_i$  dependentes de  $Na^+$  foram também modificadas após a estimulação do CaSR. Da mesma forma, Renkema e cols. (2009), trabalhando com ducto coletor medular externo de camundongos controle e nocaute para o canal de  $Ca^{2+}$  presente no túbulo contorcido distal e segmento conector (TRPV5), encontraram que a secreção de prótons através da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> foi estimulada também por incrementos no  $Ca^{2+}_o$  e por um agonista do CaSR (Neomicina 200 $\mu$ M). Destes resultados é possível concluir que a estimulação do CaSR presente nas células intercalares do ducto coletor incrementa a secreção de prótons através do contra-transporte  $Na^+/H^+$  e da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi o de investigar a interação do CaSR com mecanismos de transporte de prótons em um modelo celular do túbulo proximal de mamífero, células *Opossum Kidney*, OK.

Investigamos mais especificamente a modulação da atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> pelo CaSR através da utilização de agonistas do receptor. Além disso, delimitamos algumas vias de sinalização intracelulares – fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C (PKC) - que possivelmente estariam envolvidas na ativação do CaSR.

Para cumprir com estes objetivos foram utilizadas as seguintes metodologias:

- a) A determinação bioquímica da atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> em homogenato de células OK ou em membranas parcialmente purificadas destas células;
- b) Mensurações de alterações do pH e cálcio intracelulares utilizando microscopia de fluorescência.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo Celular

Este estudo utilizou células *Opossum Kidney* (OK), uma linhagem celular imortalizada derivada do túbulo proximal dos rins de gambás fêmeas adultas normais – números de passagem de 7 a 29. As células foram semeadas em placas de seis poços a  $10^6/\text{cm}^3$  ou em frascos de cultivo celular,  $25\text{cm}^2$  (experimentos com membrana parcialmente purificada) e mantidas em meio DMEM (Gibco™, Grand Sland, NY), contendo sais de *Earle*, aminoácidos não essenciais e L-glutamina. O meio foi suplementado com soro bovino fetal a 10%.  $\text{NaHCO}_3$  2g/L; Penicilina 10U/mL e Estreptomicina 10mg/mL também foram adicionados. Os cultivos foram mantidos em uma estufa a  $37^\circ\text{C}$  a uma atmosfera de  $\text{CO}_2$  de 5% (Shellab – USA). O meio foi trocado três vezes por semana, monitorando-se o crescimento das células diariamente. As células foram cultivadas até atingirem confluência (cerca de 72h após a realização da cultura); e então foram submetidas à experimentação ou removidas quimicamente com Tripsina-EDTA (Gibco™, Grand Sland, NY) para o repique.

#### 3.2) Estudos bioquímicos da atividade da $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>

##### 3.2.1) Obtenção do Homogenato Celular

A reação foi iniciada com a adição, na solução de reação (contida nos tubos dos ensaios), do homogenato celular. O procedimento utilizado para a obtenção do homogenato celular foi o que segue: 1) depois que as garrafas plásticas ou placas contendo seis poços atingiram confluência o meio de cultura foi removido; 2) foi feita a lavagem do epitélio com PBS (*phosphate-buffered saline*) livre de  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (composição: NaCl 4.36g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  608.60mg e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  203.60g; qsp 500mL) duas vezes; 3) foi adicionado PBS e realizada a remoção mecânica das células (*i. e.*, raspagem); 4) centrifugação a 1.200rpm por cinco minutos; 5) remoção do sobrenadante e ressuspensão do sedimento formado com 300 $\mu\text{L}$  da solução de solubilização, com a seguinte composição: Triton X-100 1% (um detergente não iônico utilizado para separar proteínas de lipídios); ácido etilenodiaminotetracético

(EDTA) 50mM; Hepes-Tris 0.5M (pH 7.0) e Sacarose 0.5M. Após a obtenção deste homogenato, as células permaneceram pré-incubadas nesta solução por 30 minutos a 4°C.

### **3.2.2) Obtenção de membrana parcialmente purificada**

A obtenção de amostras com membranas parcialmente purificadas foi realizada com centrifugações a diferentes velocidades de rotação seguindo uma adaptação do procedimento descrito por Boumendil-Podevin & Podevim em 1983 e Caruso-Neves em 1999. O procedimento utilizado foi o que segue: 1) as células OK foram cultivadas em garrafas de cultivo com área de 25cm<sup>2</sup> até atingirem confluência; 2) o epitélio foi lavado com PBS por duas vezes e então foi removido mecanicamente; 3) centrifugação a 3.000rpm por dez minutos em temperatura ambiente; 4) remoção do sobrenadante e ressuspensão do sedimento com 1.500µL da solução de homogeneização (composição: sacarose 250mM; HEPES Na<sup>+</sup> 10mM; EDTA 2mM e PMSF 1mM.) contendo PMSF (Fenil-Metil-Sulfonil Fluorito), um inibidor de proteases; 5) centrifugação à 4°C e 2.300rpm (baixa velocidade) por 10 minutos em centrífuga refrigerada (*Mikro 220R, Hettich, Alemanha*) e transferência do sobrenadante para *ependorfs*; 6) centrifugação deste sobrenadante a 4°C e 18.000rpm (alta velocidade) por 30 minutos; 7) descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento com 300µL da solução de sacarose (composição: sacarose 250mM; HEPES Na<sup>+</sup> 10mM; PMSF 1mM e armazenamento das amostras a -80°C; 8) dosagem de proteína para verificação de viabilidade das amostras.

### **3.2.3) Determinação bioquímica da atividade da H<sup>+</sup>-ATPases, no homogenato e em membrana parcialmente purificada**

Foram realizados experimentos com a finalidade de determinar a atividade das H<sup>+</sup>-ATPases, em homogenato de células OK (descrito no item 3.2.1) e em amostras de membranas parcialmente purificadas (descrito no item 3.2.2). O fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>) foi quantificado utilizando uma reação colorimétrica através da adição de reagente de cor. A metodologia utilizada foi uma modificação do método descrito por Fiske e Subbarow (1925) (Santos e col., 2009). Através deste método é possível mensurar o

$P_i$  liberado do ATP pela ação das ATPases celulares. O  $P_i$  forma um complexo colorido ao reagir com Molibdato de Amônio e Metovanadato de Amônio. A reação foi iniciada com a adição do homogenato celular ou das amostras de membrana parcialmente purificadas -- com uma concentração final mínima de proteína de 0.3mg/mL -- à solução de reação com intervalos de 15 segundos entre um tubo de ensaio e outro. Após o disparo da reação, os tubos foram mantidos a 37°C em banho-maria por 30 minutos quando, então, a reação foi interrompida pela adição de 1000 $\mu$ L de TCA (ácido tricloro acético) 12% e temperatura de 4°C; nos tubos brancos a reação foi disparada com a adição do homogenato celular à solução de reação após 28 minutos de incubação e interrupção da mesma logo em seguida de modo que a reação não ocorresse neste tubo e, assim, fosse possível a obtenção da atividade ATPásica basal. Após esta etapa as amostras foram imediatamente centrifugadas a 2.000rpm em centrífuga refrigerada (*Mikro 220R, Hettich, Alemanha*) a 4°C por 5 minutos com a finalidade de precipitar o ATP não hidrolisado e as proteínas. Após a centrifugação, 500 $\mu$ L do sobrenadante - contendo o  $P_i$  resultante da hidrólise do nucleotídeo – foi aliquoteado e transferido para novos tubos de ensaio, aos quais foi adicionado 500 $\mu$ L do reativo de cor. Os tubos foram submetidos à agitação e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 380nm (*Thermo Scientific, USA*).

Com a adição da proteína após 30 minutos de reação foi possível a determinação da hidrólise espontânea do fosfato. A diferença entre o valor da quantidade de  $P_i$  encontrado nos tubos e o valor observado no tubo branco foi realizada a fim de se obter o valor real de  $P_i$  liberado pela atividade das ATPases.

As soluções utilizadas no preparo do reativo de cor foram: 1) solução A, Molibdato de amônio 10% diluído em  $NH_4OH$  1%; 2) solução B, Metovanadato de amônio 0,47% diluído em  $HNO_3$ . Para o preparo do reativo de cor procedeu-se como segue: para um volume de 100mL, misturar 5mL da solução A à 5mL da solução B, adicionando 3,7mL de  $HNO_3$  e completando o volume com água deionizada. Foram realizados curvas de calibração de  $P_i$  utilizando uma solução mãe de  $P_i$  (1mM) que continha Fosfato Monobásico (1mM) e Fosfato Dibásico (1mM) a pH 7.0. Com estas curvas foi possível então obter, a partir da absorbância, a quantidade de  $P_i$  (mM) resultante da reação colorimétrica.

A atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> foi calculada pela diferença entre o  $P_i$  liberado na ausência e na presença de Bafilomicina  $10^{-7}M$  ou Concanamicina  $10^{-8}M$ , adicionando diferentes agonistas do CaSR ( $Gd^{3+}$   $300\mu M$ , Neomicina  $200\mu M$  e  $Ca^{2+}$  variando de 0 a 2mM) ou drogas envolvidas em vias de sinalização intracelulares: 1) PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) ( $10^{-7}M$ ), droga que ativa PKC, com efeitos similares ao diacilglicerol (ativador natural de PKC); 2) U-73122, um inibidor de Fosfolipases  $A_2$  e C. O efeito inibitório dessa droga acontece pela inibição da hidrólise de PPI (Fosfatidilinositol) a  $IP_3$  (Inositol tri-fosfato), induzindo uma diminuição do  $Ca^{2+}$  citosólico. A atividade ATPásica foi expressa em nmol de  $P_i$  liberados por mg de proteína por unidade de tempo ( $P_i \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ ).

A solução MRC (Meio de Reação Comum) foi utilizada em todos os experimentos bioquímicos e continha inibidores das principais ATPases presentes nas células em estudo: ouabaína, para inibir a  $Na^+$ - $K^+$  ATPase; oligomicina e azida de  $Na^+$  para inibir a ATPase mitocondrial. Como consequência, a quantidade de  $P_i$  encontrado no tubo 1 correspondia à atividade das  $H^+$ -ATPases<sub>v</sub> e denominamos esta atividade como basal - após ter descontado o  $P_i$  resultante da hidrólise espontânea - tubo Branco. A solução MRC (composição:  $MgCl_2$  4mM; KCl 30mM; Azida de  $Na^+$  10mM; HEPES-Tris 50mM (pH7.0); ATP  $Na^+$  4mM; Ouabaina 1mM; Oligomicina 10mM;  $CaCl_2$  1mM - ausente nos experimentos com concentrações de  $Ca^{2+}$  variando de 0 a 2mM).

Nos ensaios visando investigar a relação entre a ativação do CaSR e a modulação atividade das  $H^+$ -ATPases<sub>v</sub> em células OK foram utilizados protocolos contendo Gadolínio ( $Gd^{3+}$ ) ( $300\mu M$ ) e Neomicina ( $200\mu M$ ), ambos agonistas do receptor. Estas concentrações são semelhantes às utilizadas em estudos prévios (Champegneulle, 1997; Renkema, 2009). Foi aplicado o mesmo protocolo tanto para os ensaios com homogenato celular quanto para os realizados com membrana parcialmente purificada (tabela 1).

**Tabela 1: Protocolo CaSR Gd<sup>3+</sup> (300µM) e Neomicina (200µM)**

TUBOS	MRC	Baf. 10 <sup>-7</sup> M/ Con. 10 <sup>-8</sup> M	*Agonista	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

Observação: os valores estão em mL. \*Gd<sup>3+</sup> ou Neomicina.

Nos experimentos com variações na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> e a investigação da modulação da atividade das H<sup>+</sup>-ATPases<sub>v</sub> pelo CaSR, a solução MRC era livre de Ca<sup>2+</sup>. Assim, o CaCl<sub>2</sub> foi removido e o volume final ajustado com água; além disso, um quelante de Ca<sup>2+</sup> (EGTA 5mM) foi adicionado em alguns tubos dos ensaios. Os tubos foram divididos em grupos com diferentes concentrações de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>: 0mM, 10<sup>-4</sup>mM, 10<sup>-3</sup>mM, 10<sup>-2</sup>mM, 0.5mM, 1mM e 2mM (tabela 2).

**Tabela 2: Protocolo CaSR com [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> variando de 0 a 2mM**

TUBOS	MRC	Baf. 10 <sup>-7</sup> M/ Con. 10 <sup>-8</sup> M	EGTA 5x10 <sup>-2</sup> M	CaCl <sub>2</sub> (0 a 2m)	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	0.02	-	0.04	0.02	0.2
3	0.1	0.02	-	0.02	0.04	0.02	0.2

Observação: os valores estão em mL.

Na investigação das vias de sinalização intracelulares envolvidas na ativação do CaSR utilizamos PMA (10<sup>-7</sup>M) e U-73122 (5x10<sup>-7</sup>M) (tabela 3), conforme já mencionado na metodologia deste estudo.

**Tabela 3:** Protocolo CaSR PKC e Fosfolipases C e A<sub>2</sub>

TUBOS	MRC	Baf. 10 <sup>-7</sup> M / Con. 10 <sup>-8</sup> M	Gd3 <sup>+</sup> (300µM)	PMA (10 <sup>-7</sup> M)	U-73122 (5x10 <sup>-7</sup> M)	H <sub>2</sub> O	Prot.	Vol. Total (mL)
Br	0.1	-	-	-	-	0.08	0.02	0.2
1	0.1	-	-	-	-	0.08	0.02	0.2
2	0.1	0.02	-	-	-	0.06	0.02	0.2
3	0.1	0.02	0.02	-	-	0.04	0.02	0.2
4	0.1	0.02	-	0.02	-	0.04	0.02	0.2
5	0.1	0.02	0.02	0.02	-	0.02	0.02	0.2
6	0.1	0.02	-	-	0.02	0.04	0.02	0.2
7	0.1	0.02	0.02	-	0.02	0.02	0.02	0.2

Observação: os valores estão em mL.

### 3.2.4) Quantificação proteica

A concentração de proteínas presente no homogenato celular ou nas amostras contendo membranas plasmáticas parcialmente purificadas foi determinada seguindo o método de Bradford (1976), que possibilita a quantificação de proteínas presentes em uma amostra desconhecida com base na construção de uma curva padrão de uma proteína conhecida (albumina bovina, SIGMA).

