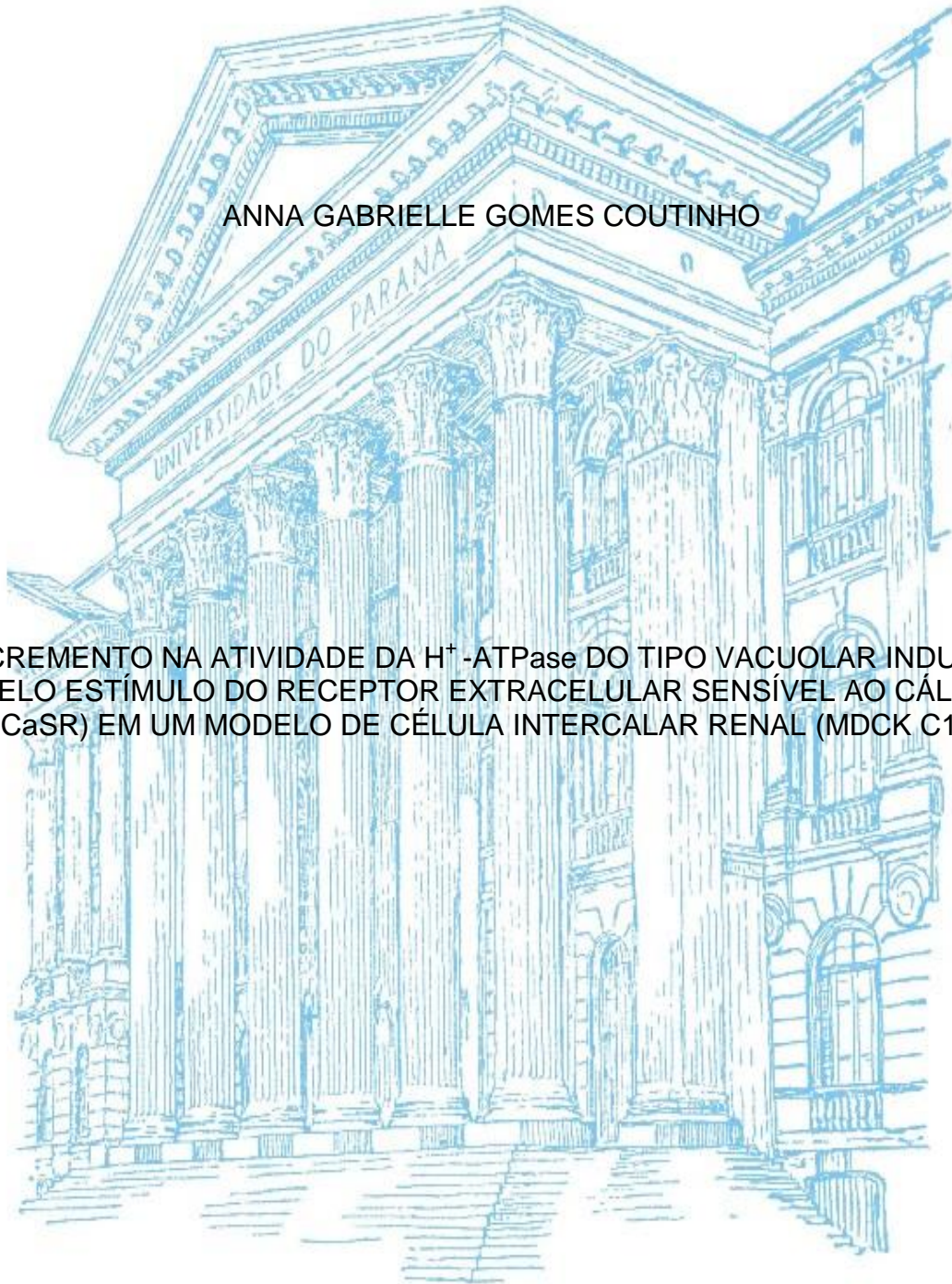


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO

INCREMENTO NA ATIVIDADE DA H^+ -ATPase DO TIPO VACUOLAR INDUZIDO
PELO ESTÍMULO DO RECEPTOR EXTRACELULAR SENSÍVEL AO CÁLCIO
(CaSR) EM UM MODELO DE CÉLULA INTERCALAR RENAL (MDCK C11).



CURITIBA
2017

ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO

Incremento na atividade da H⁺-ATPase do tipo vacuolar induzido pelo estímulo do receptor extracelular sensível ao cálcio (CaSR) em um modelo de célula intercalar renal (MDCK C11).

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Fisiologia, no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Ricardo Fernandez Perez

CURITIBA

2017



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



UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à APROVAÇÃO (aprovação/reprovação) da acadêmica.

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, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 27 de outubro de 2017.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
Aprovada	Profa. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral PUC-PR - Membro Titular	
Aprovada	Profa. Dra. Andréa Emília Marques Stinghen UFPR - Membro Titular	
APROVADA	Dr. Carlos Alberto Mayoria Aita SBPC/ML - Membro Titular	
APROVADA	Profa. Dr. Rafael Luiz Pereira UFPR - Membro Titular	
APROVADA	Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez UFPR - Membro Titular	

Dedico este trabalho a minha mãe, Cristiane Gomes Coutinho, pois foi ela quem sempre me estimulou a estudar e a seguir na vida acadêmica, não medindo esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Ricardo Fernandez Perez, por todos os ensinamentos e pela paciência.

Aos demais professores do Departamento de Fisiologia, que muito contribuíram para o meu aprendizado.

