

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILLA MARYS COSTA DOS SANTOS

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA H⁺ ATPASE DO TIPO VACUOLAR
PRESENTE NUM MODELO DE CÉLULA INTERCALAR RENAL (CÉLULAS MDCK
– C11): EFEITO SOBRE A ATIVIDADE ATPÁSICA E A CONCENTRAÇÃO
INTRACELULAR DE CÁLCIO.**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fernández Perez

CURITIBA

2007

PRISCILLA MARYS COSTA DOS SANTOS

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA H⁺ ATPase DO TIPO VACUOLAR
PRESENTE NUM MODELO DE CÉLULA INTERCALAR RENAL (CÉLULAS MDCK
– C11): EFEITO SOBRE A ATIVIDADE ATPÁSICA E A CONCENTRAÇÃO
INTRACELULAR DE CÁLCIO**

**Monografia apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas, Departamento de Fisiologia, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná.**

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

CURITIBA

2007

DEDICATÓRIA

A 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 e ética dentro da prática científica. À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Tararhuch a colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes os equipamentos cedidos para a realização do presente estudo. À Daniele, Eloísa, Evandra, Juliana, Kaline e Letícia o apoio, atenção e momentos de alegria durante esses quatro anos. À Fundação Araucária o auxílio financeiro prestado. À minha irmã Pâmela e a meus pais Rubens e Rose o amor e carinho durante todos os dias de minha vida.

Se alguém quiser jogar uma nova luz sobre as mentes humanas, por um caminho que não é áspero nem está na moda, convém se sirva das fábulas e se abrigue nas similitudes.

De Sapientia veterum, Francis Bacon

SUMÁRIO

1 RESUMO	1
2 INTRODUÇÃO	2
2.1 Antecedentes gerais.....	2
2.2 Fatores de regulação.....	4
2.2.1 Arginina-vasopressina.....	4
2.2.2 O íon K^+	5
2.2.3 O Cl^- na secreção eletrogênica de H^+	5
2.3 Células MDCK.....	6
3 OBJETIVOS	8
4 MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1 Cultivo Celular.....	8
4.2 Obtenção do Homogenado Celular.....	9
4.3 Determinação Bioquímica da Atividade das H^+ -ATPases no Homogenado.....	9
4.4 Quantificação protéica.....	13
4.5 Determinação das modificações na concentração intracelular de cálcio.....	13
4.6 Reagentes.....	14
4.7 Análise Estatística.....	14
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1 Determinação do efeito do ADH na atividade da H^+ ATPase.....	14
5.2 Determinação das modificações na concentração intracelular de cálcio.....	17
5.3 Determinação do efeito de uma hipercalemia sobre a atividade das H^+ ATPases presentes nas células MDCK.....	19
6.0 CONCLUSÃO	21
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1 RESUMO

As células intercalares presentes no segmento conector e no ducto coletor do rim de mamíferos apresentam a capacidade de secretar prótons de forma ativa, utilizando duas ATPases, a H⁺ ATPase do tipo vacuolar e uma H⁺-K⁺ ATPase. Trabalhos recentes do nosso laboratório têm demonstrado que o subclone C11 das células MDCK possui mecanismos de secreção de prótons semelhantes aos encontrados nas células intercalares do ducto coletor. Neste estudo tivemos como objetivo principal dar continuidade à caracterização funcional das ATPases secretoras de prótons presentes nestas células; em especial estudar o efeito do hormônio antidiurético (*i.e.*, vasopressina) e de um incremento na concentração extracelular de K⁺ (hipercalemia). Nos experimentos foram utilizadas células MDCK C11 (passagem 76 a 86) semeadas em placas de seis *wells* a uma densidade de 10⁶ células/cm³. Nos experimentos em que estudamos o efeito da hipercalemia sobre a atividade ATPásica a concentração de K⁺ no meio de cultivo foi incrementada de 5mM a 9mM, nas 24 horas prévias ao experimento ou desde o momento das células serem semeadas (48 a 72h). Após a confluência as células foram removidas e a atividade bioquímica das H⁺ ATPases foi determinada em um homogenado contendo todas as estruturas celulares por um método colorimétrico modificado do descrito por Fiske-Subarow. A atividade da H⁺ ATPase vacuolar foi calculada pela diferença entre o P_i liberado na ausência e na presença de bafilomicina A1 ou concanamicina 10⁻⁸M, a presença da H⁺-K⁺ ATPase foi determinada a partir da sensibilidade a Vanadato 1mM (inibidor de ATPases do tipo P). Num grupo de experimentos a concentração intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) foi determinada por fluorometria utilizando o *probe* FLUO 4.

A atividade da H⁺ ATPase vacuolar foi estimulada de forma significativa por uma dose fisiológica de vasopressina (10⁻¹¹) (7,93±0,55nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com ADH vs 4,87±0,50 no basal, n=17), mas não foi alterada por uma dose suprafisiológica (10⁻⁹M) (4,47±0,71nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com ADH 10⁻⁹M vs 5,25±0,94 no basal, n=19). Nos experimentos realizados para avaliar as modificações na [Ca²⁺]_i a vasopressina 10⁻⁹M induziu um incremento significativo do sinal fluorescente, o que indica um incremento significativo na [Ca²⁺]_i. Em relação aos níveis controle o incremento médio foi de 324.99±32.42%, *p*=0.02 (n=3). Com a adição de K⁺ 9mM diretamente no meio de cultivo 24h antes do experimento, observou-se um incremento não significativo tanto na atividade da H⁺ ATPase vacuolar: 7,45±3,05nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com K⁺ 9mM vs 5,17±1,69 no basal (5mM), n=7; quanto na atividade da H⁺-K⁺ ATPase: 9,30±2,02nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com K⁺ 9mM vs 8,04±1,55 no basal (5mM), n=7). Já a incubação com K⁺ a 9mM por 48h-72h estimulou de forma significativa a atividade da H⁺ ATPase vacuolar: 17,56±3,56nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com K⁺ 9mM vs 8,11±1,68 no basal (5mM), n=9, *p*= 0,03. Por outro lado, a atividade da H⁺-K⁺ ATPase não apresentou uma modificação significativa: 20,24±4,32nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com K⁺ 9mM vs 11,32±2,59 no basal (5mM), n=10, *p*= 0,09.

Os resultados obtidos nos permitem afirmar que a atividade da H⁺ ATPase do tipo vacuolar presente nas células MDCK C11 é estimulada de forma significativa com a adição de ADH a doses fisiológicas (10⁻¹¹M), e por uma hipercalemia de no mínimo 48-72 horas.

Palavras-chave: MDCK C11; cultivo celular; Ca²⁺ intracelular; atividade ATPásica; H⁺ ATPase; H⁺-K⁺ ATPase; hipercalemia.

2 INTRODUÇÃO

2.1) Antecedentes gerais

A manutenção da concentração do íon hidrogênio no meio interno dentro de faixas estreitas de variação é essencial para que diversas reações enzimáticas intracelulares aconteçam. O rim é de fundamental importância para que esta função fisiológica seja atendida, garantindo a regulação da homeostase ácido-base – eliminação diária (por filtração e subsequente acidificação da urina) de uma quantidade de ácido liberada composta de ácidos fixos (*i.e.*, radicais ácidos não voláteis) produzidos pelo metabolismo e na reabsorção do HCO_3^- filtrado. Estes processos são possíveis através da secreção de prótons pela membrana apical das células que constituem os túbulos renais. Esta secreção é garantida (Mello Aires & Oliveira-Souza, 2000) por mecanismos que variam de um tipo celular para outro, envolvendo transportadores de íons inseridos na membrana plasmática ($\text{Na}^+\text{-H}^+$, H^+ ATPase, $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPase, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$).