### 3.3) Determinação do pH e Ca<sup>2+</sup> intracelulares

#### 3.3.1) Mensuração do pH<sub>i</sub>

As células OK foram cultivadas em lamínulas até atingirem a confluência quando então foram submetidas a experimentos em microscopia de fluorescência (*Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Germany*) - aparelho multiusuário localizado no Depto. de Fisiologia da UFPR. Em cada preparação a lamínula contendo monocamadas de epitélio celular foi colocada numa câmara termostaticada a 37°C que foi montada na platina do um microscópio invertido. O epitélio foi então perfundido com soluções a 37°C. A solução controle utilizada apresentava a seguinte composição: NaCl

135mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM, Mg Cl<sub>2</sub> 1mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1mM, Hepes ácido 10mM e glicose 10mM. O pH era ajustado a 7.4.

Para a determinação do pH<sub>i</sub> foi utilizado o *probe* fluorescente BCECF (2', 7' - biscalboxiethyl - 5,6 - carboxifluoresceína). O epitélio foi incubado na solução controle contendo 10µM de BCECF-AM (*Molecular Probe*) por 20 minutos em condições controladas de temperatura, umidade e CO<sub>2</sub>. Foi utilizada a forma acetilometil-éster do BCECF (forma não-fluorescente) pelo fato de a membrana celular ser permeável a esta substância. Uma vez no interior da célula, a molécula é desesterificada pelas esterases intracelulares, originando a forma impermeável e altamente fluorescente BCECF. Após o período de incubação, o epitélio foi lavado com a solução controle para remover a solução que continha BCECF-AM (Geibel e cols., 1989). As áreas de interesse do epitélio celular foram então delimitadas (aumento de 20 vezes) e as imagens foram adquiridas com uma câmera digital observando-se a imagem num monitor com armazenamento simultâneo no disco rígido do computador utilizando o *software AxioVision 4.8.1* (Carl Zeiss, Germany). (Lang, 2003; Wagner, 2003). O pH<sub>i</sub> das células foi determinado a partir do espectro de excitação do BCECF, excitando em forma alternada a 495nm (um comprimento de onda no qual a fluorescência é muito sensível ao pH<sub>i</sub>) e 440nm (ponto isosbético, insensível ao pH<sub>i</sub>), enquanto se media a emissão de fluorescência a 530nm a cada 10 segundos. As razões das intensidades nestes dois comprimentos de onda são sensíveis às variações do pH<sub>i</sub>, mas relativamente insensíveis a mudanças na concentração do marcador. Foram realizadas curvas de calibração de Nigericina (Thomas, 1979). A solução de Nigericina continha 100mM de KCl e 10 µM de Nigericina que atua promovendo um intercâmbio entre K<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> intra e extracelular, igualando, assim, as concentrações intra e extracelulares de H<sup>+</sup>. A solução de calibração de Nigericina 10µM (com alta concentração de K<sup>+</sup>) utilizada apresentava a seguinte composição: KCl 130mM, NaCl 20mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes ácido 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM e glicose 10mM. Alíquotas dessa solução tiveram o pH ajustado a 7.4, 7.0, 6.5 e 6.0. Os valores obtidos para a razão de fluorescência I<sub>495</sub> / I<sub>440</sub> foram representados em função do pH<sub>o</sub> e utilizados para calcular o pH<sub>i</sub> nos experimentos a partir da equação:

**pHi = [(I<sub>495</sub> / I<sub>440</sub>)<sub>E</sub> - (I<sub>495</sub> / I<sub>440</sub>)<sub>C</sub>] \* Slope da curva de calibração + pH<sub>C</sub>**, onde (I<sub>495</sub> / I<sub>440</sub>)<sub>E</sub> e (I<sub>495</sub> / I<sub>440</sub>)<sub>C</sub> são as razões de fluorescência no experimento e em um

padrão respectivamente, e  $pH_c$  é o pH extracelular padrão que deu origem à razão  $(I_{495} / I_{440})_c$ .

A fim de analisar os mecanismos de secreção de prótons das células OK via ativação do CaSR, realizamos manobras com Neomicina (200 $\mu$ M) e registro de possíveis alterações no  $pH_i$ . Realizamos também manobras com solução livre de  $Na^+$  que apresentava a seguinte composição: NMDG<sup>+</sup> 137mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes 10mM e glicose 10mM. Na solução livre de  $Na^+$ , o íon era substituído de forma equimolar pelo N-metil-D-glucamina (NMDG<sup>+</sup>). O pH foi ajustado a 7.4 com HCl e KOH. A ideia foi investigar como a ativação deste receptor modularia a atividade de proteínas envolvidas na secreção de prótons.

### 3.3.2) Mensuração do $Ca^{2+}_i$

As modificações na concentração intracelular de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) foram determinadas em monocamadas de células OK utilizando o FLUO – 4 10 $\mu$ M (*Molecular Probes*). As células foram cultivadas em lamínulas e os experimentos realizados após confluência (aproximadamente 72h depois da confecção dos cultivos). As células foram incubadas com FLUO-4 10 $\mu$ M, durante 30 minutos em condições controladas de temperatura, umidade e CO<sub>2</sub>. Após este período o epitélio foi lavado com solução controle (composição no item 3.3.1) para remover os restos de *probe* desesterificados e colocadas em câmaras termostatizadas. As modificações na  $[Ca^{2+}]_i$  foram determinadas a partir do espectro de excitação a 480nm, enquanto se media a emissão de fluorescência a 520nm a cada 1 segundo utilizando microscopia de fluorescência. O *probe* FLUO-4 apresenta um incremento da intensidade fluorescente na faixa verde (520nm) após sua ligação com o  $Ca^{2+}$ . Por se tratar de um *probe* com uma faixa de excitação/emissão simples, as variações da intensidade basal de fluorescência não podem ser corrigidas e os resultados devem ser expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UFA). As modificações na intensidade fluorescente resultantes das manobras experimentais foram expressas como porcentagem em relação à intensidade de fluorescência no período basal (período de registro com solução controle).

Nos ensaios nos quais investigamos as alterações da  $[Ca^{2+}]_i$  resultantes da adição de Neomicina (200 $\mu$ M) e Gd<sup>3+</sup> (300 $\mu$ M) diretamente no meio de preparação, as células foram mantidas em câmaras à 37°C e sofreram exposição por dois

minutos com solução controle. Logo em seguida a monocamada foi incubada com um dos agonistas do CaSR ( $Gd^{3+}$  300 $\mu$ M ou Neomicina 200  $\mu$ M) por três minutos e então exposta novamente. Procedeu-se então mais uma pausa de três minutos e nova exposição. Desta forma, obtivemos dois períodos de registro de UFA.

Em outro grupo de experimentos, após exposição das células e registro por cerca de dois minutos, foi adicionado diretamente ao meio de preparação PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) ( $10^{-7}$ M) - ativadora de PKC - ou U-73122 ( $5 \times 10^{-7}$ M) - inibidora de fosfolipase  $A_2$  e C - para a investigação de vias de sinalização intracelulares. A incubação foi de dez minutos quando então foi adicionada Neomicina (200 $\mu$ M) e a monocamada de células sofreu exposição por três minutos. Procedeu-se então uma pausa de três minutos e nova exposição, obtendo também dois períodos de registro de UFA.

Com o objetivo de investigar mais detalhadamente os mecanismos de sinalização intracelulares envolvidos na ativação do CaSR, realizamos experimentos utilizando Tapsigargina (0.1 $\mu$ M) e experimentos utilizando Tapsigargina (0.1 $\mu$ M) e EGTA (etilenoglicol ácido tetra-acético) – quelante de  $Ca^{2+}$  - substituindo o  $CaCl_2$  na solução livre de  $Ca^{2+}$ . A Tapsigargina é uma droga utilizada para depletar estoques de  $Ca^{2+}$ , já que inibe as ATPases transportadoras de  $Ca^{2+}$  mediadas por captadores deste íon no Retículo Sarcoplásmico.

### 3.4) Reagentes

Bafilomicina A1, Concanamicina, Ouabaína, EGTA (Ethylene Glycol – bis ( $\beta$ -Aminoethyl Ether) – N,N,N',N' – Tetra-acetic acid), ATP- $Na^+$ , EDTA, PMSF (fenil-metil-sulfonil fluorito), NMDG $^+$  (N-metil-D-glucamina), Tapsigargina e Gadolínio ( $Gd^{3+}$ ), obtidos da *SIGMA*; Azida sódica e DMSO (dimetil-sulfóxido), obtidos da *MERCK*; Neomicina, obtida da *Fisher Bioreagentes*; Nigericina, PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) e U-73122, obtidos da *Santa Cruz Biotechnology*; FLUO-4 e BCECF da *Molecular Probe*. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 3.5) Análise Estatística

Os experimentos bioquímicos foram conduzidos em duplicatas. Os resultados foram apresentados na forma de valores médios com erro padrão (EP). Para as análises entre dois grupos foi utilizado o teste *t* de *student* para amostras pareadas. Para análises com mais de dois grupos foi feita análise de variância de uma via, seguida do teste de *Student-Newman-Keulls* quando aquela análise era estatisticamente significativa. O critério de significância estatística se obteve com valores de  $p < 0.05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad InStat 3.10 (*GraphPad Software*, San Diego, California - EUA).

## 4. RESULTADOS

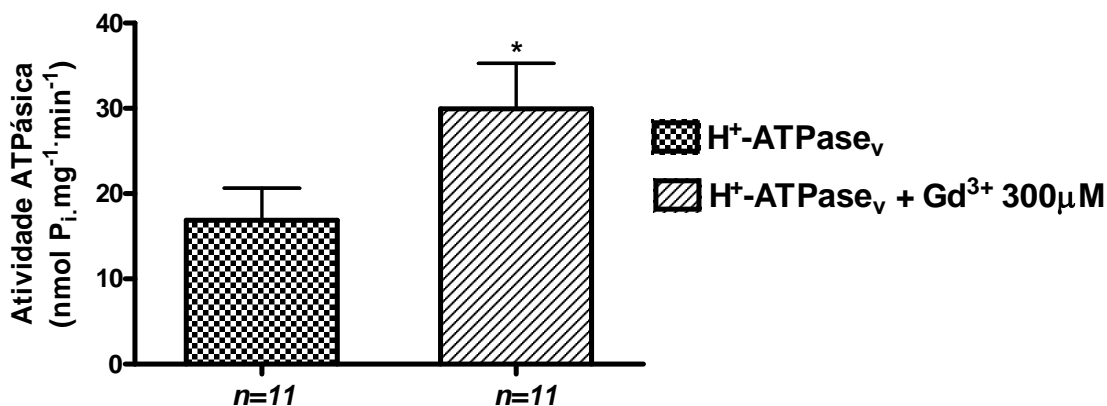
### 4.1 Experimentos bioquímicos

#### 4.1.2 Efeito de agonistas do CaSR sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em homogenato celular

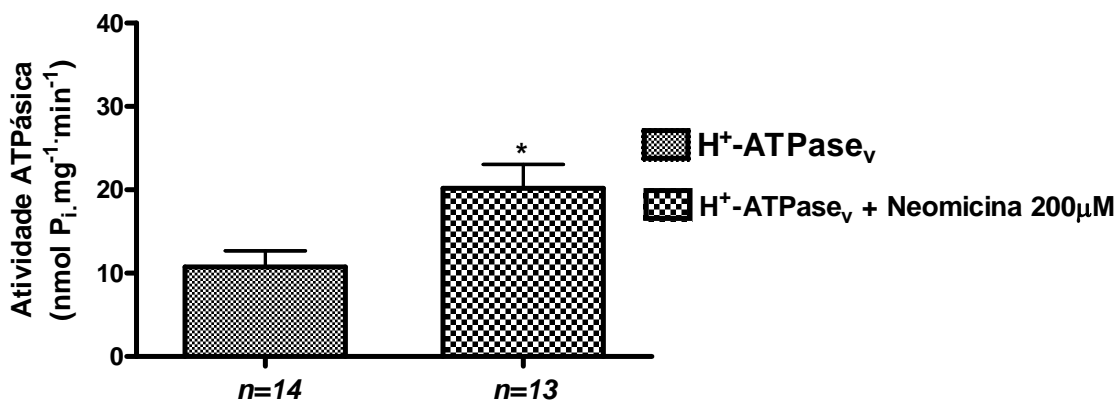
A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em homogenato de células OK foi determinada através da diferença entre o P<sub>i</sub> liberado na presença e na ausência de Concanamicina 10<sup>-8</sup>M. A atividade total foi de 56.91±7.46 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e foi significativamente reduzida a 39.19±4.95 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> na presença de Concanamicina 10<sup>-8</sup>M,  $n=24$ ,  $p= 0.0027$ . A atividade sensível a Concanamicina foi em média de 17.72±5.29 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Desta forma, o homogenato de células OK apresenta uma atividade sensível a Concanamicina (H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar).

O CaSR pode ser estimulado através de diversos agonistas, entre eles estão: íons divalentes e trivalentes (Magnésio - Mg<sup>2+</sup> e Gadolínio - Gd<sup>3+</sup>) e compostos proteicos de carga positiva (espermina e neomicina). No presente trabalho utilizamos Neomicina (200µM) e Gd<sup>3+</sup> (300µM), ambos agonistas deste receptor. A atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar foi significativamente estimulada por 300µM Gd<sup>3+</sup>: 16.89±3.75 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> basal vs. 29.94±5.35 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> com Gd<sup>3+</sup>,  $n=11$ ,  $p=0.002$  (fig. 7). A exposição deste homogenato a 200µM de Neomicina

também resultou num aumento da atividade da  $H^+$ -ATPase vacuolar:  $10.74 \pm 1.95$  nmol  $P_i \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$  basal vs  $20.20 \pm 2.85$  nmol  $P_i \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$  com Neomicina,  $n=13$ ,  $p=0.01$  (fig. 8).