Aos colegas de laboratório e do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, pela ajuda e companhia.

À família e amigos pelo incentivo e preocupação nos momentos difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

À CAPES pelo auxílio financeiro prestado.

RESUMO

Alguns estudos já demonstraram que o estímulo do Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular, o CaSR, é capaz de a secreção de prótons no néfron proximal e distal. Tendo em vista que a acidificação do fluido tubular no ducto coletor é fundamental para evitar a formação de cálculos, o objetivo deste trabalho foi investigar a interação do CaSR com o transporte de prótons num modelo de células intercalares do ducto coletor de mamíferos, as células MDCK C11 (*Madin-Darby canine kidney cell*). As células MDCK C11 foram cultivadas em meio MEM (*Minimum Essential Medium*) e suplementadas com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal). A atividade bioquímica da H^+ -ATPase_v, sensível a concanamicina 10^{-8} M, foi determinada por um método colorimétrico modificado do descrito por Fisk-Subarow. Alterações do cálcio intracelular foram determinadas por microscopia de fluorescência, utilizando-se o marcador FLUO-4 $10 \mu\text{M}$. O agonista não específico de CaSR, gadolínio $300 \mu\text{M}$, e o agonista específico de CaSR, R-568 $0,5$ e $1 \mu\text{M}$, incrementaram de forma significativa a atividade da H^+ -ATPase_v em relação à atividade basal da bomba. O agonista não específico de CaSR, neomicina $200 \mu\text{M}$, incrementou a atividade da H^+ -ATPase_v, de forma não significativa. Foi observado que o incremento do íon cálcio no meio extracelular estimulou a atividade da H^+ -ATPase_v de forma dose-dependente. O antagonista seletivo de CaSR, NPS 2143 150 nM , impediu o aumento da atividade da bomba promovido pelo Ca^{2+} 1 mM . O inibidor das fosfolipases A e C, U-73122 5×10^{-8} M, reverteu parcialmente o incremento na atividade da bomba observado na presença de gadolínio $300 \mu\text{M}$. O ativador de proteína quinase C aumentou a atividade da H^+ -ATPase_v em relação à basal, mas não de forma significativa. O agonista específico de CaSR, R-568 $1 \mu\text{M}$, promoveu um aumento significativo do cálcio intracelular nas células MDCK C11, o qual persistiu mesmo com a depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} com tapsigargina $0,1 \mu\text{M}$. Entretanto, na ausência de cálcio extracelular este aumento não foi observado, o que indica que o aumento do Ca^{2+} intracelular induzido pela ativação do CaSR é dependente da entrada de Ca^{2+} do meio extracelular. Destes resultados é possível concluir que o estímulo do CaSR num modelo de célula intercalar renal provoca um incremento na concentração intracelular de cálcio e na atividade bioquímica da H^+ -ATPase_v, sugerindo uma possível interação entre o metabolismo de cálcio e os mecanismos de secreção de prótons nos túbulos renais.

Palavras-chave: H^+ -ATPase vacuolar; CaSR; células MDCK C11.

ABSTRACT

Some studies have already shown that the stimulus of a Calcium-Sensing Receptor, CaSR, is able to increase protons secretions in proximal and distal nephron. Considering that fluid acidification in collecting duct is fundamental to avoid stone formation, the aim of this study was to investigate the interaction of CaSR with proton transport in a mammalian intercalated cell model, C11-MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) cells. C11-MDCK cells were cultured in MEM (Minimum Essential Medium) and supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum). The concanamycin-sensitive activity of the H^+ -ATPase_v was determined by a colorimetric method modified of that described by Fisk-Subarow. Changes in intracellular calcium levels were determined by fluorescence microscopy using 10 μ M FLUO-4 dye. The non-specific CaSR agonist, gadolinium 300 μ M, and the specific CaSR agonist, 0,5 and 1 μ M R-568, increased significantly the activity of H^+ -ATPase_v in relation to the basal activity of the pump. The non-specific CaSR agonist, 200 μ M neomycin, increased the activity of H^+ -ATPase_v but not significantly. It was observed that the increase of extracellular calcium stimulated the activity of H^+ -ATPase_v in a dose-dependent manner. The selective CaSR antagonist, 150 nM NPS 2143, prevented the increase of pump activity promoted by 1 mM Ca^{2+} . The phospholipase A and C inhibitor, 5×10^{-8} M U-73122, partially reversed the increase in pump activity observed in the presence of 300 μ M gadolinium. Protein kinase C activator increased the activity of H^+ -ATPase_v relative to baseline, but not significantly. The specific CaSR agonist, R-568 1 μ M, promoted a significant increase of intracellular calcium in C11-MDCK cells, which persisted even with the depletion of intracellular Ca^{2+} stores with 0,1 μ M thapsigargin. However, in the absence of extracellular calcium this increase was not observed, which indicates that the increase of intracellular Ca^{2+} induced by CaSR activation is dependent on the input of Ca^{2+} from the extracellular medium Ca^{2+} . From these results it can be concluded that the CaSR stimulus on a model of intercalated cells increase intracellular calcium concentration and biochemical activity of H^+ -ATPase_v, suggesting a possible interaction between calcium metabolism and the mechanisms of proton secretion in renal tubules.

Keywords: vacuolar H^+ -ATPase; CaSR; C11-MDCK cells.