O túbulo distal de mamífero apresenta a capacidade de reabsorver e secretar bicarbonato dependendo do estado ácido-base do meio interno. Este movimento bidirecional de bicarbonato tem sido demonstrado em ratos e coelhos, com a secreção de íons H^+ mediando a reabsorção de bicarbonato, e o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ a secreção do mesmo (Levine *et. al.*, 1990; Fernandez & Malnic, 1995; Mello Aires & Malnic, 2002). Ambos os processos são independentes do sódio e são facilitados pela anidrase carbônica. Estes processos de transporte acontecem nas células intercalares. Estudos auto-radiográficos e imunocitoquímicos têm mostrado a existência de dois subtipos de células intercalares (Schuster, 1993; Brown *et. al.*, 1988): a alfa (α) e a beta (β). A membrana apical das células intercalares α apresenta dois mecanismos de secreção de prótons: uma H^+ ATPase vacuolar e uma $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPase. A presença destes mecanismos baseia-se em: a) estudos de microperfusão com inibidores; b) análise bioquímica; e c) localização imunohistoquímica (Brown *et. al.*, 1988; Planelles *et. al.*, 1991; Wang *et. al.*, 1993; Fernández *et. al.*, 1994; Laroche-Joubert *et. al.*, 2000). As células β secretam HCO_3^- e reabsorvem Cl^- via um trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apical, apresentando mecanismos de secreção de prótons na membrana basolateral (Schuster, 1993). Estudos recentes

em rato, coelho e camundongo demonstram que o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dessas células é diferente do tipo AE1 das células α (Tsuganezawa, 2001; Kim, 2002).

A H^+ ATPase apical, responsável pela acidificação do ducto coletor, pertence a uma classe de bombas de prótons denominada vacuolar. Apresenta um peso molecular aproximado de 900kDa e é composta de múltiplas subunidades que se dividem em dois domínios funcionais (Wagner, 2004). O domínio citoplasmático V1 (catalítico) possui todos os nucleotídeos envolvidos na hidrólise do ATP; o domínio intramembrana Vo se encarrega da translocação dos prótons através da membrana, comportando-se como um canal hidrofóbico para H^+ (Gluck, 1993, 1996; Stone *et. al.*, 1990). Evidências da existência de uma H^+ ATPase nas células do túbulo distal cortical foram obtidas primariamente por técnicas bioquímicas, com as quais foi possível detectar uma H^+ ATPase sensível a NEM (N-etil-maleimida) (Garg & Narang, 1985; Ait-Mohamed *et. al.*, 1986). Brown (1988) & Sabatini (1991) observaram níveis significativos de H^+ ATPase ao longo do túbulo distal cortical mediante imunohistoquímica. Nesta porção se encontrou um padrão de marcação transitória, sendo a porção distal final a mais marcada, porção esta onde começam a aparecer as células intercalares. Nestas células a H^+ ATPase alcança uma densidade estimada em 14.000 bombas/ μm^3 , e é responsável pela maior parte da secreção ácida nas mesmas.

Trabalhos recentes de vários laboratórios têm reportado evidências convincentes de que o rim possui um mecanismo específico para a absorção ativa primária de K^+ acoplada à secreção de prótons na membrana apical do ducto coletor. Esta absorção ativa é mediada por uma H^+-K^+ ATPase similar - mas provavelmente não idêntica - à H^+-K^+ ATPase do estômago (Wingo & Cain, 1993; Wingo & Smolka, 1995). A atividade ATPásica - por medida do ATP celular - é estimulada por K^+ em segmentos provenientes do néfron de coelho e sua atividade é proporcional à densidade de células intercalares; ou seja, é maior no túbulo conector, intermediária no coletor cortical, menor no coletor medular externo e não detectada em outro segmento do néfron (Doucet & Marsy, 1987).

2.2) Fatores de regulação

Diversos fatores alteram a secreção de prótons pelas H⁺ ATPases nos segmentos distais do néfron: mudanças no equilíbrio ácido-base; níveis plasmáticos de hormônios, tais como aldosterona, ADH, calcitonina e Angiotensina II; e íons como K⁺ e Cl⁻.

2.2.1) Arginina-vasopressina

O ADH ou arginina-vasopressina (AVP) a uma dose de 10⁻¹¹M estimula a secreção de prótons e a reabsorção de HCO₃⁻ no túbulo distal e DCC de rato via receptores V1 (Bichara, 1987; Levine, 1994; Barreto-Chaves, 1997; Musa-Aziz, 2002). A expressão do RNAm desse receptor se incrementa em estados de acidose metabólica crônica; por outro lado, em estados de desidratação essa expressão é inibida (Tashima, 2001). O ADH parece estimular tanto o trocador Na⁺-H⁺ como a H⁺ ATPase via o receptor V1; entretanto, a estimulação do receptor V2 apresenta efeito inibitório na atividade desses transportadores (Barreto-Chaves, 1997; Oliveira-Souza, 2001). Não foram realizados experimentos a fim de identificar o tipo celular envolvido nesse efeito. Em estudo com microperfusão *in vitro* (Barreto-Chaves M.L. & Mello-Aires M., 1997) demonstraram que, em segmento distal final de rim de rato, arginina-vasopressina 10⁻⁹M estimula a H⁺ ATPase; porém, no ducto coletor de coelho, um segmento que contém vários componentes estruturais similares a esses do túbulo distal final, Ando *et. al.*, 1991 sugeriu que AVP 10⁻⁹M pode inibir a secreção eletrogênica de H⁺.

Oliveira-Souza *et. al.*, (2001 e 2004), trabalhando com células MDCK *wild type* e a técnica de registro do pHi com um marcador fluorescente, descobriram que o ADH em doses de 10⁻¹²M e 10⁻⁹M estimula a secreção de prótons nestas células através do trocador Na⁺-H⁺ e da H⁺ ATPase do tipo vacuolar (sensível a bafilomicina). Esse efeito foi mediado principalmente pela ligação do hormônio ao receptor do tipo V1, ativando, desta forma, a via proteína G – fosfolipase C – IP3 – Ca²⁺. Trabalhando com uma dose farmacológica (10⁻⁶M) esses autores observaram que a atividade do trocador Na⁺-H⁺ era inibida (2001) e a da H⁺ ATPase do tipo vacuolar continuava sendo estimulada (2004). Nas três doses estudadas foi observado um incremento dose-dependente na concentração intracelular de cálcio.

Até o presente momento não existem estudos analisando o efeito deste hormônio diretamente sobre a atividade da H⁺ ATPase.

2.2.2) O íon K⁺

A H^+K^+ ATPase é controlada por vários fatores, sendo o conteúdo de K^+ na dieta um dos mais importantes. Uma dieta com baixo teor de K^+ estimula e uma dieta com alto teor de K^+ inibe a atividade da H^+K^+ ATPase no ducto coletor cortical e no medular externo (Doucet & Marsy, 1987; Garg & Narang, 1988; Ahn e col, 1996; Zies *et. al.*, 2002). A *depleção* de K^+ estimula também a atividade da H^+ ATPase eletrogênica no túbulo distal de rato (Bailey *et. al.*, 1998) e em células intercalares do DCC (Silver *et. al.*, 2000). A atividade e expressão da H^+K^+ ATPase renal é importante para o balanço ácido-base e para a regulação do transporte de K^+ no ducto coletor, principalmente em animais *depletados* de K^+ . Em consequência, sua inibição levaria ao desenvolvimento de uma acidose metabólica hipocalêmica (Dafnis *et. al.*, 1992).

2.2.3) O Cl^- na secreção eletrogênica de H^+

A translocação do íon hidrogênio através da membrana pela H^+ ATPase vacuolar é eletrogênica, com o interior da célula apresentando-se negativo em relação ao exterior. Esse processo gera um potencial transmembrana em adição a um gradiente químico, resultando na auto-limitação da atividade da H^+ ATPase vacuolar. Em várias organelas intracelulares e membranas plasmáticas celulares uma condutância paralela de Cl^- promove um *shunt* elétrico, compensando os íons positivos transferidos pelo transportador, dissipando, assim, o gradiente elétrico (Brown *et. al.*, 2003).

Em vários tipos celulares tem sido demonstrado que a eliminação de Cl^- do meio ou o uso de bloqueadores de canais para Cl^- levam à deficiência na acidificação promovida pela H^+ ATPase (Kaunitz, Gunther & Sachs, 1985; Vieira, Slotki & Cabantchik, 1995). No túbulo distal cortical de rim de rato, o bloqueio dos canais para Cl^- por NPPB - um bloqueador específico dos canais de Cl^- em rim (Cabantchick & Greger, 1992) - inibe a secreção de H^+ (Fernández, *et. al.*, 1997). Porém, não se pode distinguir o tipo celular específico no qual essa droga estaria atuando (Fernández, 1997). Quando a via apical para Cl^- é inibida, a corrente positiva gerada pela H^+ ATPase fica evidente. Esse resultado sugere que o túbulo distal final utiliza preferencialmente o Cl^- para o *shunt* da acidificação eletrogênica (Fernández, 1997). Porém, a interação dos íons Cl^- com a H^+ ATPase não pode ser explicada unicamente pela dissipação da diferença de potencial através das membranas (Kaunitz *et. al.*, 1985). Por exemplo, em um trabalho recente com

células MDCK C11 observamos uma dependência funcional da H⁺ ATPase para o íon Cl⁻ e os seus canais, que é modulada por AMPc e ATP mas não pelo gradiente elétrico que se estabelece pelo transporte eletrogênico de prótons (Tararhuch *et. al.*, 2007).