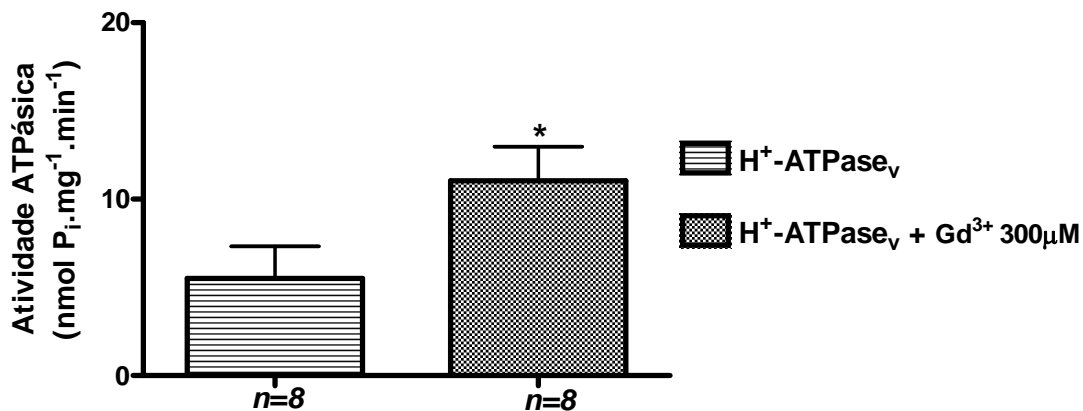
**Figura 7:** Efeito estimulatório na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>.



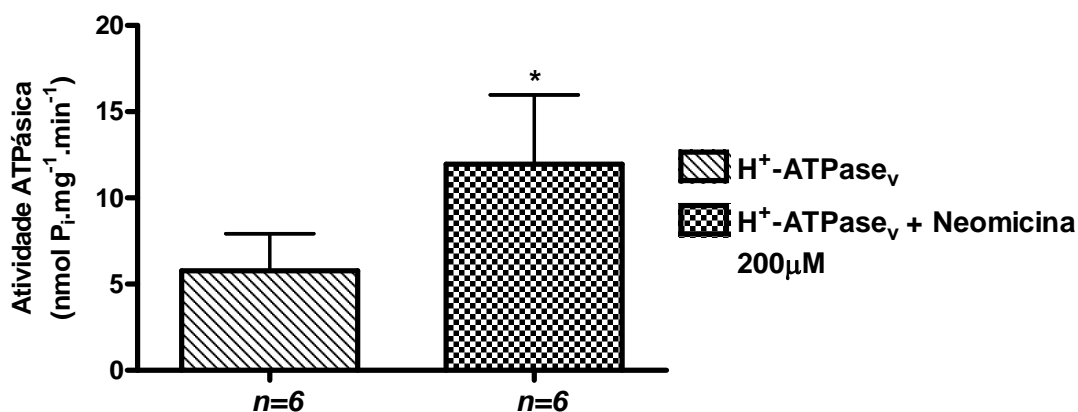
**Figura 8:** Efeito estimulatório na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p < 0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>.

#### 4.1.3 Efeito de agonistas do CaSR sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em membranas parcialmente purificadas

A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em amostras contendo membranas parcialmente purificadas de células OK foi determinada através da diferença entre o P<sub>i</sub> liberado na presença e na ausência de Concanamicina 10<sup>-8</sup>M. A atividade total foi de 24.75±9.02 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e foi significativamente reduzida a 16.80±5.51 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> na presença de Concanamicina 10<sup>-8</sup>M, *n*=24, *p*= 0.0027 . A atividade sensível a Concanamicina foi em média de 7.95±3.78 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Desta forma, amostras com membranas parcialmente purificadas de células OK apresentam uma atividade sensível a Concanamicina, ou seja, apresentam H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>. Nestes experimentos a estimulação do CaSR, também com o uso de Neomicina (200μM) ou Gd<sup>3+</sup> (300μM), incrementou de forma significativa a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>. A atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> foi significativamente estimulada por 300μM Gd<sup>3+</sup>: 5.50±1.82 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> basal vs. 11.04±1.94 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> com Gd<sup>3+</sup>, *n*=8, *p*=0.0016 (fig. 9); e Neomicina 200μM: 5.78±2,13 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> basal vs. 11.96±4,02 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> com Neomicina, *n*=6, *p*=0.03 (fig. 10).



**Figura 9:** Efeito estimulatório na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em membranas parcialmente purificadas de células OK. Os valores correspondem à média ± EP. \**p*<0.05 vs. atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>.

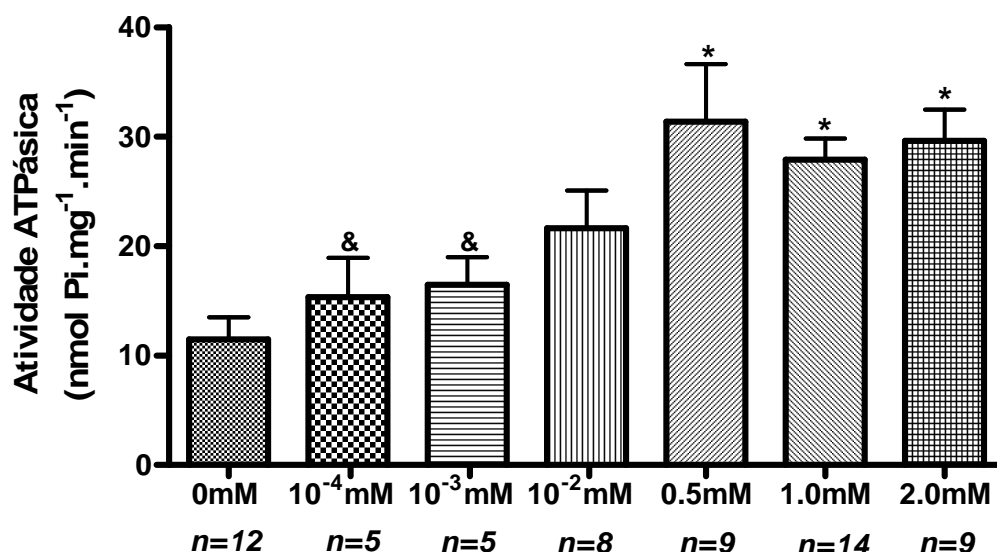


**Figura 10:** Efeito estimulatório na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> por agonista do CaSR em membranas parcialmente purificadas de células OK. Os valores correspondem à média ± EP. \*p<0.05 vs. atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>.

#### 4.1.4 Efeito da variação da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> sobre o CaSR e a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em homogenato celular

Como o CaSR apresenta sensibilidade à mudanças nas concentrações de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>, decidimos estudar o que aconteceria com a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em homogenato de células OK ao modificar a concentração deste íon no meio extracelular. Foram utilizadas as seguintes concentrações de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>: 0mM (livre de Ca<sup>2+</sup>) ; 10<sup>-4</sup>mM, 10<sup>-3</sup>mM, 10<sup>-2</sup>mM, 0.5mM (concentrações baixas); 1mM (concentração fisiológica); e 2mM (concentração suprafisiológica).

Nestes experimentos a atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> na ausência de cálcio extracelular (com a adição de EGTA no meio de reação) foi significativamente estimulada por concentrações de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> extracelular de 0.5mM (31.37±5.25 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, n=9, p<0.05), 1.0mM (27.91±1.91 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, n=14, p<0.05) e 2.0mM (29.63±2.83 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, n=9, p<0.05) vs. basal 11.49±2.00 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, n=9, p<0.05, com Bafilomicina 10<sup>-7</sup>M e EGTA 5x10<sup>-2</sup>M. Concentrações menores de cálcio extracelular, 10<sup>-2</sup>mM, 10<sup>-3</sup>mM, 10<sup>-4</sup>mM não foram significativamente diferentes com a atividade na ausência de cálcio, 10<sup>-4</sup>mM: 15.34±3.58 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, n=5, p<0.05; 10<sup>-3</sup>mM: 16.46±2.55 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, n=3, p<0.05; 10<sup>-2</sup>mM: 21.64±3.43 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, n=6). Assim, observamos um efeito dose-dependente da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> com relação a concentração de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>. (fig. 11).



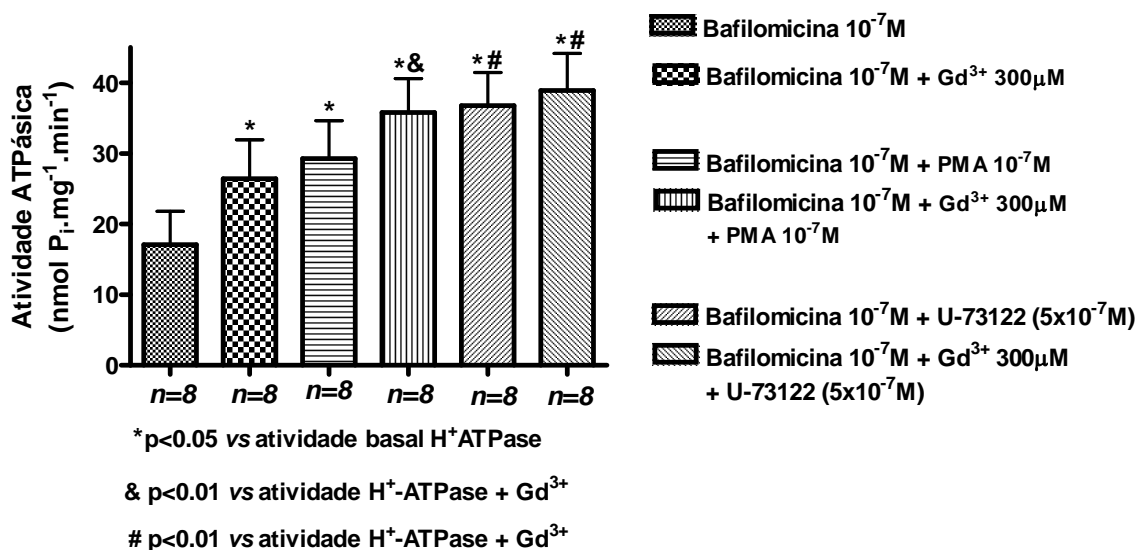
**Figura 11:** Efeito dose-dependente da concentração de Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub> (0 a 2.0mM) sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média ± EP. \*p<0.05 vs. atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> + 0mM de Ca<sup>2+</sup>; & p<0.05 vs. atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> + Ca<sup>2+</sup> 0.5mM.

#### 4.1.5 Investigação de vias de sinalização envolvidas na ativação do CaSR em homogenato celular

A ativação do CaSR envolve maquinaria intracelular complexa e depende do tipo celular em estudo. Porém, é de consenso que a estimulação deste receptor promove um aumento na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, com este aumento do Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> podendo ocorrer via ativação de Fosfolipase C e PKC (Riccardi *et. al.*, 2009). Por isso, estudamos se estas vias intracelulares se encontram envolvidas no efeito estimulatório da ativação do CaSR sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> em homogenato de células OK.

Nestes ensaios a atividade basal da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> foi significativamente estimulada por 300µM Gd<sup>3+</sup>: 17.06±4.73 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> basal vs. 26.43±5.52 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> com Gd<sup>3+</sup>, n=8, p<0.05; O PMA 10<sup>-7</sup>M, substância que ativa a via da PKC, promoveu um aumento significativo da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>: 17.06±4.73 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> basal vs. 29.27±5.38 P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> com PMA, n=8, p<0.05, mimetizando o efeito observado ao estimular o CaSR. Quando PMA 10<sup>-7</sup>M foi colocado no meio de reação juntamente com 300µM Gd<sup>3+</sup> observou-se também um aumento significativo na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>: 35.79±4.79 nmol P<sub>i</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>

com PMA e  $Gd^{3+}$  vs.  $26.43 \pm 5.52$   $\text{nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  com  $Gd^{3+}$ ,  $n=8$ ,  $p<0.05$ . A adição de U-73122  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ , um inibidor da fosfolipase C, no meio de também ocasionou aumento significativo na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>:  $17.06 \pm 4.73$   $\text{P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  basal vs.  $36.77 \pm 4.70$   $\text{nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  com U-73122,  $n=8$ ,  $p<0.05$ . A adição de U-73122  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  no meio de reação juntamente com  $300 \mu\text{M } Gd^{3+}$  promoveu aumento significativo na atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>:  $26.43 \pm 5.52$   $\text{nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  com  $Gd^{3+}$  vs.  $38.90 \pm 5.26$   $\text{nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  com U-73122 e  $Gd^{3+}$ ,  $n=8$ ,  $p<0.05$ . (fig. 12)



**Figura 12:** Efeito estimulatório sobre a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> pela adição agonista do CaSR ( $Gd^{3+} 300 \mu\text{M}$ ), ativação da via PKC (PMA -  $10^{-7} \text{M}$ ) e inibição da via PLC (U-73122 -  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ ) em homogenato de células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. \* $p<0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>; & $p<0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> +  $Gd^{3+}$ ; # $p<0.05$  vs. atividade basal da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> +  $Gd^{3+}$ .

#### 4.2 Mensuração do $pH_i$

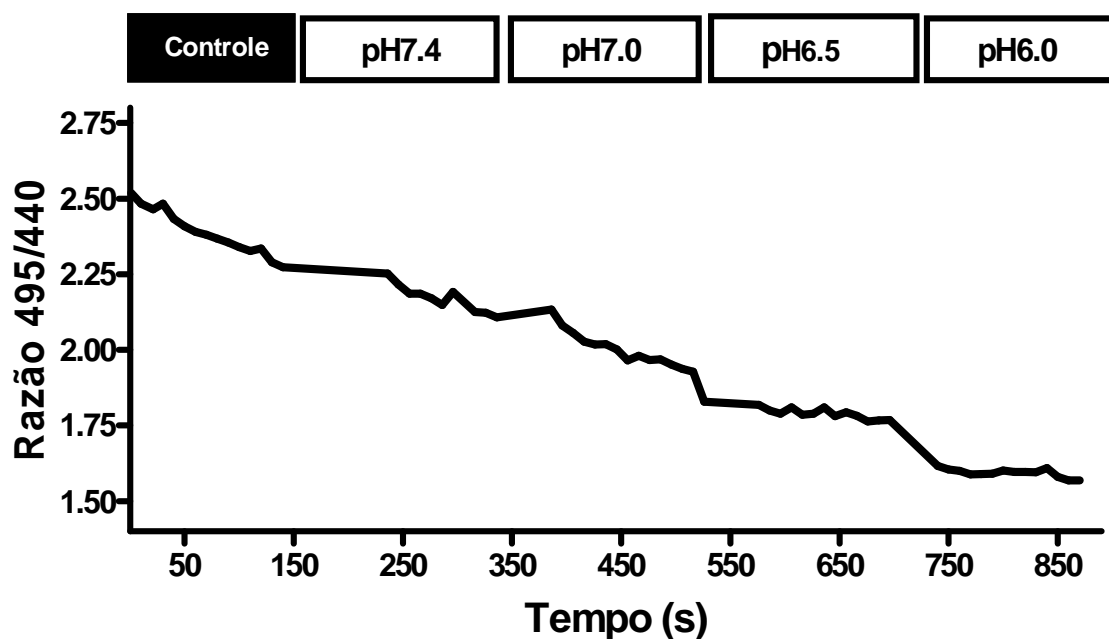
Para os experimentos com mensuração do  $pH_i$  o número amostral foi expresso por  $n=n^{\circ}$  de áreas delimitadas no campo do microscópio com aumento de 20 vezes/  $n^{\circ}$  de preparações.