LISTA DE FIGURAS

Fig 1: A $[Ca^{2+}]_o$ regula a secreção de PTH por estimulação de CaSR	15
Fig 2: O Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular.....	16
Fig 3: Vias de sinalização envolvidas com o CaSR.....	19
Fig 4: Alguns tecidos em que o CaSR foi identificado e suas funções.....	21
Fig 5: O balanço de cálcio no organismo	24
Fig 6: Funções do CaSR ao longo do néfron	27
Fig 7: Células MDCK C11	31
Fig 8: Obtenção do homogeneizado celular.....	33
Fig 9: Adição da solução MRC aos tubos de ensaio	33
Fig 10: Determinação da atividade da H^+ -ATPase _v	35
Fig 11: Curva dose-resposta da atividade da H^+ -ATPase _v	39
Fig 12: Atividade da H^+ -ATPase _v com neomicina e Gd^{3+}	40
Fig 13: Modificação da atividade da H^+ -ATPase _v com R-568.....	41
Fig 14: Atividade da H^+ -ATPase _v na presença de NPS 2143.....	41
Fig 15: Atividade da H^+ -ATPase _v com PMA e U-73122	42
Fig 16: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de Gd^{3+}	43
Fig 17: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de R-568	44
Fig 18: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de R-568 após tapsigargina	45
Fig 19: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de R-568 com EGTA.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização do CaSR ao longo do néfron	25
Tabela 2: Protocolo Agonistas de CaSR	35
Tabela 3: Protocolo Antagonista de CaSR	36
Tabela 4: Protocolo $[Ca^{2+}]_i$	36
Tabela 5: Protocolo PMA e U-73122	37
Tabela 6: Aumento da atividade da H^+ -ATPase _v em %	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca^{2+}_o - cálcio extracelular

Ca^{2+}_i - cálcio intracelular

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ - concentração de cálcio intracelular

$[\text{Ca}^{2+}]_o$ - concentração de cálcio extracelular

CaSR – Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

PLA – fosfolipase A_2

PLC – fosfolipase C

PTH – paratormônio ou hormônio da paratireoide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A IMPORTÂNCIA DO ÍON CÁLCIO NO ORGANISMO	12
1.2. O RECEPTOR SENSÍVEL AO CÁLCIO EXTRACELULAR	15
1.2.1. A estrutura molecular e a via de ativação do CaSR	15
1.2.2. Distribuição e funções do CaSR em diferentes tecidos	20
1.2.3. O papel do CaSR nos rins	24
1.3. CÉLULAS MDCK C11	28
1.4. JUSTIFICATIVA	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. CULTIVO DAS CÉLULAS MDCK C11	31
3.2. ESTUDOS BIOQUÍMICOS DA ATIVIDADE DA H ⁺ -ATPASE _v	32
3.2.1. Obtenção do homogeneizado celular	32
3.2.2. Determinação da Atividade da H ⁺ -ATPase _v	33
3.3. MENSURAÇÃO DO CA ²⁺ _i	37
3.4. REAGENTES	38
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4. RESULTADOS	39
4.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA H ⁺ -ATPASE _v	39
4.2. MENSURAÇÃO DO CA ²⁺ _i	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. A IMPORTÂNCIA DO ÍON CÁLCIO NO ORGANISMO

O papel do íon cálcio na regulação de mecanismos fisiológicos teve destaque a partir do século XIX, quando Sydney Ringer desenvolveu estudos sobre a função do íon na contração do coração. Ringer demonstrou que uma solução contendo não apenas sódio e potássio, mas também cálcio, em determinadas concentrações, permitia que um coração fora do organismo mantivesse seus batimentos por algumas horas. Com os estudos de Ringer foi possível perceber que o cálcio atua como um importante sinalizador celular. Hoje, sabe-se que o cálcio extracelular (Ca^{2+}_o) é essencial para o funcionamento do coração não somente por promover o encurtamento dos sarcômeros, mas bem como pelo seu envolvimento na atividade elétrica cardíaca (RINGER, 1883; MILLER, 2004).

O íon cálcio tem muitas funções na manutenção dos sistemas biológicos: contração de todos os tipos musculares (GANITKEVICH, et al. 2002.; GORDON et al. 2000).; importante segundo mensageiro intracelular (BERRIDGE, 2001); cofator alostérico em várias reações enzimáticas (SITARAMAYYA, 2002); transdução neural (SVOBODA, 1997); coagulação sanguínea (GANITKEVICH, et al. 2002); e essencial para a composição da matriz óssea, cartilagem e dentes (WUTHIER, 1993; BOSKEY, 1992).

Em um humano adulto, cerca de 1 a 2 Kg de seu peso corporal é composto por cálcio, sendo que cerca de 99% encontra-se nos ossos. Em relação ao cálcio que se encontra no plasma, 40% está ligado a proteínas, 10% forma complexos com diferentes ânions como o fosfato e os 50% restantes estão na forma livre ionizada. Contudo, para que o papel que exerce em diferentes tecidos seja mantido, a pequena porcentagem de cálcio livre no plasma é constantemente monitorada, devendo manter-se próxima a 1 mM (UN SIL JEON, 2008). As concentrações de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) e extracelular ($[Ca^{2+}]_o$) devem ser distintas, sendo bem inferior no meio intracelular (10 - 100 nM) em relação ao extracelular. A maior parte do cálcio intracelular (Ca^{2+}_i) encontra-se armazenado no interior das organelas, mas variações na $[Ca^{2+}]_i$ podem ocorrer, estando

normalmente relacionadas a importantes vias de sinalização e respostas intracelulares, como a contração, a excitação, a apoptose e a proliferação celular (DÍAZ-SOTO et al., 2016).