2.3) Células MDCK

As células MDCK, derivadas do rim de cachorro normal (Cocker Spaniel) por Madin-Darby em 1958, estão entre as mais bem caracterizadas células do epitélio renal. Estas células formam monocamadas com características morfológicas de um epitélio polarizado: borda em escova, *tight junctions* apicais e espaços laterais intercelulares (Rabito, *et. al.*, 1978).

As células MDCK não representam uma população homogênea, estando constituídas por dois subtipos recentemente clonados: C7 e o C11 (Gekle *et. al.*, 1994). Morfológicamente, estes clones apresentam várias diferenças: as células C11 são cubóides, com o núcleo inconspícuo e espaços intercelulares largos; já as C7 apresentam uma forma poligonal, com um núcleo celular conspícuo e espaços intercelulares pequenos. Esses subtipos também são diferentes quanto à composição de suas *tight junctions*, apresentando, conseqüentemente, diferença na resistência transepitelial. O C7 apresenta maior resistência: > 1KΩ/cm² vs 100 Ω/cm² do C11 (Amasheh *et. al.*, 2002). O subclone C7 possui a capacidade de reabsorver Na⁺ e secretar K⁺. Esse transporte de Na⁺ sensível a amiloride é estimulado pela aldosterona, ADH e IGF1 (Blazer-Yost *et. al.*, 1996). Cerca de dois terços das C11 apresentam uma marcação com lecitina de amendoim - um marcador específico para as células intercalares β (recentemente esta especificidade foi colocada em dúvida) - a nível apical. Assim, o subtipo C7 se assemelha às células principais do ducto coletor e as C11 às intercalares.

Nos últimos anos temos trabalhado com o clone C11 (Fernández, 2000; Tararhuch, 2002 e 2007), tendo mostrado a presença do trocador Na⁺-H⁺, da H⁺ ATPase e da H⁺-K⁺ ATPase com a medida do pHi (*i. e.*, pH intracelular) através do uso de marcador fluorescente (BCECF) em monocamadas cultivadas em suportes permeáveis, o que nos permitiu substituir de forma independente as soluções apical e basolateral e, assim, estudar a polaridade desses mecanismos. O trocador Na⁺/H⁺ e a H⁺ ATPase se encontram tanto na membrana apical como na basolateral; entretanto, a H⁺-K⁺ ATPase apresenta uma localização exclusivamente apical. A

presença de uma H⁺ ATPase funcionalmente ativa tanto na membrana apical como na basolateral indica a existência de duas subpopulações de células intercalares: α e β . Isto é reforçado pelo achado de Gekle *et. al.*, (1996) de que dois terços das células C11 apresentam uma marcação com lecitina de amendoim a nível apical, um marcador de células β . Ebner & Marin-Grez (1998) identificaram por vídeo-fluorometria duas subpopulações de células intercalares nas células MDCK *wild type*: uma com o trocador Cl⁻/HCO₃⁻ na membrana apical (β) e a outra com o trocador na membrana basolateral (α). Ademais, as células MDCK *wild type* e as C11 expressam o RNA para a isoforma 2 do trocador Cl⁻/HCO₃⁻ (AE2) (Prime *et. al.*, 1998).

Resultados obtidos pelo nosso laboratório -- com a determinação da atividade bioquímica das H⁺ ATPases nas células MDCK - C11 por um método colorimétrico modificado do descrito por Fiske-Subarow em um homogenado contendo todas as estruturas celulares -- mostraram que a atividade ATPásica nessas células foi inibida de forma significativa por bafilomicina, omeprazol e vanadato. A atividade sensível a bafilomicina mostra uma curva de sensibilidade ao pH da solução - com um pH ótimo de 6.0 - e um estímulo significativo pelo hormônio aldosterona. Foi verificada também a presença da H⁺-K⁺ ATPase mediante estimulação desta com a adição de K⁺ na solução de reação e pela sensibilidade a vanadato (Freitas, Mendes & Fernandez, 2003). Esse incremento na atividade ATPásica, observado ao adicionar K⁺, resulta de um estímulo significativo tanto na atividade sensível ao vanadato 1mM como a bafilomicina 10⁻⁷ M. Além disso, demonstramos que a atividade da H⁺-ATPase do tipo vacuolar é modulada pelo íon Cl⁻ (Santos, P. & Fernández, 2006).

Portanto, as células MDCK - C11 apresentam várias propriedades que as caracterizam como um modelo adequado para o estudo *in vitro* dos mecanismos de regulação da secreção de prótons pelas H⁺ ATPases presentes nas células intercalares dos segmentos distais do néfron de mamífero.

3 OBJETIVOS

Neste estudo tivemos como objetivo principal dar continuidade à caracterização funcional das ATPases secretoras de prótons presentes nas células MDCK - C11: a H⁺ ATPase e a H⁺-K⁺ ATPase. Em especial: 1) estudar o efeito do hormônio antidiurético (*i.e.*, vasopressina) em dose fisiológica (10⁻¹¹M) e

suprafisiológica (10^{-9}M) sobre a atividade das H^+ ATPases e a concentração intracelular de cálcio; 2) estudar o efeito de uma hipercalemia sobre a atividade das H^+ ATPases presentes nas células MDCK.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Cultivo Celular

Neste estudo foi utilizado o tipo celular MDCK - C11 fornecido pelo Prof. Oberleithner (*Department of Physiology, University of Münster, Germany*). As células foram semeadas em garrafas plásticas de cultivo ou placas de seis *wells* a $10^6/\text{cm}^3$ e mantidas em meio MEM, *Minimum Essential Medium* (Gibco™, Grand Sland, NY), contendo sais de *Earle*, aminoácidos não essenciais e L-glutamina. O meio foi suplementado com soro bovino fetal a 10%, NaHCO_3 26mM; Penicilina 10U/ml e Estreptomicina 10mg/ml também foram adicionados. Os cultivos foram mantidos em uma estufa a 37°C a uma atmosfera de CO_2 de 5% (Shellab – USA). O meio foi trocado três vezes por semana, monitorando-se o crescimento das células através da observação diária em microscópio óptico. As células foram cultivadas até atingirem confluência (cerca de 72h após a realização da cultura); então foram submetidas à experimentação ou removidas quimicamente com Tripsina-EDTA (Gibco™, Grand Sland, NY) para o repique. No caso dos experimentos destinados a reproduzir uma situação de hipercalemia, as células foram cultivadas num meio de cultura com alta concentração de K^+ (9mM) durante 24h, 48h ou 72h.

4.2) Obtenção do Homogenado Celular

A reação foi iniciada com a adição, na solução de reação, do homogenado celular. O procedimento utilizado para a obtenção do homogenado celular é o que segue: 1) tomar as garrafas plásticas ou placas contendo seis *wells* confluentes e descartar o meio de cultura; 2) proceder à lavagem do epitélio com PBS (livre de Mg^{2+} e Ca^{2+}) duas vezes; 3) adicionar PBS e realizar a remoção mecânica das células (*i. e.*, raspagem) com auxílio do *cell scraper*; 4) centrifugar a 1.200rpm por cinco minutos; 5) remover o sobrenadante e ressuspender o *pellet* formado (*i. e.*, as células) com 300 μl da solução de solubilização. Essa solução contém: Triton X-100 1% (um detergente não iônico utilizado para separar proteínas de lipídios), EDTA 50mM, HEPES-Tris 0,5M (pH 7,0) e Sacarose 0,5M.

Após a obtenção deste homogenado, as células deverão permanecer pré-incubadas nesta solução por 30 minutos a 4°C.