#### 4.2.1 Curva de calibração de Nigericina

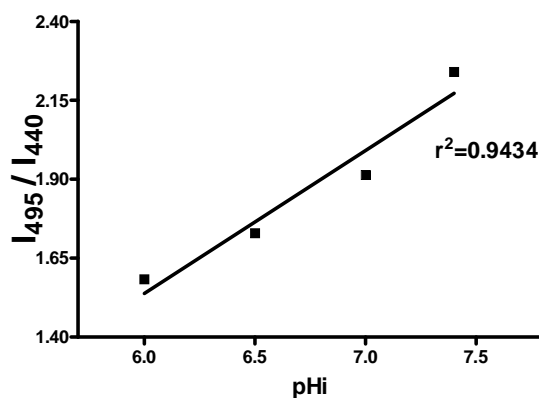
O  $pH_i$  foi calculado utilizando a técnica de calibração com Nigericina (Thomas, 1979), através da qual foi possível obter, a partir da razão de fluorescência ( $I_{495} / I_{440}$ ) experimental e de uma curva de calibração, o  $pH_i$ . A figura 13 traz o gráfico representativo de uma curva de calibração (razão  $I_{495} / I_{440}$  em função do  $pH_o$ ). As médias das  $I_{495} / I_{440}$  em função do  $pH_o$  estão expressas na tabela 4 e a curva da regressão linear na figura 14,  $r^2=0.9434$ .

**Tabela 4:**  $I_{495} / I_{440}$  em função do  $pH_o$  em células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP. #  $p < 0.05$  vs.  $I_{495} / I_{440}$  a  $pH 7.4$ . \*  $n=88/4$

$pH_o$	pH 7.4	pH 7.0	pH 6.5	pH 6.0
$I_{495} / I_{440}$	$2.24 \pm 0.03^*$	$1.91 \pm 0.03^{*#}$	$1.73 \pm 0.29^{*#}$	$1.58 \pm 0.29^{*#}$



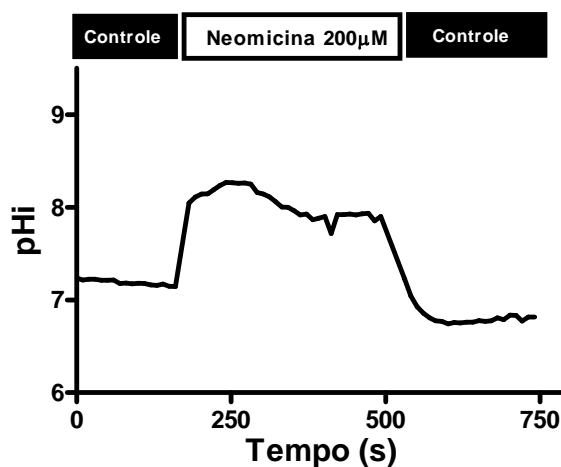
**Figura 13:** Gráfico representativo da  $I_{495} / I_{440}$  em função do  $pH_o$  em células OK.



**Figura 14:** Curva de regressão linear da  $I_{495} / I_{440}$  em função do  $pH_i$  em células OK.

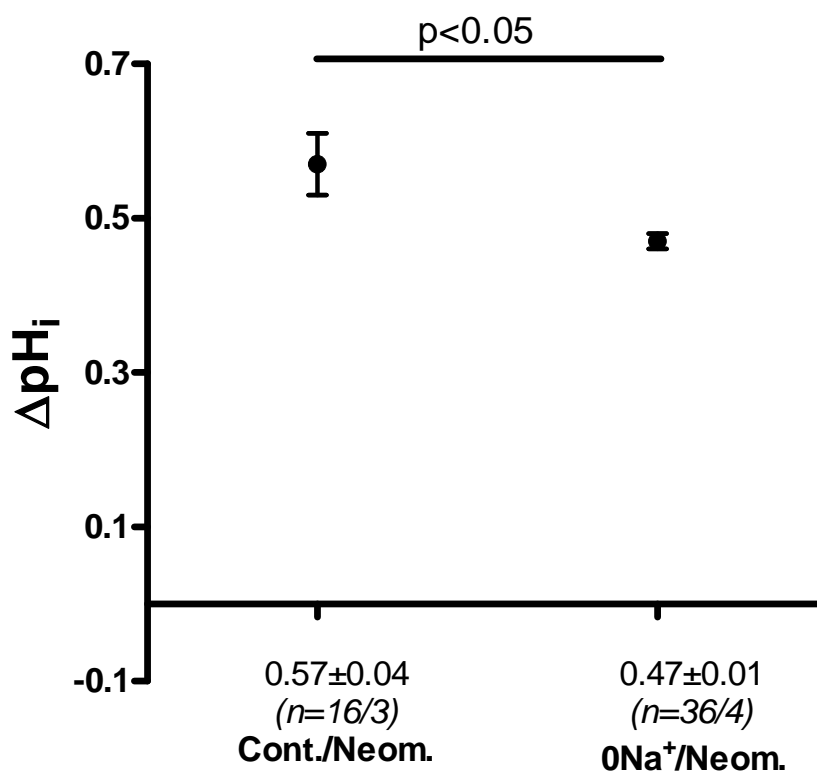
#### 4.2.2 Efeito da adição de agonista do CaSR sobre o $pH_i$

Estudos sugerem que a secreção de prótons em DCME (Renkema e cols., 2009) e em DCC de roedores (Fernandez e cols., 2005) seria modulada pelo CaSR. Para investigar se o CaSR estaria regulando mecanismos de extrusão de prótons em células OK, foram realizadas manobras experimentais com o registro de alterações no  $pH_i$ . Com a adição de Neomicina ( $200\mu\text{M}$ ), agonista do receptor, diretamente no meio de preparação, observou-se um aumento significativo do  $pH_i$  das células (fig. 15 e tabela 5). Esta alcalinização do meio intracelular sugere um incremento da secreção de prótons por estas células.



**Figura 15:** Alcalinização de células OK frente à adição de Neomicina  $200\mu\text{M}$  diretamente no meio de preparação. O  $pH_i$  aumentou significativamente com relação ao controle;  $n=16/3$ ,  $p<0.0001$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  EP.

Com o intuito de investigar se a ativação de CaSR modularia mecanismos de extrusão de prótons independentes de  $\text{Na}^+$ , foram realizadas manobras com medida do  $\text{pH}_i$  utilizando solução livre de  $\text{Na}^+$  ( $0\text{Na}^+$ ) juntamente com Neomicina  $200\mu\text{M}$ . Nestes experimentos verificamos que na solução  $0\text{Na}^+$  a Neomicina promoveu uma alcalinização significativamente menor do que a observada ao adicionar o agonista do CaSR na solução contendo  $\text{Na}^+$ , sugerindo que o CaSR modularia tanto a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase, quanto a do trocador NHE-3 (fig. 16) (ver valores na tabela 5).



**Figura 16:** Efeito da ativação do CaSR sobre os mecanismos de extrusão de prótons dependentes e independentes de  $\text{Na}^+$  em células OK. Os valores correspondem à média  $\pm$  EP.

**Tabela 5:** Efeito do calcimimético Neomicina 200 $\mu$ M sobre o pH<sub>i</sub> na ausência e presença de Na<sup>+</sup>. #p<0.05 vs.  $\Delta$ pH<sub>i</sub> com solução livre de Na<sup>+</sup>.

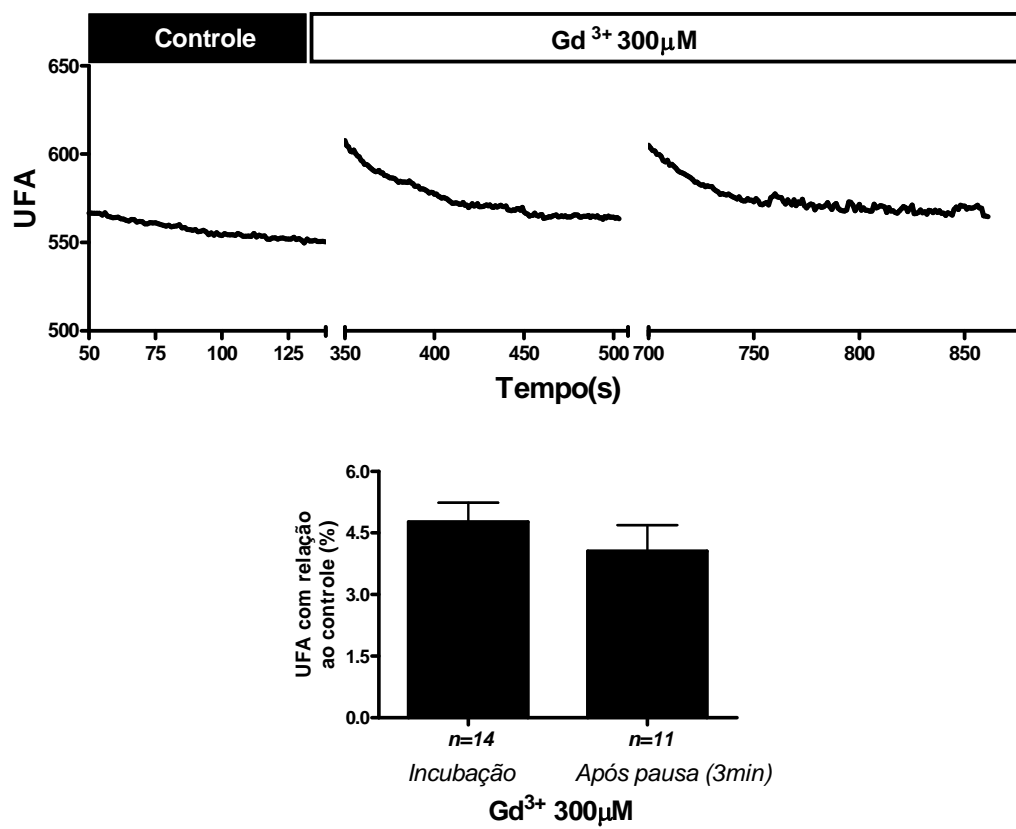
Soluções	n	pH <sub>i</sub> inicial	pH <sub>i</sub> induzido por Neom 200 $\mu$ M	$\Delta$ pH <sub>i</sub>
Controle	16/3	7.32 $\pm$ 0.04	7.90 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>
0Na <sup>+</sup>	36/4	6.72 $\pm$ 0.04	7.18 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.01

### 4.3 Mensuração do Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>

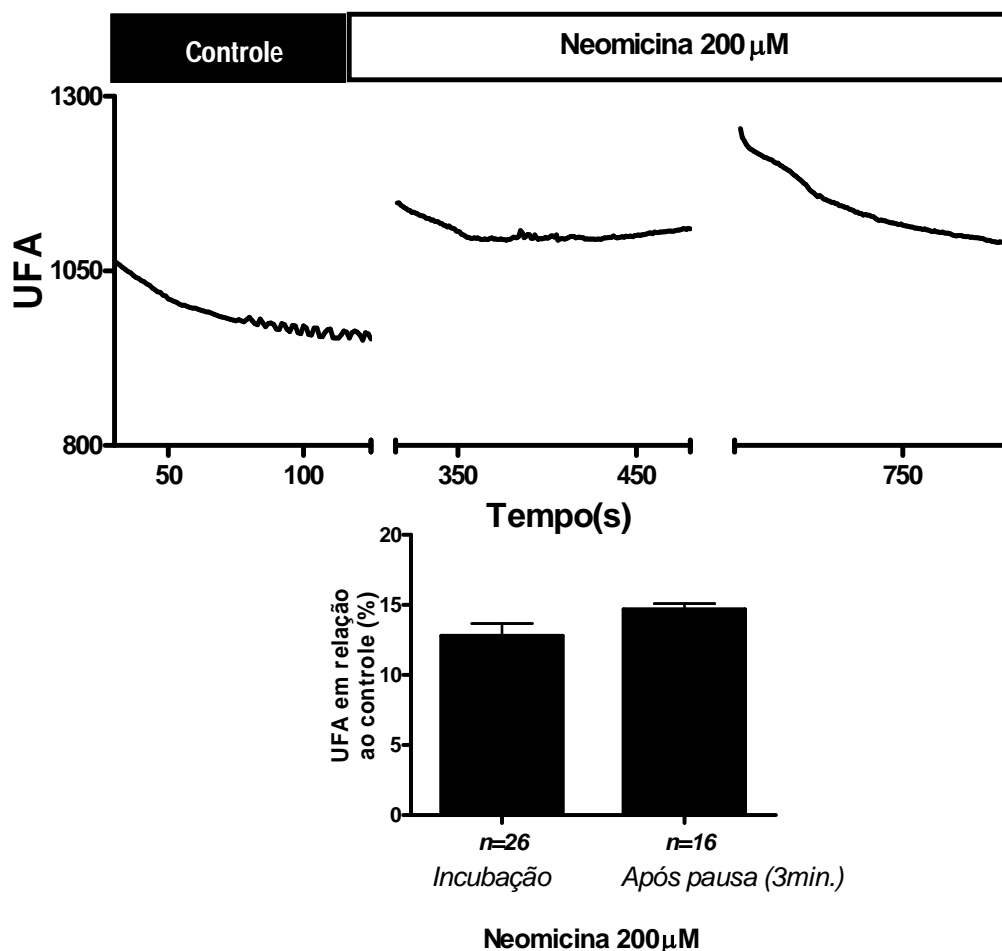
O estímulo do CaSR pode ativar vias de sinalização intracelulares complexas, produzindo respostas e efeitos fisiológicos que podem variar de acordo com o tipo celular (Brown, 1998; Ward, 2004). A estimulação deste receptor promoveria um aumento na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> via ativação de Fosfolipase C dependente de IP<sub>3</sub> ou PKC (Riccardi *et. al.*, 2009). Assim, faz-se importante o estudo dos efeitos do uso de agonistas do receptor - ou de drogas relacionadas a mecanismos de sinalização intracelulares envolvidos na ativação do CaSR – sobre a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

O número amostral foi expresso por n=n<sup>o</sup> de áreas delimitadas no campo do microscópio com aumento de 20 vezes/ n<sup>o</sup> de preparações.