O gradiente eletroquímico do cálcio favorece sua entrada na célula. A diferença de concentração do íon entre os dois lados de uma membrana celular mantém-se de duas formas: pela ação de algumas proteínas transportadoras de membrana e via controle hormonal (DÍAZ-SOTO et al., 2016).

As bombas de cálcio (Ca^{2+} -ATPases) transportam o íon, com gasto de energia, para fora da célula ou para dentro do retículo endoplasmático. Da mesma forma, outras proteínas de membrana são responsáveis por manter uma baixa concentração de cálcio no citosol, como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que transporta o sódio para o interior da célula e o cálcio para fora da célula; e o uniportador de cálcio que transporta o íon para o interior das mitocôndrias (DÍAZ-SOTO et al., 2016).

Os hormônios responsáveis por controlar a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ são o hormônio da paratireoide ou paratormônio (PTH); a calcitonina e a forma ativa da vitamina D, 1,25 – desidroxivitamina D_3 [$1,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$]. A calcitonina, liberada pelas células C da tireoide, é secretada frente a um aumento do cálcio plasmático, no entanto tem uma importância maior em vertebrados menos complexos. O PTH é o principal hormônio responsável pela manutenção ideal de cálcio plasmático em humanos (BERNE e LEVY, 2009).

A concentração de PTH no sangue é inversamente proporcional a do íon cálcio, sendo que o estímulo para liberação do hormônio ocorre quando o cálcio plasmático encontra-se abaixo de 1.1 mmol/l. Muitos estudos mostraram que a glândula paratireoide possui um “sensor de cálcio” que suprime a secreção de PTH em resposta a elevadas concentrações de cálcio. Com a remoção cirúrgica das glândulas paratireoides induz-se um quadro de hipocalcemia, tanto em humanos como em animais experimentais. Além disso, perturbações da concentração plasmática de cálcio ionizado *in vivo* por infusões intravenosas de sais de cálcio para induzir hipercalcemia, promovem queda da concentração sérica de PTH, enquanto quelantes de cálcio indutores de hipocalcemia, tais como citrato ou EGTA, provocam elevação da concentração sérica de PTH (CONIGRAVE, 2016).

O responsável por controlar a liberação do PTH é o Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular (CaSR) localizado nas glândulas paratireoides, o qual é sensível a pequenas variações de cálcio extracelular. A ativação do CaSR, pelo aumento do cálcio além de 1.2mM, resulta na ativação de fosfolipase C (PLC), o que previne a liberação do paratormônio (RICCARDI e VALENTI, 2016). Mutações no gene que codifica o CaSR, localizado no braço longo do cromossomo 3 em humanos, leva a distúrbios no metabolismo do cálcio. Mais de 200 mutações do CaSR já foram identificadas. Na patologia conhecida como Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (HFF), uma doença autossômica dominante, a disfunção do CaSR pode levar ao aumento da concentração plasmática de PTH, a qual não é suprimida pela hipercalcemia (HENDY et al., 2009; HENDY e CANAFF, 2016; WU et al., 2017).

Conforme apresentado na figura 1, a homeostase do Ca^{2+}_o é mantida pela influência do PTH no transporte do íon, em diferentes locais do organismo: no intestino delgado, onde a absorção do cálcio para a corrente sanguínea é modulada; no tecido ósseo, onde pode ocorrer tanto a reabsorção quanto deposição de Ca^{2+} ; e nos rins, onde a reabsorção tubular de cálcio do filtrado é controlada de acordo com as necessidades do organismo em reter ou eliminar o íon (RICCARDI e VALENTI, 2016).

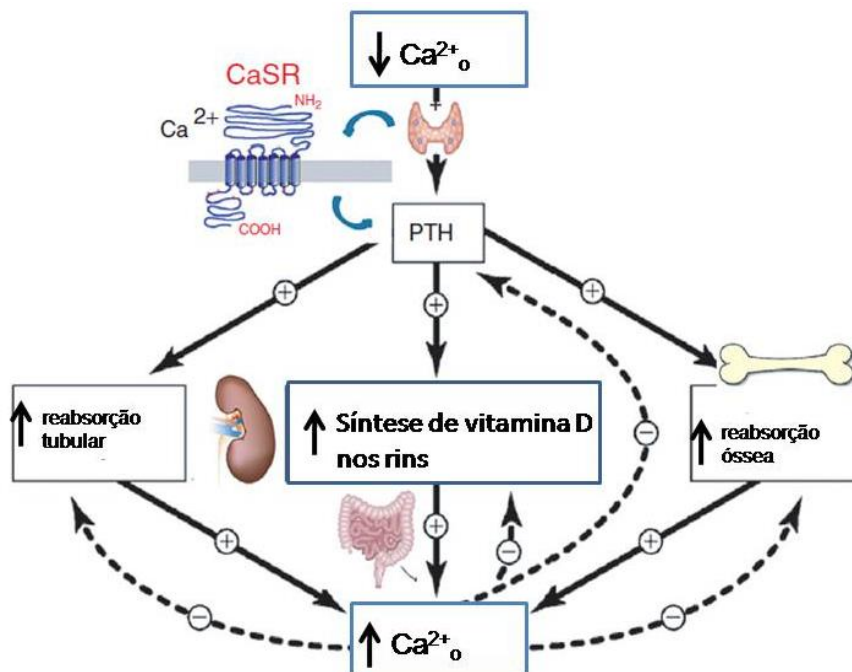


Figura 1: A homeostase do cálcio extracelular (Ca^{2+}_o). Quando a concentração de cálcio no plasma cai abaixo de 1.1mmol/l a atividade do Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular (CaSR) diminui, fazendo com que as glândulas paratireoides secretem o paratormônio (PTH). Este hormônio aumenta a reabsorção tubular de cálcio nos rins e aumenta a reabsorção de matriz óssea. O aumento de absorção de cálcio no intestino é intermediado pela vitamina D, a qual é convertida nos rins para sua forma ativa $[1,25 (OH)_2 D_3]$ sob ação do PTH. Estes efeitos juntos restauram a concentração ideal plasmática de cálcio, o que torna a ativar o CaSR com consequente inibição da liberação de PTH. Fonte: modificada a partir de DÍAZ-SOTO et al., 2016.