4.3) Determinação Bioquímica da Atividade das H⁺-ATPases no Homogenado

Realizamos experimentos com a finalidade de determinar a atividade das H⁺ ATPases em um homogenado (descrito no item 3.2) contendo células MDCK - C11 com todas as suas estruturas de membrana. O fosfato inorgânico 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). Através deste método é possível mensurar o fosfato inorgânico (Pi) liberado do ATP pela ação das ATPases celulares. O Pi forma um complexo colorido ao reagir com Molibdato de Amônio e Metovanadato de Amônio. A reação é iniciada com a adição do homogenado celular -- com uma concentração final de proteína de 0,3mg/ml -- à solução de reação com intervalos de 15 segundos entre um tubo de ensaio e outro (tabela 01). Após o disparo da reação, os tubos são mantidos a 37°C em banho-maria por 30 minutos quando, então, a reação é interrompida pela adição de 1000µl de Ácido Tricloro Acético 12%; nos tubos brancos a reação é disparada com a adição do homogenado celular à solução de reação após 28 minutos de incubação e interrupção da reação logo em seguida de modo que a reação não ocorra neste tubo e, assim, seja possível a obtenção da atividade basal. Após esta etapa as amostras são imediatamente centrifugadas a 2.000rpm em centrífuga refrigerada (*Eppendorf 5810R*, USA) a 4°C por 5 minutos com a finalidade de precipitar o ATP não hidrolisado e as proteínas. Após a centrifugação, 500µl do sobrenadante - contendo o Pi resultante da hidrólise do nucleotídeo – é aliquoteado e transferido para novos tubos de ensaio, aos quais são adicionado 500µl do reativo de cor. Os tubos são submetidos à agitação no *vortex* e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente deve proceder-se a leitura no espectrofotômetro a 380nm (*Ultraspec 2.000*, *Pharmacia Biotech*, *Germany*).

Com a adição da proteína após 30 minutos de reação é possível a determinação da hidrólise espontânea de fosfato. A diferença entre o valor da

quantidade de Pi encontrado nos tubos e o valor observado no tubo branco é realizada a fim de se obter o valor real de Pi 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 deve-se proceder como segue: para um volume de 100ml, misturar 5ml da solução A a 5ml da solução B, adicionando 3,7ml de HNO_3 e completando o volume com água deionizada.

A atividade da H^+ ATPase foi calculada pela diferença entre o Pi liberado na ausência e na presença de concanamicina 10^{-8}M ou bafilomicina A1 10^{-7}M (diferença entre os tubos 1 e 2 das tabelas 2 e 3). A presença da H^+-K^+ ATPase foi determinada a partir da sensibilidade da atividade ATPásica a orto-vanadato de sódio 1mM: diferença entre os tubos 1 e 5 da tabela 2 (protocolo com vasopressina); e diferença entre os tubos 1 e 3 da tabela 3 (protocolo em que foi estudado o efeito de uma hipercalemia crônica). Para verificar o efeito do tratamento crônico do epitélio com alta concentração de K^+ foram seguidos dois protocolos nos quais tínhamos duas amostras, uma a K^+ a 5mM (controle) e uma com o íon a 9mM. Em um destes protocolos as células foram cultivadas e o K^+ adicionado 24h antes dos experimentos; no outro protocolo as células foram cultivadas com o K^+ em alta concentração desde o seu repique, ou seja, desde o momento em que as células foram semeadas na placa de cultura que seria submetida à experimentação.

A atividade ATPásica é expressa em nmol de Pi liberados por mg de proteína por unidade de tempo ($\text{Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

A solução de reação utilizada nos experimentos (ver tabela 1, na metodologia) contém 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; EGTA (substância que quela o íon cálcio) e PBS livre de Ca^+ e Mg^{++} , para inibir a Ca^+ -ATPase. Como consequência, a quantidade de Pi encontrado no tubo 1 corresponde à atividade das demais ATPases celulares e denominamos esta atividade como basal - após ter descontado o Pi resultante da hidrólise espontânea, tubo Branco.

Tabela 1 – Solução MRC:

Substância	Concentração
MgCl ₂	4mM
Azida de Sódio	10mM
Hepes-Tris (pH7,0)	50mM
ATP Na ⁺	4mM
Ouabaína	1mM
Oligomicina	10mM
EGTA	1mM

Tabela 2 – Solução de Reação (Experimentos com vasopressina):

Tubos	MRC (100µl) (Tabela 01)	KCl (0,2M)	ADH (10 ⁻⁸ M)	Anti V1	Concanamicina 10 ⁻⁸ M	Vanadato (1mM)	H ₂ O	Proteína
Br	X	----	----	----	----	----	X	X (após 30 min.)
1	X	X (50mM)	----	----	----	----	X	X
2	X	X (50mM)	----	----	X	----	X	X
3	X	X (50mM)	X	----	X	----	X	X
4	X	X (50mM)	X	X	X	----	X	X
5	X	X (50mM)	----	----	----	X	X	X
6	X	X (50mM)	X	----	----	X	X	X

Nota: o volume final do tubo de reação é 0,2mL.

Tabela 3 – Solução de Reação (experimentos onde foi estudado o efeito de uma hipercalemia crônica sobre a atividade das H⁺ ATPases presentes nas células MDCK):

Tubos	MRC (100µl) (Tabela 01)	KCl (0,2M)	Bafilomicina (10 ⁻⁷ M)	Vanadato (1mM)	H ₂ O	Proteína
Br	X	----	----	----	X	X (após 30 min.)
1	X	X	----	----	X	X
2	X	X	X	----	X	X
3	X	X	----	X	X	X

Nota: o volume final do tubo de reação é 0,2mL.

4.4) Quantificação protéica

A concentração de proteínas presente no homogenado celular foi determinada seguindo o método de Bradford (1976), que possibilita a quantificação de proteína presente em uma amostra desconhecida com base na construção de uma curva padrão de uma proteína conhecida (albumina bovina, SIGMA).

4.5) Determinação das modificações na concentração intracelular de cálcio

As modificações na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) foram determinadas em monocamadas de células MDCK - C11 utilizando o *probe* fluorescente FLUO – 4 (*Molecular Probes*). As células foram cultivadas nas condições descritas no item 3.1, com a diferença de que após o repique foram semeadas em lamínulas de vidro estéreis e colocadas em placas de *Petri*. Os experimentos foram realizados após as monocamadas celulares terem alcançado a confluência (aproximadamente 72h). No dia do experimento as lamínulas eram incubados numa cubeta de espectrofluorímetro com uma solução ringer controle mais FLUO-4 6µM, durante 25min a temperatura ambiente. Após este período a lamínula era lavada com ringer controle e colocada em outra cubeta com solução ringer controle a 37°C durante 15min a fim de remover os restos de *probe* desesterificados. As modificações na $[Ca^{2+}]_i$ foram determinadas a partir do espectro de excitação a 480nm, enquanto se mede a emissão de fluorescência a 520nm a cada 10 segundos utilizando um espectrofluorímetro (SHIMADZU). O *probe* FLUO-4

apresenta um incremento da intensidade fluorescente na faixa verde (520nm) após a ligação do 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. As modificações na intensidade fluorescente induzidas pelas manobras experimentais foram expressas como porcentagem em relação à intensidade de fluorescência no período basal.

4.6) Reagentes

Bafilomicina A1, Concanamicina, Ouabaína, EGTA (Ethylene Glycol – bis (β -Aminoethyl Ether) – N,N,N',N' - Tetraacetic acid), ATP- Na^+ , EDTA, Vanadato, AVP (ADH, PM: 1084), Antagonista do receptor V1 (β -Mercapto- β , -cyclopentamethylene-propionyl, O-Me-Tyr, Arg - Vasopressina), e gluconato de K^+ obtidos da SIGMA; Azida sódica, DMSO (Dimethyl-Sulfoxide), obtidos da MERCK; e FLUO 4 da Molecular Probe. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.7) Análise Estatística

Os resultados são reportados como valores médios com seu erro padrão. Foi utilizado o teste *t* de *student* para comparar dois grupos, e quando se compararam mais de dois grupos foi utilizado a Análise de Variância de uma via seguida do teste de *Student-Newman-Keulls*. O critério de significância estatística se obtém com valores de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Determinação do efeito do ADH na atividade da H^+ ATPase

Estudamos o efeito do hormônio antidiurético (ADH) em duas concentrações, 10^{-11}M (dose fisiológica) e 10^{-9}M (dose suprafisiológica), sobre a atividade da H^+ ATPase vacuolar. Com a adição de ADH 10^{-11}M diretamente na preparação, observou-se um incremento significativo na atividade sensível a concanamicina 10^{-8}M (atividade da H^+ ATPase) ($7,93 \pm 0,55 \text{ nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ com ADH 10^{-11}M vs $4,87 \pm 0,50$ no basal, $n=17$). Desenvolvemos também experimentos utilizando inibidores específicos do receptor para vasopressina do tipo V1, a fim de determinar a via pela qual o ADH está atuando na H^+ ATPase do tipo vacuolar. Na figura 1 se observa que o efeito estimulante do ADH foi revertido totalmente na

presença do inibidor para o receptor V1 ($4,84 \pm 0,79 \text{ nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=8$). Por outro lado, a atividade sensível a vanadato não foi modificada pela incubação com ADH, $8,29 \pm 0,85 \text{ nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de atividade basal vs $8,72 \pm 0,88$ ($n=10$) com ADH 10^{-11}M . Quando o mesmo protocolo experimental foi reiterado utilizando uma dose supra fisiológica de ADH (10^{-9}M), a atividade da H^+ ATPase não se modificou de forma significativa ($4,47 \pm 0,71 \text{ nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ com ADH 10^{-9}M vs $5,25 \pm 0,94$ no basal, $n=19$), efeito que foi acentuado na presença simultânea de ADH e do inibidor do receptor do tipo V1 ($3,58 \pm 0,98 \text{ nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ com ADH 10^{-9}M + Anti V1, $n=12$).