Os agonistas Gd<sup>3+</sup> e Neomicina determinaram um aumento significativo e sustentado dos níveis de cálcio citosólico ionizado (ou seja, na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) durante os períodos de registro. Incubação por 3 minutos com Gd<sup>3+</sup> (300 $\mu$ M): 4.77 $\pm$ 0.47%, n=14/3, p<0.0001; depois de uma pausa de 3 minutos: 4.06 $\pm$ 0.64%, n=11/3, p<0.0001 (fig. 17). Incubação por 3 minutos com Neomicina (200 $\mu$ M): 12.79 $\pm$ 0.86 %, n=26/3, p<0.0001; depois de uma pausa de 3 minutos: 14.68 $\pm$ 0.41%, n=16/3, p<0.0001 (fig. 18).



**Figura 17:** Aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  pela adição de  $Gd^{3+}$  ( $300\mu M$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em porcentagem (%)  $\pm$  EP comparado com o valor basal.



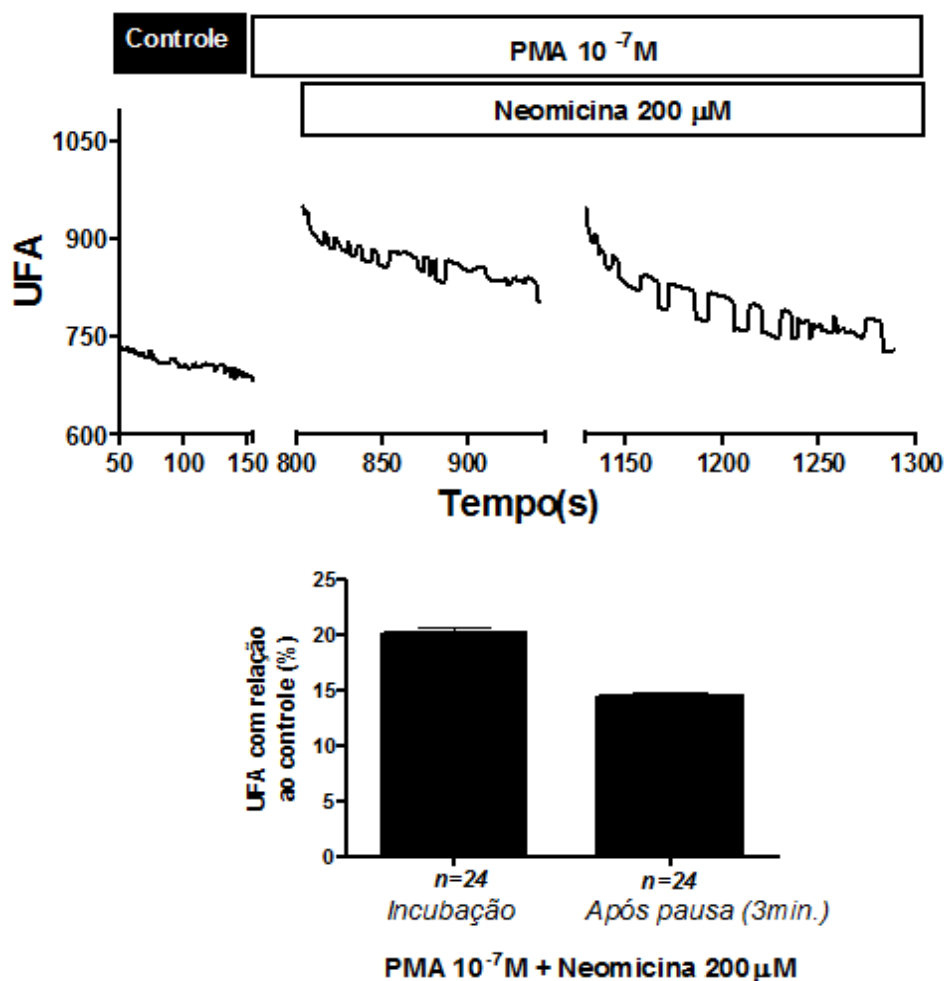
**Figura 18:** Aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  pela adição de Neomicina ( $200\mu M$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em porcentagem (%)  $\pm$  EP comparado com o valor basal.

Após a incubação por 10 minutos com PMA ( $10^{-7}M$ ) e posterior adição de Neomicina ( $200\mu M$ ) continuou sendo observado o incremento significativo na  $[Ca^{2+}]_i$ :  $20.14\pm 0.49\%$ ,  $n=24/3$ ,  $p<0.0001$ ; e  $14.40\pm 0.38\%$ ,  $n=24/3$ ,  $p<0.0001$  depois de uma pausa de 3 minutos. (fig. 19)

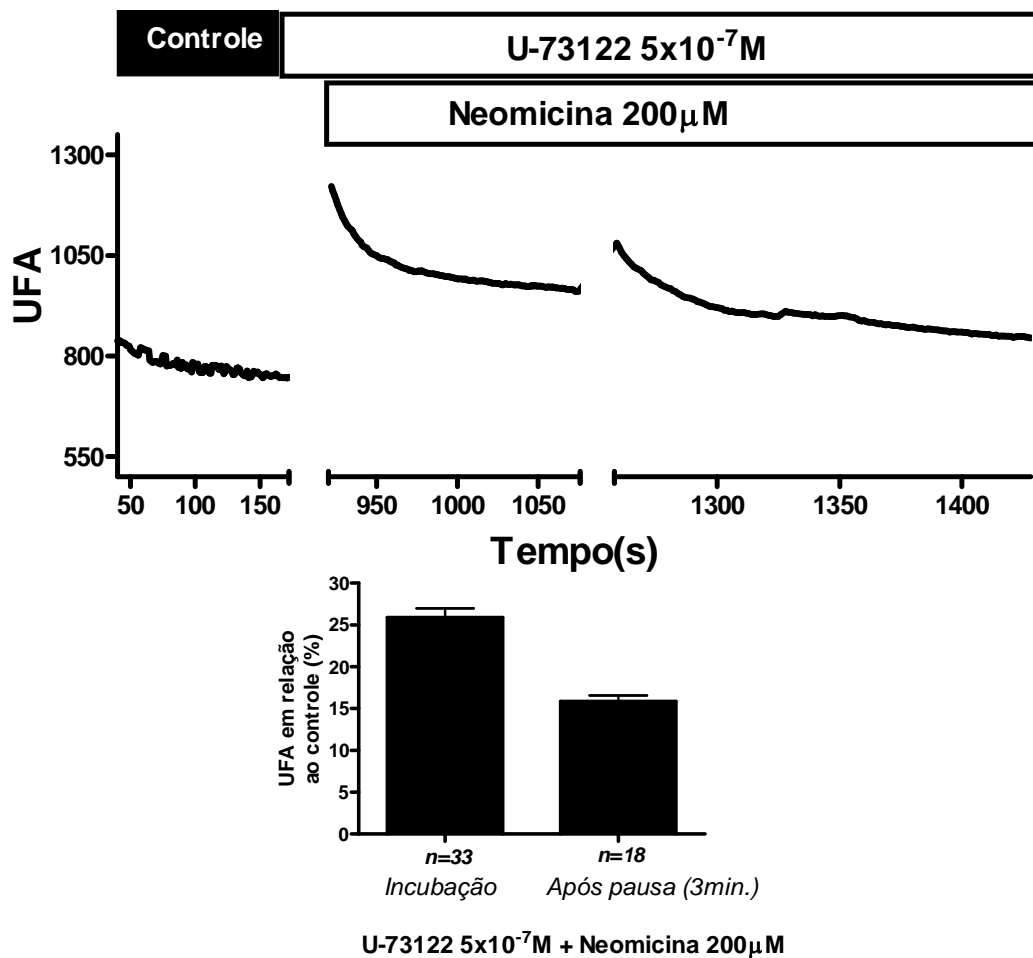
Quando comparamos o grupo que sofreu incubação com Neomicina com o grupo em que ocorreu incubação prévia com PMA, observamos que houve um aumento significativo do  $[Ca^{2+}]_i$ :  $12.79\pm 0.86\%$ ,  $n=26/3$ , com Neomicina ( $200\mu M$ ) vs.  $20.14\pm 0.49\%$ ,  $n=24/3$  com Neomicina ( $200M$ ) e PMA ( $10^{-7}M$ )  $p<0.0001$ .

Da mesma forma, a incubação por 10 minutos com U-73122  $5\times 10^{-7}M$  e posterior adição de Neomicina ( $200\mu M$ ) não evitou o aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ :  $25.89\pm 1.11\%$ ,  $n=33/4$ ,  $p<0.0001$ ; e  $15.86\pm 0.69\%$ ,  $n=18/4$ ,  $p<0.0001$  depois de uma

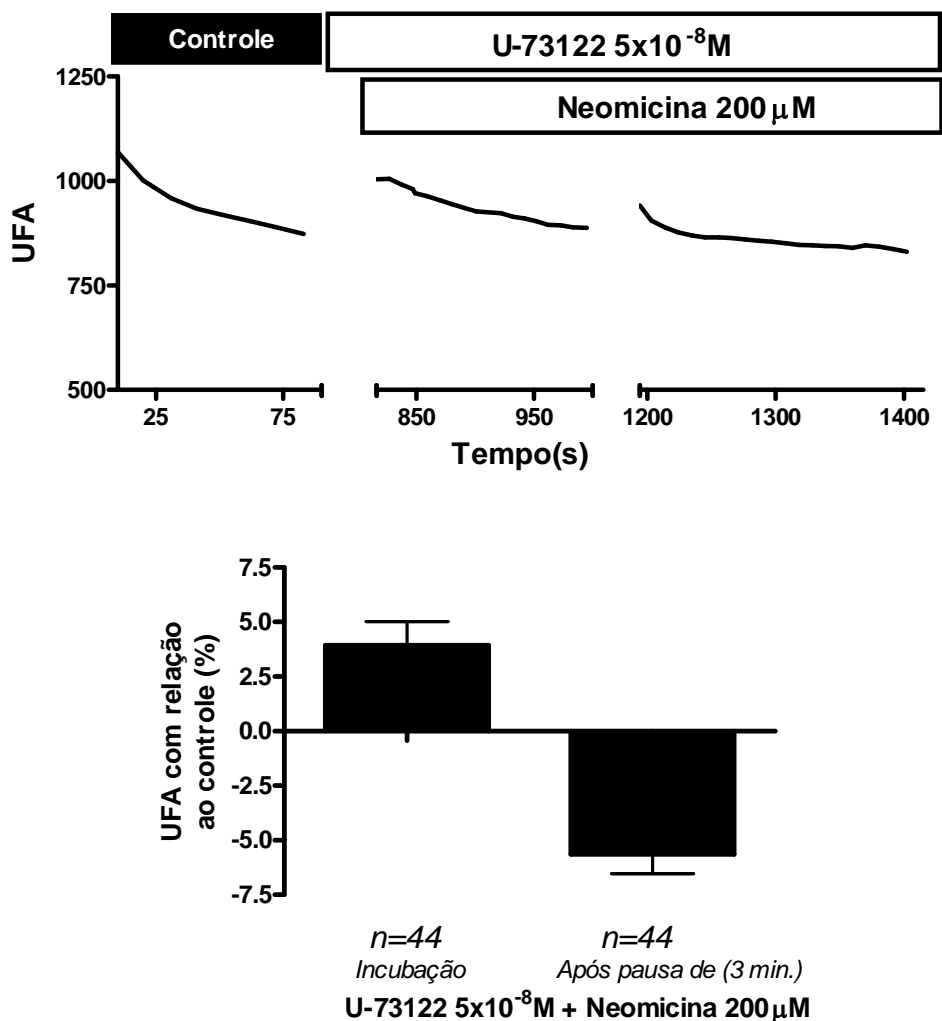
pausa de 3 minutos (fig. 20). Alterando a dose de U-73122 para  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  observamos que a incubação por 10 minutos com a droga e posterior adição de Neomicina ( $200 \mu\text{M}$ ) não evitou o aumento inicial na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :  $3.93 \pm 1.09\%$ ,  $n=44/3$ ,  $p < 0.0001$ ; porém, depois de uma pausa de 3 minutos, observamos uma diminuição significativa na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :  $-5.64 \pm 0.89\%$ ,  $n=44/3$ ,  $p < 0.0001$  (fig. 21). Desta forma, observamos que numa dose menor a inibição da via PLC conseguiu reduzir o efeito da estimulação do CaSR sobre os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.



**Figura 19:** Aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pela adição de Neomicina ( $200 \mu\text{M}$ ) e ativação da via PKC ( $\text{PMA } 10^{-7} \text{M}$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%)  $\pm$  EP comparado com o valor basal.



**Figura 20:** A inibição da via PLC (U-73122 5x10<sup>-7</sup>M) não evitou o aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzido pela adição de Neomicina em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%) ± EP comparado com o valor basal.