1.2) O RECEPTOR SENSÍVEL AO CÁLCIO EXTRACELULAR (CaSR)

1.2.1) A estrutura molecular e a via de ativação do CaSR.

O Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular (CaSR) pertence à família C da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), assim como os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), receptores gustativos (T1R1-3), receptores de feromônios (V2R) e receptores de aminoácidos básicos (GPCR6A). Os membros da família GPCR caracterizam-se por possuírem sete domínios transmembrana e uma grande porção aminoterminal (RICCARDI et al., 2009).

A sequência de aminoácidos (AAs) do CaSR em humanos forma uma cadeia polipeptídica de 1078 resíduos, divididos claramente em três regiões

(figura 2): domínio extracelular, o maior, com 612 aminoácidos, cuja porção amino-terminal apresenta sítios de glicosilação onde o Ca^{2+} e os demais agonistas do CaSR se ligam; domínio transmembrana, com 250 AAs, formando 7 α -hélices hidrofóbicas que ficam presas à membrana plasmática; e domínio citosólico, com uma cauda carboxi-terminal de aproximadamente 250 AAs. Este domínio contém seqüências de AAs que podem desencadear cascatas de sinalização intracelulares via fosforilação (RODRIGUEZ, NEMETH e MARTIN, 2004; DÍAZ-SOTO et al., 2016). O CaSR apresenta-se na membrana plasmática como um dímero, o que acredita-se ser fundamental para a ativação normal do receptor (BAI et al., 1999).

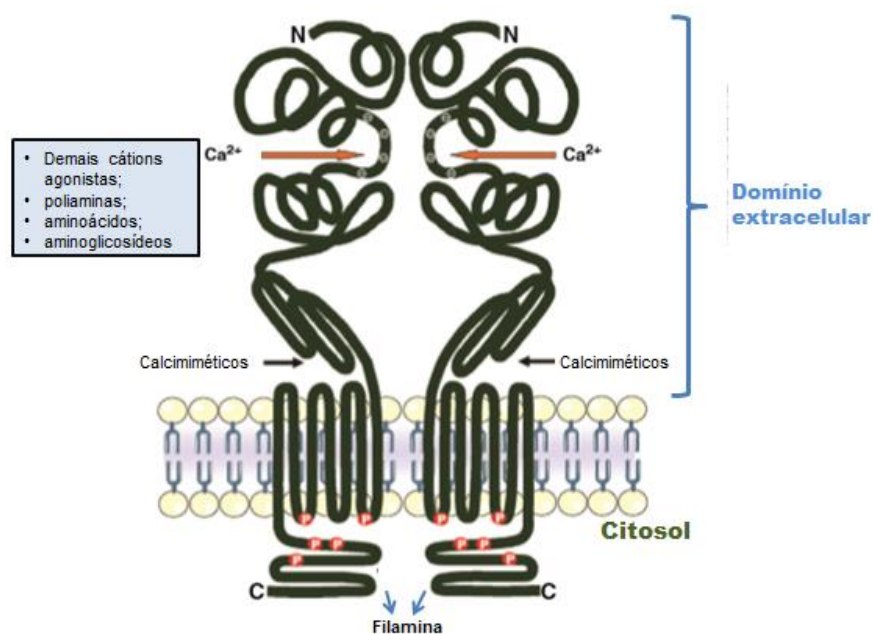


Figura 2: O Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular é formado por três domínios: extracelular, transmembrana e citosólico. N: porção amino-terminal no domínio extracelular. C: porção carboxi-terminal no domínio citosólico. P: regiões de fosforilação no domínio citosólico. As flechas vermelhas indicam o local no domínio extracelular onde o Ca^{2+} e outros agonistas do receptor se ligam. As flechas pretas indicam o local no domínio extracelular onde se ligam os fármacos calcimiméticos. As flechas azuis indicam o sítio de ligação da proteína filamina A. Fonte: modificada a partir de DÍAZ-SOTO et al., 2016.

O nome Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular surgiu pela capacidade do receptor de detectar mudanças na $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Entretanto, O CaSR responde a outros cátions divalentes e também trivalentes; a aminoácidos; a poliaminas; a alguns antimicrobianos aminoglicosídeos; a variações no pH e na concentração

iônica; e a calcimiméticos e calciolíticos (CHANG e SHOBACK, 2004). Os cátions que mimetizam a ação do cálcio na ativação do CaSR podem ser classificados como agonistas de diferentes intensidades. Gadolínio (Gd^{3+}) e lantânio (La^{3+}) são considerados fortes agonistas. Cálcio (Ca^{2+}), bário (Ba^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}) e chumbo (Pb^{2+}) são agonistas de média intensidade. Magnésio (Mg^{2+}), gálio (Ga^{3+}) e ferro (Fe^{3+}) são agonistas considerados fracos. A potência com que o cátion ativa o receptor pode estar relacionada à sua carga elétrica e raio. Os cátions com raio menor que 0,66Å são normalmente menos efetivos em ativar o CaSR, independentemente de sua carga. Já a força com que os cátions maiores de 0,84Å ativam o receptor aumenta com cargas elétricas maiores. Da mesma forma, a habilidade das poliaminas de ativar o CaSR depende do número de sua carga: espermina > espermidina > putrescina. As poliaminas parecem modular a atividade do CaSR de maneira fisiológica no encéfalo (CHANG e SHOBACK, 2004).