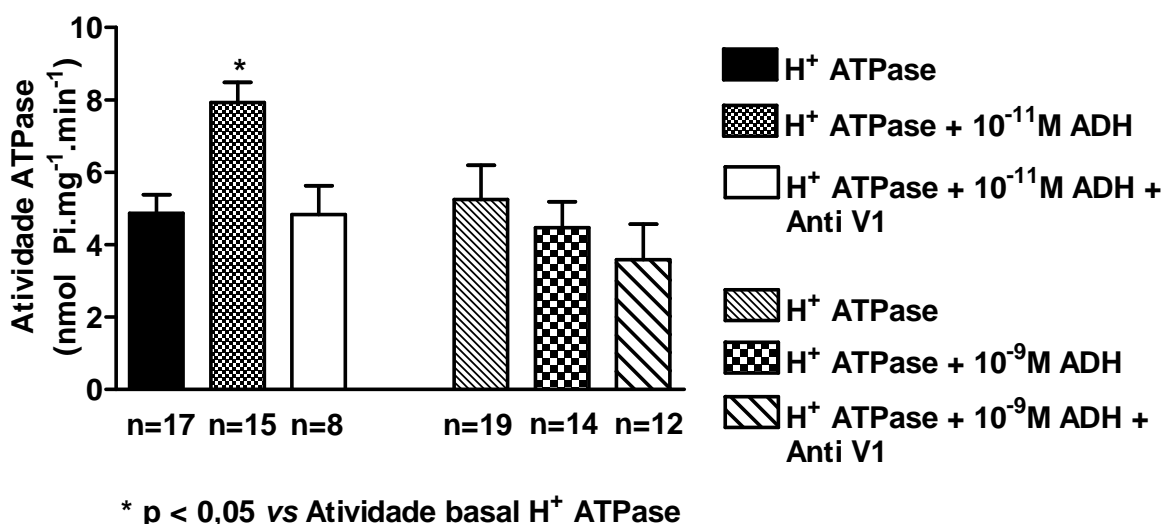


Figura 1: Estímulo da H^+ ATPase pelo hormônio antidiurético 10^{-11}M e reversão do efeito ao utilizar um inibidor do receptor para ADH do tipo V1.

Os dados de estimulação do ADH (10^{-11}M) sobre a secreção de prótons através da H^+ ATPase coincidem com os resultados apresentados em um trabalho com perfusão luminal do túbulo conector e do ducto coletor inicial de rato pela técnica de microperfusão *in vivo*, o qual mostrou que ADH 10^{-11}M estimula significativamente a reabsorção de bicarbonato - via a ativação do receptor V1; porém, os mecanismos de secreção de prótons envolvidos não foram avaliados neste estudo (Musa-Aziz, 2002). Coincidem também com os dados apresentados por Oliveira de Souza *et. al.* (2001 e 2004). Trabalhando com células MDCK *wild type* e a técnica de registro do pHi (pH intracelular) com um marcador fluorescente, estes autores encontraram que o ADH em doses de 10^{-12}M e 10^{-9}M estimula a secreção de prótons nestas células através do trocador Na^+-H^+ e da H^+ ATPase do

tipo vacuolar (sensível a bafilomicina). Este efeito foi mediado principalmente pela ligação do hormônio ao receptor do tipo V1, ativando desta forma a via proteína G – fosfolipase C – IP3 – Ca²⁺. Trabalhando com uma dose farmacológica, 10⁻⁶M, observaram que a atividade do trocador Na⁺-H⁺ era inibida (2001) e a da H⁺ ATPase do tipo vacuolar continuava sendo estimulada (2004). Com as três doses estudadas foi observado um incremento dose-dependente na concentração intracelular de cálcio. O tipo celular específico envolvido nestes efeitos não foi estudado nestes trabalhos.

No presente estudo trabalhamos com uma linhagem celular que apresenta semelhanças com as células intercalares que se encontram nos segmentos distais do néfron (Gekle, 1994; Fernández, 2000), e encontramos um estímulo específico e significativo sobre a atividade da H⁺ ATPase do tipo vacuolar em dose fisiológica (10⁻¹¹M). Este efeito acontece pela ligação do hormônio ao receptor do tipo V1, receptor este que utiliza a via de sinalização fosfolipase C – Inositol 3,4,5 trifosfato (IP₃) – Ca⁺⁺. Este receptor se localiza tanto nos domínios apical como basolateral dos segmentos distais do néfron (Grider, 1996; Ikeda, 1994). Num trabalho recente foi determinada a localização segmental do RNAm para os receptores de vasopressina por hibridização e imunohistoquímica *in vitro* (Carmosino, 2007). Este estudo confirmou a localização do receptor do tipo V1 nas células intercalares do ducto coletor cortical e medular de camundongos e seres humanos. A sua localização não tem sido estudada nas células MDCK *wild type* ou no subclone MDCK-C11.

Trabalhando com uma dose suprafisiológica (10⁻⁹M) não observamos um incremento na atividade da H⁺ - ATPase, um resultado conflitante com aquele descrito por outros autores (Oliveira, 2004 & Barreto-Chaves, 1997). Uma explicação possível seria a de que em doses altas o ADH estaria atuando também através do receptor de membrana do tipo V2. Este receptor utiliza como via de sinalização intracelular a via da adenilato ciclase – AMPc – proteína quinase, uma via que inibe a H⁺ ATPase presente em vesículas de endocitose (Gurich, 1996 & Tompkins, 2002). Esta discordância entre os efeitos observados com doses suprafisiológicas de ADH foi encontrada em outros estudos. Por exemplo, experimentos de microperfusão *in vitro* (Barreto-Chaves, 1997) demonstraram que no segmento distal final de rim de rato, arginina-vasopressina 10⁻⁹M estimula a H⁺ ATPase; porém,

no ducto coletor de coelho, um segmento que contém vários componentes estruturais similares a esses do túbulo distal final, Ando *et. al*, 1991 sugeriu que AVP 10^{-9} M pode inibir a secreção eletrogênica de H^+ . Novos estudos se fazem necessários a fim de esclarecer este ponto.

5.2 Determinação das modificações na concentração intracelular de cálcio

As modificações na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) foram avaliadas utilizando o *probe* fluorescente FLUO 4. Um incremento da intensidade fluorescente deste *probe* corresponde a um incremento na $[Ca^{2+}]_i$, porém não é possível calibrá-lo dado que o mesmo não apresenta um ponto isobéptico que permita aplicar o método da razão fluorescente. Desta forma, as modificações observadas são expressas em unidades arbitrárias de fluorescência, e não em concentração.

Na figura 2 observamos os resultados obtidos em três preparações independentes ao adicionar ADH 10^{-9} M a cubeta. Em todos os experimentos a vasopressina induziu um incremento significativo do sinal fluorescente, o que indica um incremento significativo na $[Ca^{2+}]_i$. Em relação aos níveis controle o incremento médio foi de $324.99 \pm 32.42\%$, $p=0.02$ ($n=3$). Este incremento na concentração intracelular de Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i$ coincide com os resultados obtidos por Oliveira-Souza trabalhando com células MDCK *wild type* (2004). O incremento observado na $[Ca^{2+}]_i$ com ADH 10^{-9} M sugere que a falta de estímulo da atividade da H^+ ATPase do tipo vacuolar não pode ser explicado por uma ausência de estímulo do receptor tipo V1. É bem conhecido que a vasopressina induz um incremento do Ca^{2+} intracelular ao se ligar ao receptor de tipo V1, entretanto o receptor do tipo V2 está acoplado a via AMPc/PKA (Morel, 1993). Por limitações de tempo não foi possível realizar o registro da $[Ca^{2+}]_i$ na presença de um inibidor do receptor do tipo V1, nem com uma concentração de ADH 10^{-11} M.