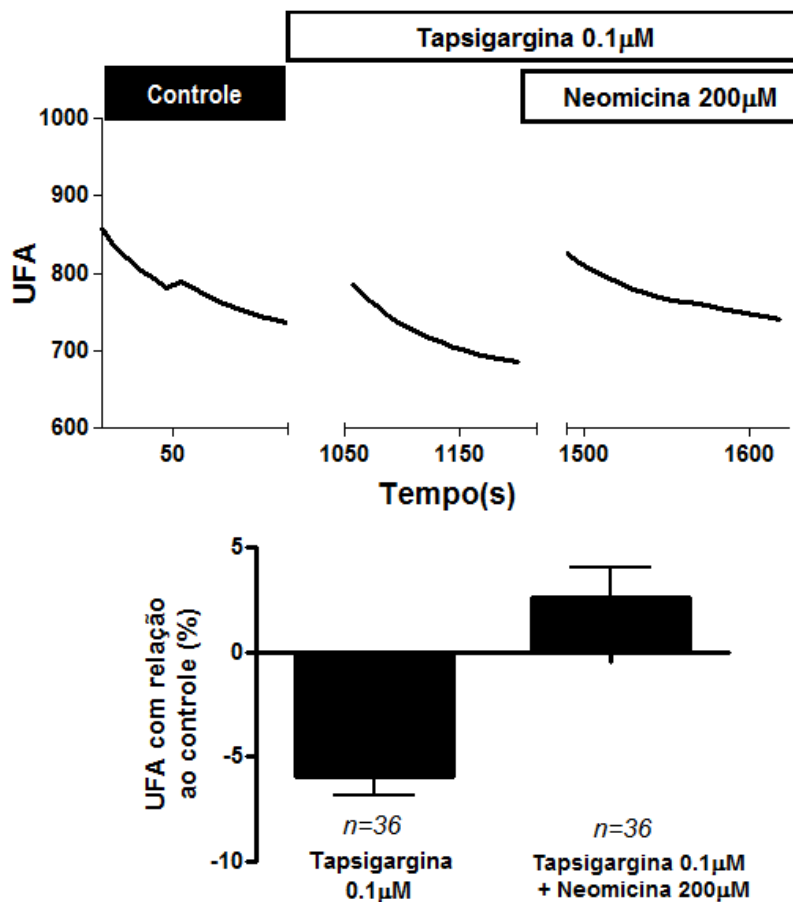


**Figura 21:** A inibição da via PLC (U-73122 5x10<sup>-8</sup>M) evitou o aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzido pela adição de Neomicina em células OK. Os valores correspondem à média de aumento de UFA em percentagem (%) ± EP comparado com o valor basal.

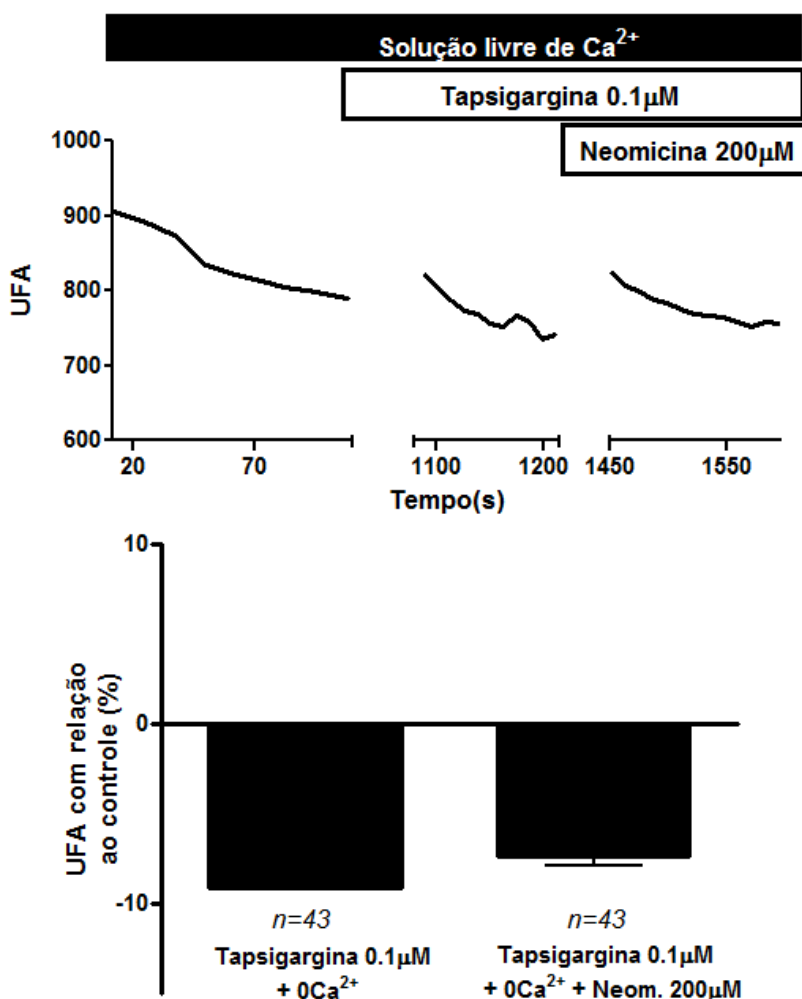
A incubação por 15 minutos com Tapsigargina (0.1 μM) resultou em uma diminuição significativa na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: -5.96±0.85%, n=36/3, p<0.0001. Com a adição de Neomicina (200 μM) diretamente no meio de preparação, contendo aquela droga, não observamos um incremento significativo do Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> em relação ao basal: 2.59±1.47%, n=36/3, p=0.0864 (fig. 22).

A incubação por 15 minutos com Tapsigargina (0.1 μM) em solução livre de Ca<sup>2+</sup> resultou em uma diminuição significativa na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: -9.14±0.088%, n=43/3, p<0.0001. Com a adição de Neomicina (200 μM) diretamente no meio de preparação,

contendo aquela droga e livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , observamos também uma diminuição significativa do  $\text{Ca}^{2+}$ :  $-7.31 \pm 0.60\%$ ,  $n=43/3$ ,  $p < 0.0001$  (fig. 23).



**Figura 22:** Diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pela incubação com Tapsigargina ( $0.1\mu\text{M}$ ) por 15 minutos e posterior efeito da adição de Neomicina ( $200\mu\text{M}$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de aumento/diminuição de UFA em percentagem (%)  $\pm$  EP comparado com o valor basal.



**Figura 23:** Diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  pela incubação com Tapsigargina ( $0.1\mu M$ ) por 15 minutos em solução livre de  $Ca^{2+}$  e posterior efeito da adição de Neomicina ( $200\mu M$ ) em células OK. Os valores correspondem à média de diminuição de UFA em percentagem (%)  $\pm$  EP comparado com o valor basal.

## 5. DISCUSSÃO

### A expressão do CaSR

Nossos estudos demonstraram que o tratamento das células OK com Neomicina e  $Gd^{3+}$ , conhecidos agonistas do receptor sensível a cálcio extracelular (CaSR), determinou um aumento significativo e sustentado dos níveis de  $Ca^{2+}_i$ , o que aponta uma possível expressão de CaSR por este linhagem celular (ver figs. 17 e 18). Estes resultados são apoiados por estudos como o de Ward e cols. (2002)

que, utilizando técnicas de biologia molecular, demonstraram que existe um CaSR endógeno em células OK, um estabelecido modelo celular do túbulo proximal. Neste mesmo estudo, a expressão de CaSR aparece relacionada a um aumento na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}_i$  e  $\text{PIP}_2$ -PLC dependente da ativação de ERK. Gibbons e cols. (2008) também apontam que as células OK expressam CaSR e que esta proteína seria responsiva quando tratada com antibióticos aminoglicosídeos, conhecidos agonistas deste receptor.

### **Presença da $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>**

Nossos estudos bioquímicos demonstraram que as células OK apresentam uma atividade bioquímica sensível a Bafilomicina  $\text{A}_1$   $10^{-7}\text{M}$  e a Concanamicina  $10^{-8}\text{M}$ , indicando a presença de uma  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo vacuolar nesta linhagem celular (ver figs. 7 a 12). Estes resultados são apoiados por uma grande diversidade de estudos. Brown e cols. (1987), utilizando imunomarcagem em rins de ratos, demonstraram a presença das  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> tanto em membrana plasmática quanto armazenadas em vesículas próximas às membranas de células intercalares (ICs); e de células epiteliais do túbulo proximal (Brown e cols., 1988; Wagner e cols., 2004). Este armazenamento em vesículas desempenharia um papel importante nas ICs, já que as mesmas poderiam se inserir na face apical ou basolateral de acordo com as necessidades do organismo, conferindo ao sistema uma certa plasticidade fisiológica (Schwartz & Al-Awqati, 2005). Dentre os papéis que podem ser atribuídos à  $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub> estão: 1) acidificação do fluído tubular; 2) acidificação de vesículas citoplasmáticas envolvidas no processo de endocitose e formação de lisossomos (Wagner, 2004).

O túbulo proximal cumpre um papel fundamental na função renal de regulação da homeostase ácido-base através de uma secreção significativa de prótons. O contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (isoforma NHE-3) é a via predominante para a secreção de  $\text{H}^+$  pelo túbulo proximal e usa o gradiente lúmen/célula para  $\text{Na}^+$  como forma de impulsionar este processo (Brenner & Rector, 2008; Mello Aires & Malnic, 1979). Por outro lado, até 40% da secreção de  $\text{H}^+$  neste segmento é independente de  $\text{Na}^+$  e sensível a Bafilomicina, um inibidor da  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo vacuolar ( $\text{H}^+$ -ATPase<sub>v</sub>) (Wagner e cols., 2004; Kinne-Saffran e cols., 1982; Ulate & cols., 1993). Brown e cols. (1988) realizaram estudos na tentativa de demonstrar e melhor compreender a

distribuição da H<sup>+</sup>-ATPase do tipo vacuolar (H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub>) ao longo do nefro, trazendo evidências da presença desta proteína na membrana apical do túbulo proximal. Além disso, já está bem estabelecido que as células OK expressam a H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> (Takano, 2002). Entretanto a percentagem destas bombas inseridas na membrana plasmática destas células parece ser menos significativo que o encontrado em outros modelos celulares de túbulo próximo, LLC-PK<sub>1</sub>, por exemplo (Nakamura, 2004). Isto explica o fato de que quando realizamos experimentos utilizando uma preparação parcialmente purificada de membrana plasmática a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase foi aproximadamente 55% menor que quando foi utilizado o homogenato.

### **Modulação dos mecanismos de extrusão de prótons pelo CaSR**

A função do CaSR nos diferentes segmentos tubulares tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Como forma de prevenção de possíveis danos renais ocasionados por uma elevada excreção de Ca<sup>2+</sup>, o CaSR pode induzir modificações contrabalançando esta função tubular. No túbulo proximal, o efeito antifosfatúrico reduz a carga de fosfato que chega aos segmentos tubulares distais, onde CaSR modula a reabsorção de Ca<sup>2+</sup> (Worcester, 2010).

No ducto coletor, CaSR promove diluição urinária e acidificação de forma ordenada para a prevenção da precipitação do fosfato de cálcio em túbulos renais e complicações como nefrocalcinoses e formações de cálculos (Vezzoli, 2011; Renkema *et. al.*, 2009). Assim, o CaSR estaria atuando para prevenir a formação de nefrolitíase estimulando a H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> e inibindo a inserção de AQP<sub>2</sub>.

Uma possível relação entre o estímulo do CaSR e a secreção de prótons nos túbulos renais tem sido demonstrada nos últimos anos. Casare & Fernandez (2011), trabalhando com frações parcialmente purificadas de membrana plasmática de córtex e medula externa de rim de camundongo, encontraram que o estímulo do CaSR incrementou tanto à atividade bioquímica da H<sup>+</sup>-ATPase<sub>v</sub> quanto da isoforma gástrica da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Farajov e cols. (2008), com estudos *in vitro* de microperfusão em ramo ascendente espesso medular (mTAL) – segmento tubular com grande envolvimento na regulação mineral e ácido-base – de camundongos e medida do pH<sub>i</sub>, constataram que Neomicina promoveu alcalinização no pH<sub>i</sub> destas células por estimulação da secreção de prótons na região luminal via H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.

Ou seja, o receptor modulando mecanismos de extrusão de prótons em células do mTAL. Estudos utilizando segmentos isolados do DCME de camundongos controle e nocaute para o canal de cálcio TRPV5 encontraram que a secreção de prótons através da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> localizada nas células intercalares foi estimulada também por incrementos no  $Ca^{2+}_o$  e por Neomicina 200 $\mu$ M (Renkema e cols., 2009).

No túbulo proximal, o CaSR está localizado na membrana apical e sua expressão diminui do segmento S1 para o segmento S3 (Riccardi, 1996 e 1998; Okuda, 2001; Ward, 2002; Huang, 2010). Estudos demonstraram que há uma relação direta e positiva entre o incremento na  $[Ca^{2+}]_i$  e a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> (Poch, 1993; Villereal, 1981; Rosoff & Cantley, 1985; Tornquist & Tashjian, 1991; Hou, 2001); incluindo estudos com DCC de camundongo isolado (Fernandez, 2005). Considerando que um dos mecanismos de ação do CaSR envolve o incremento na concentração de  $Ca^{2+}_i$ , o que foi encontrado em nossos experimentos, é possível hipotetizar que este seria o processo responsável pelo incremento na atividade bioquímica da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> observado em nossas preparações ao estimular o CaSR com Neomicina,  $Gd^{3+}$  ou  $Ca^{2+}$  (ver figs. 7 a 11).

Apesar de as células OK expressarem tanto CaSR quanto a  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>, não há na literatura, até o momento, estudos que relacionem a expressão de CaSR com a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> neste modelo celular, embora o CaSR esteja atuando na regulação do pH em diversos segmentos renais, como já discutido. Nos estudos bioquímicos em homogenato de células OK, observamos que a modificação da concentração extracelular de cálcio modula a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> de forma dose-dependente (ver fig. 11). Estes resultados encontram apoio na literatura com estudos sugerindo que o CaSR apresenta um papel chave como sensor do cálcio extracelular por ser capaz de detectar pequenas mudanças nos níveis do íon no organismo. Incrementos na concentração de  $Ca^{2+}_o$  causam ativação do CaSR que irá atuar modulando direta ou indiretamente variações homeostáticas responsáveis por normalizar os níveis de cálcio (Valenti, 2010). Nos rins o CaSR tem sido identificado com sua expressão relacionada ao metabolismo do  $Ca^{2+}$  (Riccardi *et. al.*, 1996). Dentre os segmentos dos túbulos renais que expressam CaSR estão o túbulo proximal e ducto coletor, com expressão luminal; e ramo espesso ascendente da alça de Henle, com expressão basolateral (Valenti, 2010). A localização apical do CaSR sugere que nestes segmentos o receptor seja ativado por cálcio luminal, promovendo, hipoteticamente, o ajuste fino de várias funções fisiológicas.