Os L-aminoácidos são capazes de regular a atividade do CaSR principalmente por potencializar a habilidade do Ca^{2+} e de outros agonistas em ativar o receptor. Tal fato tem maior importância no estômago e no intestino delgado, onde os aminoácidos liberados a partir da digestão dos alimentos podem modular a atividade do CaSR nas células epiteliais. Os aminoácidos regulam a atividade do CaSR com diferentes potências: aromáticos > neutros > ácidos > básicos > cadeia ramificada. Mudanças no pH também afetam a habilidade dos agonistas de CaSR em ativar o receptor, de forma que o pH alcalino potencializa o efeitos dos agonistas e o pH ácido diminui (CHANG e SHOBACK, 2004).

Antimicrobianos aminoglicosídeos como a gentamicina, neomicina, tobramicina e canamicina são capazes de ativar o CaSR em células renais, apresentando eficiência na ativação do receptor proporcionalmente a quantidade de grupos amino que possui (neomicina > gentamicina > tobramicina > canamicina). Foi demonstrado que quanto maior a capacidade de ativação do CaSR pelo antimicrobiano, maior é a nefrotoxicidade desenvolvida (MCLARNON et al., 2002). Alguns estudos associaram a ativação do CaSR por aminoglicosídeos à apoptose de células renais. Contudo, mais estudos são necessários para entender o exato envolvimento do CaSR no processo de morte celular, já que diversos outros tecidos que expressam o receptor não apresentam

apoptose significativa quando expostos a aminoglicosídeos como a gentamicina (QUIROS et al., 2011).

Os calcimiméticos, como o cinacalcet, são reguladores farmacológicos que ativam o CaSR e são muito utilizados para tratamento de patologias relacionadas à deficiência na expressão ou funcionamento do receptor. O cinacalcet tem obtido sucesso no tratamento do hiperparatireoidismo secundário à falência renal. Os calcimiméticos ligam-se ao CaSR em uma região diferente em que se ligam o Ca^{2+} e os demais agonistas (figura 2) (DÍAZ-SOTO et al., 2016). Já os calciolíticos são antagonistas de CaSR e dificultam a ativação do receptor pelo Ca^{2+}_o , deslocando a curva dose-resposta para a direita. Dessa forma, uma concentração muito maior de cálcio é necessária para ativar o CaSR. Os calciolíticos podem ser utilizados para tratar patologias que envolvem a hiperativação do CaSR (RICCARDI et al., 2009, RICCARDI e VALENTI, 2016).

Os cátions inorgânicos, as poliaminas, os aminoglicosídeos e alguns aminoácidos como a L-lisina e a protamina são os verdadeiros agonistas de CaSR (chamados moduladores ortostéricos ou do tipo I), pois são capazes de ativar o receptor mesmo na ausência de Ca^{2+}_o . Já os moduladores denominados alostéricos, ou do tipo II, são aqueles que necessitam da presença de Ca^{2+}_o para estimular o CaSR, o que inclui os aminoácidos aromáticos, os calcimiméticos, a concentração iônica e o pH. Os calciolíticos são considerados moduladores alostéricos negativos (RICCARDI et al., 2009).

Quando o Ca^{2+}_o e os demais agonistas de CaSR ligam-se ao domínio extracelular do receptor, o CaSR pode interagir com diferentes proteínas G heterotriméricas: $G_{q/11}$, $G_{12/13}$, $G_{i/o}$ e G_s , iniciando diferentes cascatas de sinalização intracelular (figura 3) (KIFOR et al., 1997; CHANG et al., 1998; ZHANG et al., 2016).

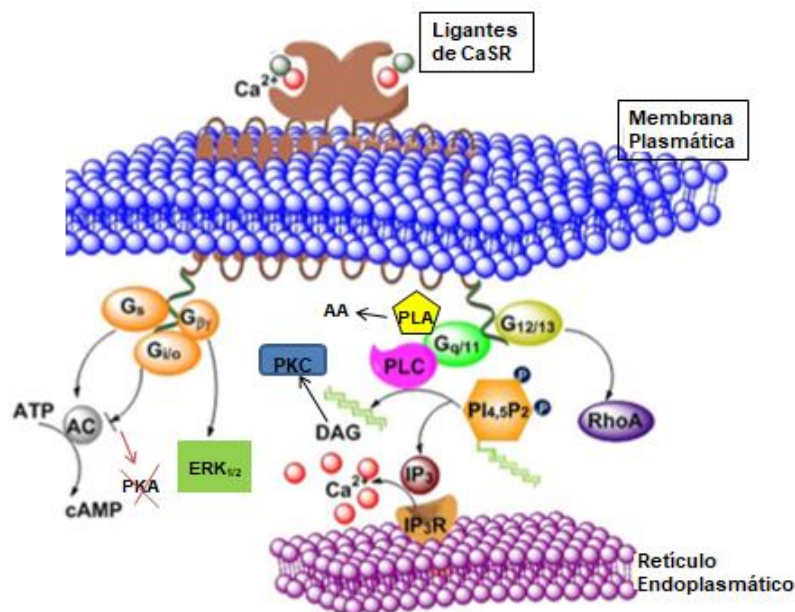


Figura 3: Visão esquemática das vias de sinalização intracelulares envolvidas com o CaSR. A ligação dos agonistas de CaSR pode ativar as proteínas $G_{i/o}$, G_s , $G_{q/11}$, e $G_{12/13}$. Fonte: modificada a partir de ZHANG et al., 2016.