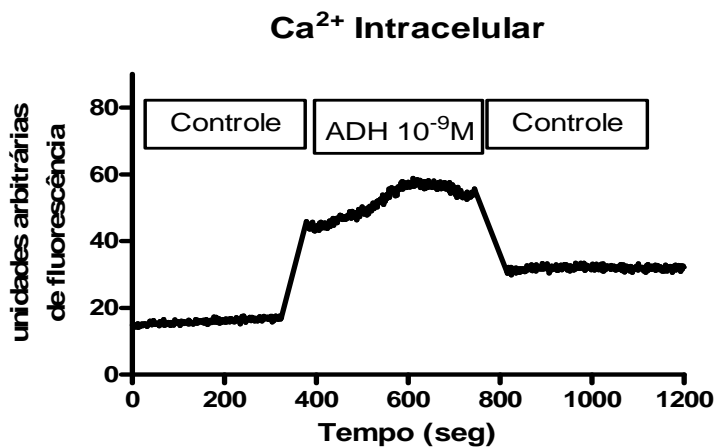
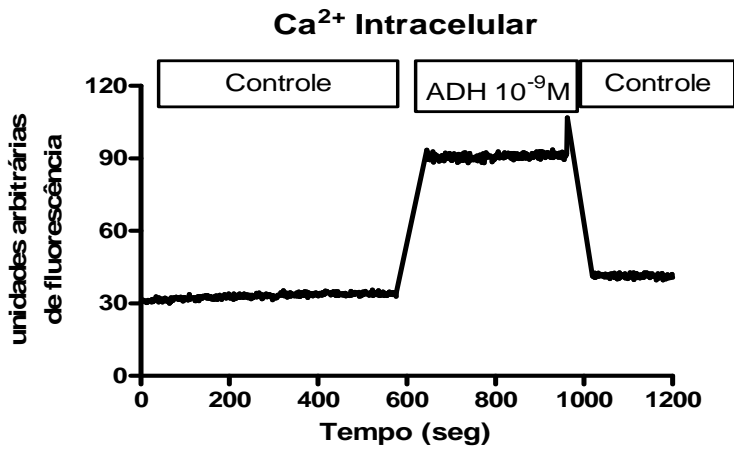
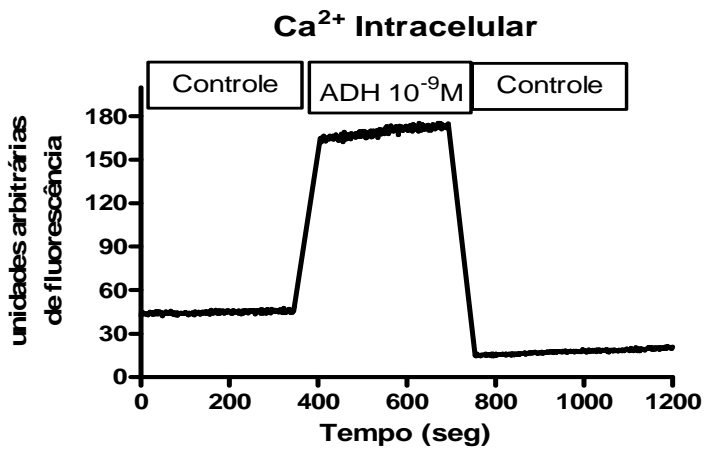


Figura 2 - Incremento na concentração intracelular de Ca²⁺ na presença de ADH 10⁻⁹M.

5.3 Determinação do efeito de uma hipercalemia sobre a atividade das H⁺ ATPases presentes nas células MDCK

Por último, estudamos o efeito de um incremento da concentração extracelular de K⁺ (hipercalemia) sobre a atividade da H⁺ ATPase vacuolar e da H⁺-K⁺ ATPase. Com este fim realizamos experimentos onde a concentração de K⁺ no meio de cultivo foi incrementada de 5mM a 9mM, nas 24 horas prévias ao experimento ou desde o momento das células serem semeadas (48 a 72hs de hipercalemia). Com a adição de K⁺ 9mM diretamente no meio de cultivo 24h antes do experimento, observou-se um incremento não significativo tanto na atividade sensível a concanamicina 10⁻⁸M (atividade da H⁺ ATPase vacuolar): 7,45±3,05nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com K⁺ 9mM vs 5,17±1,69 no basal (5mM), n=7; quanto na atividade sensível a vanadato (H⁺-K⁺ ATPase) : 9,30±2,02nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com K⁺ 9mM vs 8,04±1,55 no basal (5mM), n=7) (ver Figura 3).

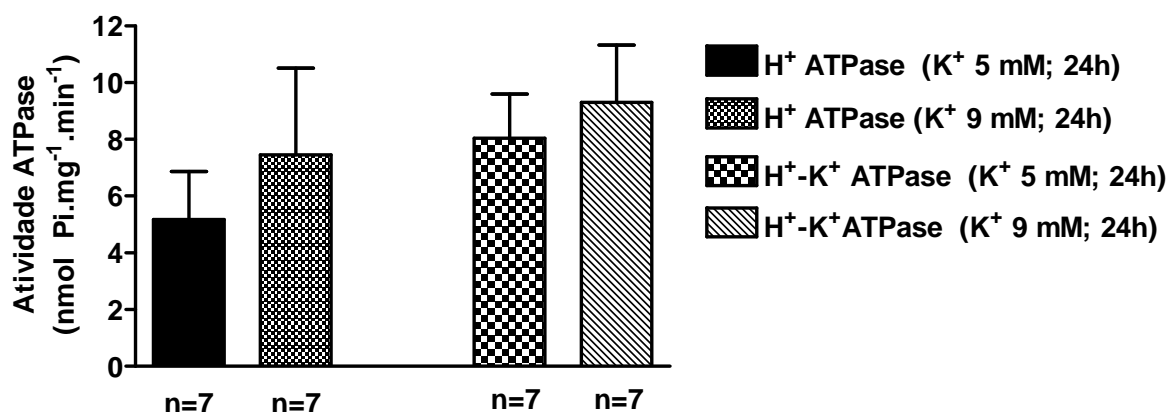


Figura 3 – Atividade da H⁺ATPase e da H⁺-K⁺ ATPase após a adição de K⁺ 9mM no meio de cultivo 24h antes da realização dos experimentos.

A fim de determinar se submetendo as células a uma hipercalemia por um período de tempo maior (48-72h) a atividade das H⁺ ATPases seria modificada de forma significativa, desenvolvemos experimentos nos quais as células foram submetidas a um ambiente hipercalemico desde o momento que foram semeadas. Na figura 4 se observa que a incubação com K⁺ a 9mM por 48h-72h estimulou de forma significativa a atividade da H⁺ ATPase vacuolar: 17,56±3,56nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ com K⁺ 9mM vs 8,11±1,68 no basal (5mM), n=9, p= 0,03. Por outro lado, a atividade

sensível a vanadato não apresentou uma modificação significativa: $20,24 \pm 4,32 \text{ nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ com K^+ 9mM vs $11,32 \pm 2,59$ no basal (5mM), $n=10$, $p=0,09$.