Além disso, a adição dos agonistas do CaSR  $Gd^{3+}$  e Neomicina diretamente no meio de preparação, ocasionaram um aumento significativo na atividade bioquímica da  $H^+$ -ATPase, tanto no homogenato celular (ver figs. 7 e 8) quanto em amostras contendo membranas parcialmente purificadas. (ver figs. 9 e 10). Estes resultados são pertinentes com o que sugere a literatura, já que variações no cálcio extracelular ou a adição de agonistas no meio de preparação parece ativar CaSR e modular a atividade da  $H^+$ -ATPase.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos nos experimentos de atividade bioquímica foram realizados experimentos funcionais mensurando o pHi. Nestes experimentos verificamos que mesmo na ausência de  $Na^+$  o estímulo do CaSR promoveu uma alcalinização significativa, entretanto menor do que a observada ao adicionar o agonista do CaSR na solução contendo  $Na^+$ , sugerindo que o CaSR modularia tanto a atividade da  $H^+$ -ATPase, quanto a do trocador NHE-3 nesta linhagem celular (ver figs. 15, 16 e 21).

### **Respostas intracelulares pela ativação de CaSR**

O estímulo do CaSR pode ativar vias de sinalização intracelulares complexas, produzindo respostas e efeitos fisiológicos que podem variar de acordo com o tipo celular (Brown, 1998; Ward, 2004). Na maior parte dos modelos celulares estudados a resposta para a ativação do CaSR é primeiramente mediada pela ativação da proteína G a qual está acoplado. Ao ser estimulado pelo  $Ca^{2+}$  extracelular, o CaSR pode ativar as proteínas G,  $G_{q/11}$  e  $G_{12/13}$ , as quais estimulam Fosfolipase C (PLC) resultando na produção de diacilglicerol e  $IP_3$ , causando liberação de cálcio de estoques intracelulares, inibindo adenilato ciclase e ativando Rho quinase, respectivamente (Huang & Miler, 2007). A inibição da adenilato ciclase causa uma redução nos níveis de AMPc (Riccardi *et. al.*, 2009).

O CaSR apresenta a capacidade de ativar duas outras fosfolipases: Fosfolipase D (PLD) e  $A_2$  ( $PLA_2$ ) (Kifor, 1997). Huang *et. al.* (2004) demonstraram que a inibição da via PKC pelo CaSR em células MDCK não reduziu a atividade da PLD em resposta a 5mM de cálcio extracelular. Este grupo demonstrou que Rho estava mediando a ativação da PLD. Além disso, a ativação de PKC é parcialmente responsável pela ativação de  $PLA_2$ . O CaSR primariamente regula a atividade da  $PLA_2$  por incrementas nos níveis intracelulares de cálcio via proteína  $G_q$  ativadora de

PLC (Handlogten, 2001). A sensibilização do CaSR por agonistas pode levar a ativação de  $G_q$  que ativaria Fosfolipase C, um ativador de Proteína Quinase C (PKC) e/ou  $IP_3$ , levando a um aumento na concentração de cálcio intracelular. O mesmo estudo aponta uma interação do receptor com E-caderina através de mecanismo ainda pouco esclarecido, mas que também leva a ativação de PLC e aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  (Riccardi, 2009).

O CaSR em células OK (*Opossum Kidney*) é estimulado com altas concentrações de cálcio (5mM) ou com Neomicina e suas vias apresentaram relação com a PLC e a ERK (Ward, 2004); enquanto o CaSR presente nas células do ramo espesso da alça de Henle desencadeia uma resposta através da Fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) gerando Ácido Araquidônico que, juntamente com seus metabólitos, age suprimindo a secreção de PTH (Ward, 2004). Valenti e cols. (2010), trabalhando com a sinalização envolvida na ativação de CaSR em células do ducto coletor de ratos (MCD4) e registro da  $[Ca^{2+}]_i$  em tempo real, aponta que a estimulação de CaSR por  $Ca^{2+}$  5mM, 300 $\mu$ M de  $Gd^{3+}$  ou 10 $\mu$ M do modulador alostérico específico NPS R-568 aumenta a concentração de cálcio intracelular, embora este efeito tenha se apresentado com características diferentes conforme o agonista de CaSR utilizado. Neste mesmo estudo, foi encontrado que a inibição de Fosfolipase C pela droga U-73122 (inibidor específico de PLC) aboliu qualquer aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  após a estimulação com agonista do CaSR.

Estes achados contrariam parcialmente nossos resultados no que diz respeito à ativação do CaSR via Fosfolipase C, pois observamos que a incubação com o inibidor de fosfolipase C U-73122  $5 \times 10^{-7} M$  - e posterior adição de Neomicina - determinou um aumento significativo e sustentado da  $[Ca^{2+}]_i$  nas células OK (ver fig. 20). A uma concentração de U-73122  $5 \times 10^{-8} M$  - e posterior adição de Neomicina - observamos uma diminuição significativa da  $[Ca^{2+}]_i$  depois de uma pausa (fig. 21). Assim, a abolição da via PLC determinou uma diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$ . Porém, nos experimentos bioquímicos, observamos que U-73122 não foi capaz de bloquear o estímulo da atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> induzido por  $Gd^{3+}$ , ou seja, a inibição da via PLC não foi capaz de abolir a ativação do CaSR (ver fig. 12). Outros estudos serão realizados a fim de esclarecer este ponto. Por outro lado, a literatura citada corrobora os resultados obtidos com PMA, um ativador de PKC. Isso porque a incubação com PMA - e posterior adição de Neomicina - determinou um aumento significativo e sustentado da  $[Ca^{2+}]_i$  (ver fig. 19). Portanto, podemos generalizar que

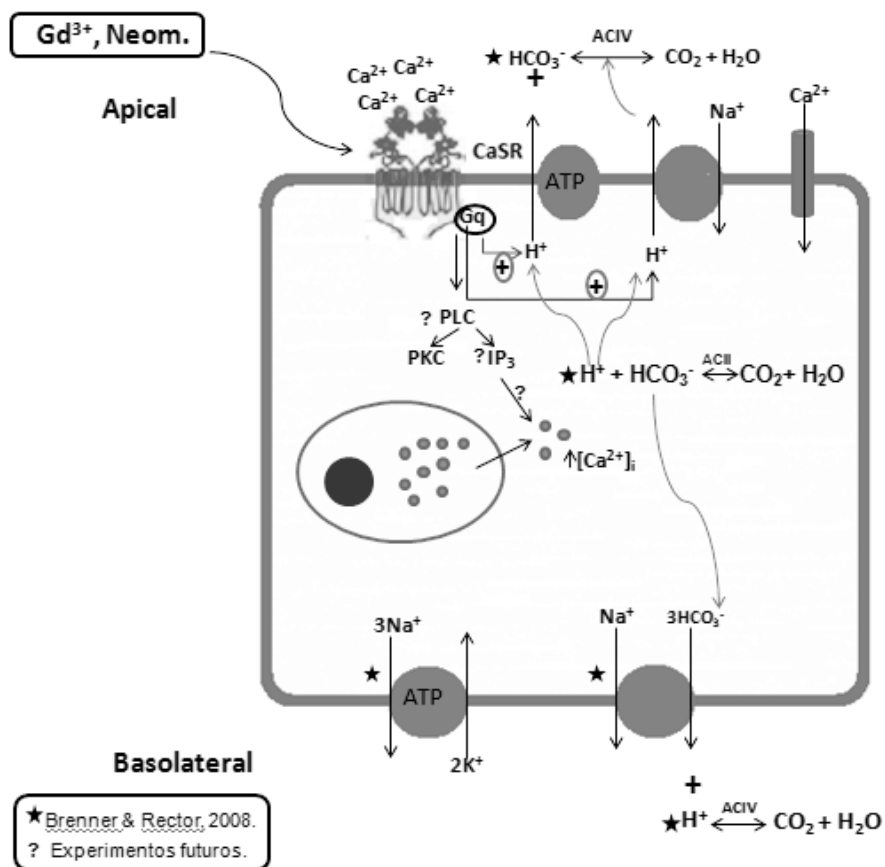
a ativação do CaSR por agonistas do receptor está relacionada com a ativação de PKC e aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ . Ademais, nos experimentos bioquímicos, observamos que PMA estimulou a atividade da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub>, ou seja, a ativação da via PKC reproduz o resultado encontrado ao estimular o CaSR (ver fig. 12).

Com o objetivo de investigar mais detalhadamente os mecanismos de sinalização intracelulares envolvidos na ativação do CaSR, realizamos experimentos utilizando Tapsigargina (0.1 $\mu$ M) e experimentos utilizando Tapsigargina (0.1 $\mu$ M) e EGTA – quelante de  $Ca^{2+}$ . A Tapsigargina é uma droga utilizada para depletar estoques de  $Ca^{2+}_i$ , já que inibe as ATPases transportadoras de  $Ca^{2+}$  mediadas por captadores deste íon no Retículo Sarcoplásmático.

Nos estudos com Tapsigarsina e solução contendo  $Ca^{2+}$ , observamos que a incubação por 15 minutos com Tapsigargina (0.1 $\mu$ M) resultou em uma diminuição significativa na  $[Ca^{2+}]_i$ . Com a adição de Neomicina (200 $\mu$ M) diretamente no meio de preparação, contendo aquela droga, não observamos um incremento significativo do  $Ca^{2+}_i$  (fig. 22). Estes resultados apontam a importância da mobilização de  $Ca^{2+}$  do Retículo Sarcoplasmático para o meio intracelular no incremento na  $Ca^{2+}_i$  observado ao estimular o CaSR. A incubação por 15 minutos com Tapsigargina (0.1 $\mu$ M) em solução livre de  $Ca^{2+}$  resultou em uma diminuição significativa na  $[Ca^{2+}]_i$ . Com a adição de Neomicina (200 $\mu$ M) diretamente no meio de preparação, contendo aquela droga e solução livre de  $Ca^{2+}$ , observamos também uma diminuição significativa do  $Ca^{2+}_i$  (fig. 23). Tais resultados não só reiteram a importância das vias intracelulares que mobilizam  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares, mas também sugerem que haveria uma dependência do  $Ca^{2+}_o$  na estimulação do CaSR, já que utilizando solução livre de cálcio e Tapsigargina, observamos uma diminuição mais pronunciada nos níveis de  $Ca^{2+}_i$ ; padrão este que se manteve na presença de Neomicina.

A figura 24 resume os resultados experimentais obtidos e apresenta possíveis vias de sinalização intracelulares envolvidas neste processo.

Outros estudos serão realizados pelo nosso grupo para elucidar as vias de sinalização intracelulares envolvidas no estímulo da  $H^+$ -ATPase<sub>v</sub> induzido pela ativação do CaSR nesta linhagem celular.



**Figura 24:** Modulação da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase, e do NHE-3 (contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  isoforma 3) pelo CaSR em células OK. **Legenda:** AC, anidrase carbônica; PKC, proteína quinase C;  $\text{IP}_3$ , Inositol 1,4,5 trifosfato; PLC, fosfolipase C; CaSR, Receptor sensível a Cálcio;  $\text{Gd}^{3+}$ , gadolínio; Neom., Neomicina.

## 6.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem afirmar que as células OK apresentam uma atividade bioquímica sensível a Bafilomicina  $\text{A}_1$   $10^{-7}\text{M}$  e a Concanamicina  $10^{-8}\text{M}$ , indicando a presença de uma  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo vacuolar.

Foi possível concluir também que o CaSR está presente nesta linhagem celular e atua modulando a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase, e possivelmente do contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  através de um incremento na concentração intracelular de cálcio, promovido, em parte, pela estimulação da via PKC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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
- BACIC, D.; KAISSLING, B.; MCLEROY, P.; ZOU, L.; BAUM, M.; MOE, O.W. **Dopamine acutely decreases apical membrane Na/H exchanger NHE3 protein in mouse renal proximal tubule.** *Kidney Int.*, **64(6)**: 2133-41, 2003.
- BAI, M.; QUINN, S.; TRIVEDI, S.; KIFOR, O.; PEARCE, SH.; POLLAK, MR.; KRAPCHO, K.; HEBERT, SC.; BROWN, EM. **Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca<sup>++</sup> sensing receptor.** *J. Biol. Chem.*, **271**: 19537-19545, 1996.
- 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.
- BOBULESCU I.A.; DWARAKANATH .V; ZOU, L.; *et. al.* **Glucocorticoids acutely increase cell surface Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 (NHE3) by activation of NHE3 exocytosis.** *Am J Physiol Renal Physiol.*; **289**: 685-691, 2005.
- BOSKEY, A.L. **Mineral-matrix interactions in bone and cartilage.** *Clin. Orthop.* **281**: 244-274, 1992.
- 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 el 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.
- BRENNER, B.M. e RECTOR, F.C. Brenner and Rector's. **The Kidney.** 8<sup>a</sup>. Ed. Editora Saunders, 2008.
- 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.; 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.; 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  $Ca^{2+}$  - sensing receptor from bovine parathyroid.** *Nature*, **366**: 575-580, 1993.

BROWN, E.M.; POLLAK M.; CHOU. Y.H.; SEIDMAN, C.E.; SEIDMAN, J.G.; HEBERT, S.C. **Cloning and functional characterization of extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptors from parathyroid and kidney.** *Bone*, **17**: 7S-11S, 1995.

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

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

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

CASARE, F.A.M.; FERNANDEZ, R. **Influência do receptor extracelular sensível a cálcio (CaR) sobre a atividade das  $H^+$ -ATPases renais.** *Ed. UFPR.* Curitiba, 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  $Ca^{++}$  receptor RaKCaR.** *J. Membr. Biol.* **156**: 117-129, 1997.

COLLAZO R.; FAN, L.; HU, M.C.; *et al.* **Acute regulation of  $Na^+/H^+$  exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis.** *J Biol Chem.* **275**: 31601-31608, 2000.