A interação entre CaSR e a proteína $G_{q/11}$ ativa a PLC que ativa inositol 1,4,5 tri-fosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 promove a liberação dos estoques intracelulares de cálcio, promovendo um aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Este parece ser um dos principais mecanismos através dos quais o CaSR exerce suas funções biológicas. O DAG ativa uma PKC dependente de Ca^{2+} , o que altera a atividade biológica da célula. Outra consequência da ativação de $G_{q/11}$ é o estímulo da fosfolipase A_2 citosólica (PLA), que resulta na produção de ácido araquidônico (AA) e seus metabólitos (RICCARDI et al., 2009; DÍAZ-SOTO et al., 2016). O domínio citosólico do CaSR possui um grande número de sequências consenso de fosforilação para proteína quinase C (PKC) e para proteína quinase A (PKA). Nesta região também é formado um complexo de sinalização entre o CaSR e a proteína filamina A (figura 2), o qual é necessário para a ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (DÍAZ-SOTO et al., 2016).

A ativação da proteína $G_{i/o}$ reduz a concentração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico) via inibição da adenilciclase (AC), o que acaba inibindo a atividade da PKA. Por outro lado, a interação entre CaSR e $G_{i/o}$ ativa as proteínas quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular ($ERK_{1/2}$) e a c-jun n-terminal quinase (JNK). Através da ativação da proteína $G_{12/13}$, o CaSR promove

migração celular via proteínas RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) ou induz diferenciação celular.

Portanto, as principais alterações celulares determinadas pela ativação do CaSR são o aumento da $[Ca^{2+}]_i$; regulação da concentração intracelular de AMP cíclico; e regulação da atividade de várias proteínas quinases e fatores de transcrição (ELLINGER, 2016).

1.2.2) Distribuição e funções do CaSR em diferentes tecidos.

O CaSR não é expresso somente em humanos, mas em diferentes vertebrados: bovinos, roedores, cães, gatos, frangos, salamandras e peixes (MAGNO, WARD e RATAJCZAK, 2011). O CaSR encontrado nas diferentes espécies apresenta grande conservação da sua cadeia de aminoácidos (até 93% de similaridade estrutural), o que demonstra a grande importância deste receptor para diversos organismos (THAKKER, 1998).

O CaSR foi primeiramente clonado e caracterizado na paratireoide, por Brown e seu grupo em 1993 (GRACA et al., 2016). Thakker (1998), utilizando esta mesma técnica, extraiu o mRNA de CaSR das glândulas paratireoides de bovinos e o inoculou em oócitos de rã *Xenopus laevis*, fazendo com que estes expressassem o CaSR com as mesmas características das glândulas bovinas.

Atualmente, o CaSR já foi identificado em vários outros tecidos além da paratireoide (figura 4): adiposo, cardíaco, nervoso, gastrointestinal, pâncreas, pele, renal, ósseo, pulmonar, placenta e vasos sanguíneos. (GRACA, 2016; ELLINGER, 2016). A ativação do CaSR em mamíferos tem diferentes consequências nos tecidos em que já foi encontrado, sendo que em muitos o receptor a princípio não está relacionado ao metabolismo do cálcio.

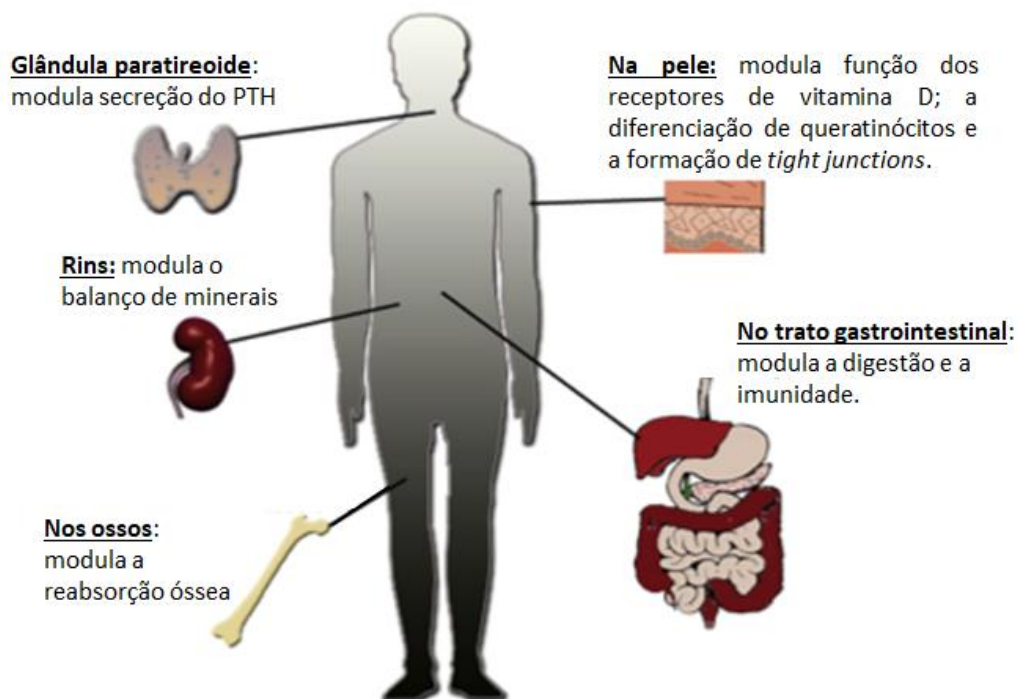


Figura 4: Alguns dos tecidos em que o CaSR já foi identificado e suas funções. Fonte: modificada a partir de ALKUKHUN et al., 2017.