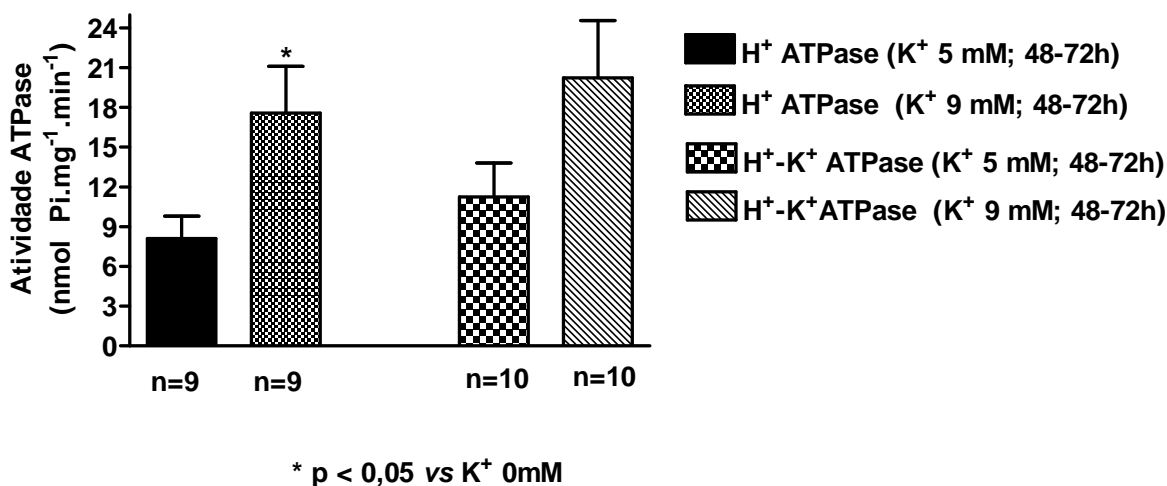


Figura 4 - Incremento significativo na atividade da H⁺ATPase vacuolar ocasionado pela adição de K⁺ 9mM no meio de cultivo desde o momento em que as células eram semeadas até a realização dos experimentos (48 a 72h).

Alterações na concentração plasmática de potássio estão associadas com modificações da homeostasia ácido-base como consequência do intercâmbio de eletrólitos (K⁺ e H⁺) entre os compartimentos intra e extracelulares, e por alterações nos mecanismos renais de transporte. Em particular, a hipocalcemia leva a uma alcalose metabólica, em parte provocada por uma saída do potássio intracelular e a consequente entrada de prótons, e em parte por um estímulo do co-transporte Na⁺/HCO₃⁻ no túbulo proximal e uma hipertrofia das células intercalares no ducto coletor cortical e medular associada a uma maior localização apical da H⁺ ATPase vacuolar (Amlal, 2000; Stetson, 1980; Bailey, 1998). Um efeito da hipercalemia sobre a ATPase vacuolar não tem sido reportado até o presente momento. Neste estudo encontramos um claro incremento da atividade da H⁺ ATPase do tipo vacuolar ao cultivar as células MDCK C11 num ambiente hipercalêmico por 48-72 horas. Maiores estudos são necessários para entender o mecanismo responsável por este efeito.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem afirmar que as células MDCK C11 apresentam uma atividade bioquímica sensível a bafilomicina A1 10⁻⁷M e a

concanamicina 10^{-8} M, indicando a presença de uma H^+ ATPase do tipo vacuolar. Atividade esta que é estimulada de forma significativa com a adição de vasopressina a doses fisiológicas (10^{-11} M) utilizando uma via de sinalização ligada ao receptor do tipo V1, e não modificada significativamente com a adição de vasopressina a doses suprafisiológicas (10^{-9} M), apesar desta dose induzir um incremento significativo na concentração intracelular de cálcio. Esta ATPase é estimulada também por incrementos na concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$ 9mM) de no mínimo 48-72 horas, por uma via não estudada até o presente momento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, K.Y.; PARK, K.Y.; KIM, .K.K.; KONE, B.C. **Chronic hypokalemia enhances expression of the H^+ - K^+ ATPase α_2 subunit gene in renal medulla.** *Am. J. Physiol.*, **271**:F314-F321, 1996.
- AIT-MOHAMED, A.K.; MARSY, S.; BARLET, C.; KHADOURI, C.; DOUCET, A. **Characterization of N-Ethylmaleimide sensitive proton pump in the rat kidney.** *J. Biol. Chem.*, **261**:12.526-33, 1986.
- AMASHEH, S.; MEIRI, N.; GITTER, A.H.; SCHONEBERG, T.; MANKERTZ, J.; SCHULZKE, J.D.; FROMM, M. **Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells.** *J. Cell Sci.*, **115(24)**:4969-4976, 2002.
- ANDO, Y.; TABELI, K.; ASANO, Y. **Luminal vasopressin modulates transport in the rabbit cortical collecting duct.** *J. Clin. Inv.* **88**:952-959, 1991.
- AMLAL, H; HABO, K.; SOLEIMANI, M. **Potassium deprivation upregulates expression of renal basolateral Na^+/HCO_3^- cotransporter.** *Am. J. Physiol.*, **279**:F532-F543, 2000.
- BAILEY, M.A.; FLETCHER, R.M.; WOODROW, D.F.; UNWIN, R.J.; WALTER, S.J. **Upregulation of H^+ ATPase in the distal nephron during potassium depletion: structural and functional evidence.** *Am. J. Physiol.*, **275**:F878-F884, 1998.
- BERMUDEZ, L.; WINDHAGER, E. E. **Osmolotically induced changes in electrical resistance of distal tubules in rat kidneys.** *Am. J. Physiol.*, **229**:1536-46, 1975.

BARRETO – CHAVES ML; MELLO – AIRES M. **Luminal arginine vasopressin stimulates Na⁺ -H⁺ exchange and H⁺ - ATPase in cortical distal tubule via V1 receptor.** *Kidney Int* 52:1032 – 1041, 1997.

BICHARA, M.; MERCIER, O.; HOUILLIER, P; PAILLARD, M.; LEVIEL, F. **Effects of antidiuretic hormone on urinary acidification and on tubular handling of bicarbonate in the rat.** *J. Clin. Invest.*, 80:621-630, 1987.

BLAZER-YOST, B.L.; RECORD, R.D.; OBERLEITHNER, H. **Characterization of hormone-stimulated Na⁺ transport in a high-resistance clone of the MDCK cell line.** *Pflügers Arch.*, 432:685-692, 1996.

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

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

CABANTCHICK, Z. I.; GREGER, R. **Chemical probes for anion transporters fo mammalian cell membranes.** *Am. J. Physiol.*, 262:C803-27,1992.

CARMOSINO, M., H.BROOKS, Q.CAI, L.S.DAVIS, S.OPALENIK, C.M.HAO, AND M.D.BREYER. **Axial heterogeneity of Vasopressin receptor subtypes along the human and mouse collecting duct.** *Am. J. Physiol Renal Physiol.*, 292:F351-F360, 2007.

DAFNIS, A.; SPOHN, M.; LONIS, B.; KURTZMAN, N. A.; SABATINI, S. **Vanadate causes hypocalemic distal renal tubular acidosis.** *Am. J. Physiol.*, 262:F449-53,1992.

EBNER, S.; MARIN-GREZ, M. **Video-imaging micro-fluorometric assessment of luminal chloride/bicarbonate exchange activity in Madin-Darby canine kidney cells: Influence of cell density, 4,4'-diisothiocyano-2,2'- disulfonic stilbene and acetazolamide.** *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 377(5):275-281, 1996.

DOUCET, A.; MARSY, S. **Characterization of K⁺-ATPase activity in distal nephron: stimulation by potassium depletion.** *Am. J. Physiol.*, 253: F418-23, 1987.

FERNÁNDEZ, R.; BOSQUEIRO, J. R.; CASSOLA, A. C.; MALNIC, G. **Role of Cl⁻ in electrogenic H⁺ secretion by cortical distal tubule.** *J. Membr. Biol.* 157(2):193-201,1997.

FERNÁNDEZ, R.; LOPES, M.J.; LIRA, R.F.; DANTAS, W.F.G.; CRAGOE JR., E.J.; MALNIC, G. **Mechanism of acidification along cortical distal tubule of the rat.** *Am. J. Physiol.*, 266:F218-F226, 1994.

FERNÁNDEZ, R.; MALNIC, G. **Secretion of HCO₃⁻/OH⁻ in cortical distal tubule of rat.** *J. Membr. Biol.*, 157:193-201, 1995.

FERNÁNDEZ, R. **Estudos dos mecanismos de transporte de prótons e bicarbonato em células do nefro distal de mamífero: papel do íon Cl⁻.** São Paulo, 1997. 85 f. Tese, (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

FERNÁNDEZ, R.; MALNIC, G. **Na⁺ Independent proton secretion in MDCK-C11 cells.** *Pflügers Archv – European J. of Physiology*, 441(2-3):287-293, 2000.

FREITAS, F., MENDES, J., FERNANDEZ, R. P. **Regulação hormonal das H⁺ ATPases em células MDCK – C11.** Trabalho apresentado no XXI Congresso da Associação Latino Americana de Ciências Fisiológicas. Ribeirão Preto – SP, 2003.

GARG, L.C.; NARANG, N. **Stimulation of an N-Ethylmaleimide sensitive ATPase in the collecting ducts segments of the rat nephron by metabolic acidosis.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **63**:1291-96, 1985.