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

EL-HAJJ, FULEIHAN, G.; SEIFTER, J.; SCOTT, J.; BROWN, EM. **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  $Ca^{2+}$  receptor is essential for its expression of the cell surface.** *Endocrinology*, **138**: 1916-1922, 1997.

FARAJOV, I. E.; MORIMOTO, T.; ASLANOVA, N.K., SUGAWARA, N.; KONDO, Y. **Calcium-sensing receptor stimulates luminal K<sup>+</sup>-dependent H<sup>+</sup> excretion in medullary thick ascending limb of mouse kidney.** *J. Exp. Med.* **216**: 7-15, 2008

FERNANDEZ, R.; GIEBISCH, G.; GEIBEL, J. **Calcium sensing receptor (CaSR) and extracellular Ca<sup>++</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>) modulates proton secretion mechanisms in intercalated cells from mouse cortical collecting duct (CCD).** *In: ASN's 39th. Annual Renal Week Meeting, 2006, San Diego. JASN (Journal of the American Society of Nephrology), 2006.*

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. **Calcium transport in renal epithelial cells.** *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* **264**: 181-198, 1993.

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

GANITKEVICH, V.; HASSE, V.; PFITZER, G. **Ca<sup>2+</sup> -dependent and Ca<sup>2+</sup> -independent regulation of smooth muscle contraction.** *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**: 47-52, 2002.

GEIBEL, J.P.; GIEBISCH, G.; BORON, W.F. **Effects of acetate on luminal acidification processes in the S3 segment of the rabbit proximal tubule.** *Am. J. Physiol.*, **257**: 586-594, 1989.

GEIBEL, J.; GIEBISCH, G.; BORON, W.F. **Angiotensin II stimulates both Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in the rabbit proximal tubule.** *Proc Natl Acad Sci U S A*; **87**:7917-7920, 1990.

GIBBONS, C.E.; MALDONADO-PÉREZ, D.; SHAH, A.N.; RICCARDI, D.; WARD, D.T. **Calcium-sensing receptor antagonism or lithium treatment ameliorates aminoglycoside-induced cell death in renal epithelial cells.** *Biochimica et Biophysica Acta.* **1782**: 188-195, 2008.

GORDON, A.M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. **Regulation of contraction in striated muscle.** *Physiol. Rev.* **80**: 853-924, 2000.

HEBERT, SC. **Extracellular calcium-sensing receptor: implications for calcium and magnesium handling in the kidney.** *Kidney Int.*, **50**:2129-2139, 1996.

HO, C., CONNER, DA.; POLLAK, MR.; LADD, DJ.; KIFOR, O.; WARREN, HB.; BROWN, EM.; SEIDMAN, JG.; SEIDMAN, CE. **A mouse model of human familial**

**hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat. Genet.*, 11: 389-394, 1995.**

**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.**

**HANDLOGTEN, M.E.; HUANG, C.; SHIRAISHI, N.; AWATA, H.; MILLER, R.T. The Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor activates cytosolic phospholipase A2 via a G $\alpha$ -dependent ERK-independent pathway. *J Biol Chem*, 276: 13941–13948, 2001.**

**HUANG, C.; HUJER, K.M.; WU, Z.; MILLER, R.T. The Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor couples to G $\alpha$ (12/13) to activate phospholipase D in Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286: C22–C30, 2004.**

**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.; *et al.* Interaction of the Ca-sensing receptor with the inwardly-rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *Am. J. Physiol.* 292: 1073-1081, 2007.**

**HUANG, C., MILLER, R.T. Novel Ca receptor signaling pathways for control of renal ion transport. *Curr. Opin. Nephrology*. 19: 106-112, 2010.**

**JESUS FERREIRA, M.C. & BAILLY, C. Extracellular Ca<sup>2+</sup> decreases chloride reabsorption in rat CTAL by inhibiting cAMP pathway. *Am. J. Physiol.* 275: 198-F203, 1998a.**

**JESUS FERREIRA, M.C.; HELICS-TOUSSAINT, C.; IMBERT-TEBOUL, M.; BAILLY, C.; VERBAVATZ, JM.; BELLANGER, AC.; CHABARDES, D. Co-expression 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, 1998b.**

**KIFOR O.; DIAZ, R.; BUTTERS, R.; BROWN, E.M. The Ca<sup>2+</sup> - sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Bone Miner Res.* 12: 715–725, 1997.**

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

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

KUROKAWA, K. The **kidney and calcium homeostasis**. *Kidney Int.* **44**: S97-S105, 1994.

LAGHMANI, K.; PREISIG, P.A.; ALPERN, R.J. **The role of endothelin in proximal tubule proton secretion and the adaptation to a chronic metabolic acidosis**. *J Nephrol.* **15 Suppl. 5**: S75–S87, 2002.

LANG, K.S.; WAGNER, C.; HADDAD, G.; BURNEKOVA, O.; GEIBEL, J.P. **Intracellular pH activates membrane-bound Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and vacuolar H<sup>+</sup> ATPase in human embryonic kidney (HEK) cells**. *Cell Physiology and Biochemistry*, **13**: 257-262, 2003.

LEITE-DELLOVA, D.C.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. **Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H<sup>+</sup>-ATPase in proximal S3 segments**. *Am J Physiol Renal Physiol.* **300(3)**: 682-91, 2011.

McLARNON, S.; HOLDEN, D.; WARD, D.; JONES, M.; ELLIOTT, A.; RICCARDI, D. **Aminoglycoside antibiotics induce pHsensitive activation of the calcium-sensing receptor**. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**: 71–77, 2002.

MAGNO, A.L.; WARD, B.K.; RATAJCZAK, T. **The calcium-sensing receptor: a molecular perspective**. *Endocrine Reviews*. **32(1)**: 3-30, 2011.

MATHIAS, R.S.; BROWN, E.M. **Divalent cations modulate PTH-dependent 3',5'-cyclic adenosine monophosphate production in renal proximal tubular cells**. *Endocrinology* **128**: 3005–3012, 1991.

McKINNEY, T.D.; MYERS, P. **PTH inhibition of bicarbonate transport by proximal convoluted tubules**. *Am. J. Physiol.* **239**: 127-134, 1980.

MCLARNON, S.; HOLDEN, D.; WARD, D.; JONES, M.; ELLIOTT, A.; RICCARDI, D. **Aminoglycoside antibiotics induce pHsensitive activation of the calcium-sensing receptor**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**: 71–77, 2002.

MELLO AIRES, M. & MALNIC, G. **Sodium in renal tubular acidification kinetics**. *Am. J. Physiol.*, **236**: 434-41, 1979.

MOE, O.W.. **Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: Role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors**. *J. Am. Soc. Nephrol.*; **10**: 2412-2425, 1999.

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

NAKAMURA, S. **Glucose activates H<sup>(+)</sup>-ATPase in kidney epithelial cells**. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; **287(1)**: C97-105.

NELSON, N. **Structure and function of chloroplast ATPase.** *Bioch. Biophys. Acta*, **456**: 314-338, 1976.

NEMETH E.F.; SCARPA, A. **Rapid mobilization of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor.** *J. Biol. Chem.* **262**: 5188–5196, 1987.

NEMETH, E.F.; CARAFOLI, E. **The role of extracellular calcium in the regulation of intracellular calcium and cellfunction— introduction.** *Cell Calcium* **11**: 319–321, 1990.

NEMETH, E.F.; STEFFEY, M.E.; HAMMERLAND, L.G.; HUNG, B.C.; VAN WAGENEN, B.C.; DELMAR, E.G.; BALANDRIN, M.F. **Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4040–4045, 1998.

NEMETH, E.F.; FOX, J. **Calcimimetic compounds: a direct approach to controlling plasma levels of parathyroid hormone in hyperparathyroidism.** *Trends Endocrinol Metab* **10**: 66–71, 1999.

OKUDA, M.; CHENG, S.; HALL, A.E.; HEBERT, S.C. **Calcium sensing receptor regulates the activity of  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  in the renal proximal tubule (abstract).** *J Am Soc Nephrol* **12**: A3956, 2001.

PASTORIZA-MUNOZ, E.; HARRINGTON, R.M.; GRABER, M.L. **Parathyroid hormone decreases  $\text{HCO}_3^-$  reabsorption in the rat proximal tubule by stimulating phosphatidylinositol metabolism and inhibiting base exit.** *J. Clin. Invest.*; **89**: 1485-1495, 1992.

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

PERGHER, P.S.; LEITE-DELLOVA, D.; DE MELLO-AIRES, M. **Direct action of aldosterone on bicarbonate reabsorption in vivo cortical proximal tubule.** *Am. J. Physiol.*, **296(5)**: 1185-1193, 2009.

PIN, J.P.; GALVEZ, T.; PRÉZEAU, L. **Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors.** *Pharmacol. Ther.* **98**:325–354, 2003.

POCH, E.; BOTEY, A.; GAYA, J.; CASES, A.; RIVERA, F.; REVERT, L. **Intracellular calcium mobilization and activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in platelets.** *Biochem J* **290 (Pt 2)**: 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  $\text{Ca}^{++}$ -**

**sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism.** *Cell*, **75**: 1297-1303, 1993.

RENKEMA, K.; VELIC, A.; DIJKMAN, H.; VERKAART, S.; NOWIK, M.; TIMMERMANS, K.; DOUCET, A.; WAGNER, C.; BINDELS, R.; HOENDEROP, J. **The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis.** *J. Am. S. Nephrol.*, 2009 May 21. [Epub ahead of print]

RICCARDI, D.; BROWN, E. M. **Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney.** *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**: 485–499, 2010.

RICCARDI, D.; FINNEY, B.A.; WILKINSON, W. J.; KEMP, P.J. **Novel regulatory aspects of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor, CaR.** *Eur J Physiol*, **458**: 1007-1022, 2009.

RICCARDI, D. & GAMBA, G. **The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease.** *Archives of Medical Research*, **30**:436-448, 1999.

RICCARDI, D.; HALL, A.E.; CHATTOPADYHAY, N.; XU, JZ.; 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.; LEE, W.S.; LEE, K.; SEGRE, G.V.; BROWN, E.M.; HEBERT, S.C. **Localization of the extracellular Ca<sup>++</sup>/polyvalent cation-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney.** *Am. J. Physiol.*, **271**: 951-956, 1996.

RICCARDI, D. **Cell surface, ion-sensing receptors.** *Exp. Physiol.* **87**: 403–411, 2002.

RINGER, S. **A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart.** *J. Physiol.* **4**: 29–42.3, 1883.

RODRIGUEZ, M.; NEMETH, E; MARTIN, D. **Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism The calcium-sensing receptor: a key factor in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism.** *Am J Physiol Renal Physiol* **288**: 253-264, 2004.

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.

ROUSE, D. & SUKI, W.N. **Modulation of phosphate absorption by calcium in the rabbit proximal convoluted tubule.** *J. Clin. Invest.*, **76**: 630-636, 1985.

RUIZ, O.S.; QIU, Y.Y.; WANG, L.J.; ARRUDA, J.A. **Regulation of the renal Na-HCO<sub>3</sub> cotransporter: V. Mechanism of the inhibitory effect of parathyroid hormone.** *Kidney Int.* **49**: 396-402, 1996.

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.

SITARAMAYYA, A. **Calcium-dependent activation of guanylate cyclase by S100b.** *Adv. Exp. Med. Biol.* **514**: 389-398, 2002

SCHWARTZ, G.J.; AL-AWQATI, Q. **Role of hensenin in mediating the adaptation of cortical collecting duct to metabolic acidosis.** *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **14**: 383-388, 2005.

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.

SVOBODA, K.; DENK, W.; KLINFELD, D.; TANK, D.W. **In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons.** *Nature.* **385**: 161-165, 1997.

TAKANO, M.; NAKANISHI, N.; KITAHARA, Y.; SASAKI, Y.; MURAKAMI, T.; NAGAI, J. **Cisplatin-induced inhibition of receptor-mediated endocytosis of protein in the kidney.** *Kidney International.* **62**: 1707-1717, 2002.

THAKKER, R. V. **Disorders of the calcium-sensing receptor.** *Biochim. et Biophys. Acta.*, **1448**:166-170, 1998.

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.

THOMAS, J.; BUCHSBAUM, R.; ZIMINIAK, A.; RACKER, E. **Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ.** *Biochemistry*, **18**: 2210-18, 1979.

TORNQUIST, K.; TASHJIAN, A.H. JR. **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.

YANG, T.; HASSAN, S.; HUANG, YG.; SMART, AM.; BRIGGS, JP.; 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.

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

VALENTI, G.; MIRA, A.; MASTROFRANCESCO, L.; LASORSA, R.; RANIERI, M.; SVELTO, M. **Differential modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> responses associated with calcium-sensing receptor activation in renal collecting duct cells.** *Cellular Physiology and Biochemistry.* **26**: 901-912, 2010.

VEZZOLI, G.; TERRANEGRA, A.; RAINONE, F.; ARCIDIACONO, T.; COZZOLINO, M.; ALOIA, A.; DOGLIOTTI, E.; CUSI, D.; SOLDATI, L. **Calcium-sensing receptor and calcium kidney stones.** *Journal of Translational Medicine*, **9**: 201, 2011.

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.; 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.; LUKEWILLE, U.; VALLES, P.; BRETON, S.; BROWN, D.; GIEBISCH, G.H.; GEIBEL, J.P. **A rapid enzymatic method for the isolation of defined kidney tubule fragments from mouse.** *Pflugers Arch.* **446**: 623-632, 2003.

WANG, WH.; LU, M.; BALAZI, M.; HEBERT, SC. **Phospholipase A2 is involved in mediating the effect of extracellular Ca<sup>+</sup> on apical K<sup>+</sup> channels in rat TAL.** *Am. J. Physiol.* **273**: 421-F429, 1997.

WANG, WH.; LU, M.; HEBERT, SC. **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**: C103-C111, 1996.

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

WARD, D.T.; McLARNON, S.J.; RICCARDI, D. **Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor.** *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**: 1481-1489, 2002.

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

WORCESTER, E.M.; COE, F.L. **Calcium kidney stones.** *N Engl J Med.* **363**: 954-963, 2010.

WUTHIER, R.E. **Involvement of cellular metabolism of calcium and phosphate in calcification of avian plate cartilage.** *J. Nutr.* **123**: 301-309, 1993.