GARG, L. C.; NARANG, N. **Ouabain-insensitive K⁺ adenosine triphosphatase in distal nephron segments of the rabbit.** *J. Clin. Invest.* **81**:1204-08, 1988.

GEKLE, M.; WUNSCH, S.; OBERLEITHNER, H.; SILBERNAGL, S. **Characterization of two MDCK cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties.** *Pflugers Arch.*, **428**:157-162, 1994.

GEKLE, M.; SILBERNAGL, S.; WUNSCH, S. **Nongenomic action of the mineralocorticoid aldosterone on cytosolic sodium in cultured kidney cells.** *J. Physiol.*, **511**:255-263, 1998.

GLUCK, S.L. **The vacuolar H⁺ -ATPases: Versatile proton pumps participating in constitutive and specialized functions of eukaryotic cells.** *Int. Re. Cytol.*, **137C**:105-37, 1993.

GLUCK, S.L.; UNDERHILL, D.M.; IYORI, M.; SHANNON HOLLIDAY, L.; KOSTROMINOVA, T.V.; LEE, B.S. **Physiology and Biochemistry of the Kidney vacuolar H⁺ ATPase.** *Ann. Rev. Physiol.*, **58**:427-45, 1996.

GRIDER, J.; FALCONE, J.; KILPATRICK, E. *et. al.* **Effect of luminal vasopressin on NaCl transport in the medullary thick ascending limb of rat.** *Eur. J. Pharmacol.* **315**:115-118, 1996.

GURICH, R.W.; DUBOSE, T. D. JR. Heterogeneity of cAMP effect on endosomal proton transport. *Am. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **257**:F777-F784, 1989.

IKEDA, M.; YOSHITOMI, K.; IMAI, M., *et. al.* **Cell Ca⁺⁺ response to luminal vasopressin in cortical collecting tubule principal cells.** *Kidney Int.* **45**:811-816, 1994.

KAUNITZ, J. D.; GUNTHER, R. D.; SACHS, G. **Characterization of an electrogenic ATP and Chloride-dependent proton translocating pump from Rat Renal Medulla.** *J. Biol. Chemistry* **260**:11567-11573, 1985.

LAROCHE-JOUBERT, N.; MARSY, S.; DOUCET, A. **Cellular origin and hormonal regulation of K⁺ ATPase activities sensitive to Sch-28080 in rat collecting duct.** *Am. J. Physiol.*, **279**:F1053-F1059, 2000.

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

LEVINE, D.Z.; IACOVITTI, M.; BUCKMAN, S.; HARRISON, V. **In vivo modulation of rat distal tubule net HCO₃⁻ flux by VIP, isoproterenol, angiotensin II and ADH.** *Am. J. Physiol.*, **266**:F878-F883, 1994.

MELLO-AIRES, DE M., OLIVEIRA-SOUZA, M. 2000. **Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on pHi regulation in MDCK cells.** *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**:F944-F953.

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

MOREL, A., S.J. LOLAIT, AND M.J. BROWNSTEIN. **Molecular cloning and expression of rat V_{1a} and V₂ arginine vasopressin receptors.** *Regul. Pept.* **45**:53-59, 1993.

MUSA-AZIZ, R.; BARRETO-CHAVES, M.L.; MELLO-AIRES, M. **Peritubular AVP regulates bicarbonate reabsorption in cortical distal tubule via V₁ and V₂ receptors.** *Am. J. Physiol.*, **282**:F256-F264, 2002.

OLIVEIRA-SOUZA M.; MELLO-AIRES M. **Effect of arginine vasopressin and ANP on intracellular pH and cytosolic free [Ca²⁺] regulation in MDCK cells.** *Kidney Int.* **60**:1800-1808, 2001.

OLIVEIRA-SOUZA M.; MUSA-AZIZ, R.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES M. **Arginine vasopressin stimulates H⁺ ATPase in MDCK cells via V1 (cell Ca²⁺) and V2 (cAMP) receptors.** *Am. J. Physiol.*, **260**:F402-F408, 2004.

PLANELLES, G.; ANAGNOSTOPOULOS, T.; CHEVAL, L.; DOUCET, A. **Biochemical and functional characterization of H⁺-K⁺-ATPase in distal amphibian nephron.** *Am. J. Physiol.*, **260**:F806-F812, 1991.

PRIME, G., EBNER, S.; MARIN-GREZ, M. **Reverse transcriptase-polymerase chain reaction study of anion exchanger-2 in canine tissues and different Madin Darby canine kidney cell types.** *Kidney Int.*, **54(Suppl. 67)**:S171-S173, 1998.

RABITO, C. A, TCHAO, R., VALENTICH, J. 1978. **Distribution and characteristics of the occluding junctions in a monolayer of a cell line (MDCK) derived from canine kidney.** *J. Membrane Biol.* **43**:351-365.

SABATINI, S. **Distribution and function of the renal ATPase (H⁺-ATPase).** *Sem. Nephrol.*, **11**:37-44, 1991.

SANTOS, P. M. C.; FREITAS, F. P.; MENDES, J.; TARARTHUCH, A. L.; FERNANDEZ, R. P. **Modulation of pronton ATPases activity in MDCK – C11 cells.** Trabalho apresentado no 41º Congress of the Brazilian Society of Physiology & Joint Meeting of The Physiological Society . Ribeirão Preto – SP, 2006.

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

SILVER, R. B.; BRETON, S.; BROWN, D. **Potassium depletion increases proton pump (H⁺-ATPase) activity in intercalated cells of cortical collecting duct.** *Am. J. Physiol.- Renal Physiol.* **279(1)**:F195-202, 2000.

STETSON, DL; WADE, JB; GIEBISCH, G. **Morphologic alterations in the rat medullary collecting duct following potassium depletion.** *Kidney Int.* **17**:45-56, 1980.

STONE, D.K.; CRIDER, B.P.; XIE, X. **Structural properties of vacuolar proton pumps.** *Kidney Int.*, **38**:649-53, 1990.

TARARTHUCH, A. L.; FERNANDEZ, R.; MALNIC, G. **Cl⁻ and regulation of pH by MDCK cells.** *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, **40**:687-696 2007.

TARARTHUCH, A. L.; FERNANDEZ, R.; RAMIREZ, M. A.; MALNIC, G. **Factors affecting ammonium uptake by C11clone of MDCK cells.** *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, **445(2)**, p. 194-201, 2002.

TASHIMA, Y.; KOHDA, Y; NONOGUCHI, H.; IKEBE, M.; MACHIDA, K.; STAR, R.A.; TOMITA, K. **Intranephron localization and regulation of the Vi1 vasopressin receptor during chronic metabolic acidosis and dehydration in rats.** *Pflugers Arch.*, **442(2)**:652-661, 2001.

TOMPKINS, L. S.; NULLMEYER, K. D.; MURPHY, S. M.; WEBER, C. S.; LYNCH, R. M. **Regulation of secretory granule pH in insulin-secreting cells.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**:C429-C437, 2002.

TSUGANEZAWA, H. e col. **A new member of the HCO₃⁻ transporter superfamily is an apical anion exchanger of β - Intercalated cells in the kidney.** *J. Biol. Chem.*, **276(11)**:8180-8189, 2001.

VIEIRA, L.; SLOTKI, I.; CABANTCHIK, Z. I. **Chloride conductive pathways which support electrogenic H⁺ pumping by Leishmania major promastigotes.** *J. Biol. Chemistry.* **270**:5299-5304, 1995.

WANG, T.; MALNIC, G.; GIEBISCH, G.; CHAN, Y.L. **Renal bicarbonate absorption in the rat. IV. Bicarbonate transport mechanisms in the early and late distal tubule.** *J. Clin. Invest.*, **91**:2776-2784, 1993.

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

WINGO, C. S.; CAIN, B. D. **The renal H⁺/K⁺-ATPase: physiological significance and role in potassium homeostasis.** *Annu. Rev. Physiol.*, **55**:323-47, 1993.

WINGO, C. S.; SMOLKA, A. J. **Function and structure of H⁺/K⁺-ATPase in the kidney.** *Am. J. Physiol.*, **269**:F1-F16, 1995.

ZIES, D.L.; WINGO, C.S.; CAIN, B.D. **Molecular regulation of the HK α 2 subunit of the H⁺K⁺-ATPases.** *J. Nephrol.*, **15**[Suppl. 5]: S54-S60, 2002.