Nas células do intestino, o CaSR medeia a secreção de colecistocinina em resposta a aminoácidos aromáticos (LIOU et al., 2011), inibe a secreção de cloreto e estimula a reabsorção de sódio. Além disso, o receptor tem um papel importante em evitar a passagem de patógenos pela barreira intestinal, evitando com isso a inflamação (OWEN et al., 2016). O CaSR também é capaz de influenciar a atividade das células β no pâncreas, incluindo o aumento da adesão e da comunicação entre essas células (SQUIRES et al, 2014).

Tem sido demonstrado que na pele o CaSR parece regular a função dos receptores de vitamina D, pois modelos animais com deficiência na expressão do receptor de cálcio possuem baixa expressão de receptores de vitamina D. O receptor também regula a diferenciação de queratinócitos e a formação de *tight junctions* na pele (ALKUKHUN et al., 2017; JOURET et al., 2013)

Nos ossos, a deficiência na expressão do CaSR diminui significativamente a diferenciação dos osteoblastos, prejudicando o desenvolvimento ósseo e levando a disfunções do tecido (CHANG et al., 2008). O CaSR tem um papel fundamental no crescimento fetal, mantendo uma concentração plasmática de

cálcio no feto maior do que em adultos, mesmo que haja deficiência do íon na mãe. Isto favorece não só o desenvolvimento dos ossos e cartilagens, mas de outros tecidos como o sistema nervoso, rins e pulmões. (GILBERT, LECLERC e MOREAU, 2011; RICCARDI, BRENNAN e CHANG, 2013). O CaSR já foi identificado na placenta de alguns mamíferos, sendo apontado como o responsável pela disponibilização do cálcio da circulação materna para o feto (ELLINGER, 2016).

No coração, o CaSR está envolvido no infarto agudo do miocárdio, na progressão da cardiomiopatia diabética, na apoptose de cardiomiócitos induzida por ciclosporina e, pelo menos em parte, na injúria do miocárdio promovida pelos lipopolissacarídeos (WANG et al., 2013). O CaSR está presente nas artérias de humanos e, quando expresso em uma concentração fisiológica, evita a progressão da calcificação vascular (MOLOSTVOV et al., 2015).

Em células nervosas, a superexpressão do CaSR é capaz de induzir morte e degeneração neuronal, sendo um possível alvo na neuroproteção isquêmica (KIM et al., 2014). Todavia, na transmissão sináptica, o CaSR tem um papel homeostático importante. Quando ativado pelo aumento do cálcio na fenda sináptica, o CaSR diminui a liberação de neurotransmissores em momentos de grande atividade neuronal, evitando uma toxicidade por excesso de neurotransmissor; e, quando a concentração de cálcio na fenda sináptica está baixa, a menor ativação do CaSR permite o aumento da liberação de neurotransmissores, mesmo com a queda de cálcio extracelular (PHILLIPS et al., 2008). Em alguns casos, a ativação do CaSR na célula pré-sináptica pode ser prejudicial, como com a utilização de fármacos aminoglicosídeos. Estes antimicrobianos, conhecidos agonistas de CaSR, diminuem a liberação de acetilcolina na placa motora, o que causa fraqueza muscular (HARNETT, CHEN e SMITH, 2009). Além do mais, o CaSR tem uma possível importante participação na regulação do crescimento de células do sistema nervoso (VIZARD et al., 2008).

Alguns estudos já mostraram que há expressão do CaSR nos bronquíolos de humanos, a qual aumenta durante a asma e agrava o quadro inflamatório. Os antagonistas de CaSR são capazes de impedir a hipersensibilidade e a inflamação desenvolvida durante a asma, representando um novo possível

tratamento da patologia (YAROVA et al., 2015). Outra doença pulmonar possível de ser tratada com antagonista de CaSR, mais especificamente o NPS 2143, é a lesão pulmonar aguda (LPA). A inibição do CaSR previne a infiltração de células inflamatórias na indução de LPA por lipopolissacarídeos (LEE et al., 2017).

Nos últimos anos, em busca da solução da epidemia da obesidade, tem-se dado muita atenção à biologia dos adipócitos, os quais, se descobriu, expressam o CaSR em humanos. Acredita-se que este receptor pode estar envolvido na disfunção do tecido adiposo, favorecendo a obesidade (BRAVO-SAGUA et al., 2016).

Desta forma, pode-se afirmar que o CaSR atua de modo específico em cada tipo celular. Esta especificidade é facilmente notada pelo envolvimento contraditório do CaSR na evolução do câncer. No tecido mamário e na próstata, o CaSR facilita a oncogênese; enquanto que na paratireoide e no cólon, o receptor suprime a propagação de células tumorais (ELLINGER, 2016).

1.2.3. O papel do CaSR nos rins.

O fluxo de cálcio no organismo obedece ao equilíbrio entrada-saída do íon (figura 5). Apesar de o trato gastrointestinal ser o principal responsável por regular o balanço de cálcio, os rins têm uma relevante participação neste processo (EATON e POOLER, 2016).

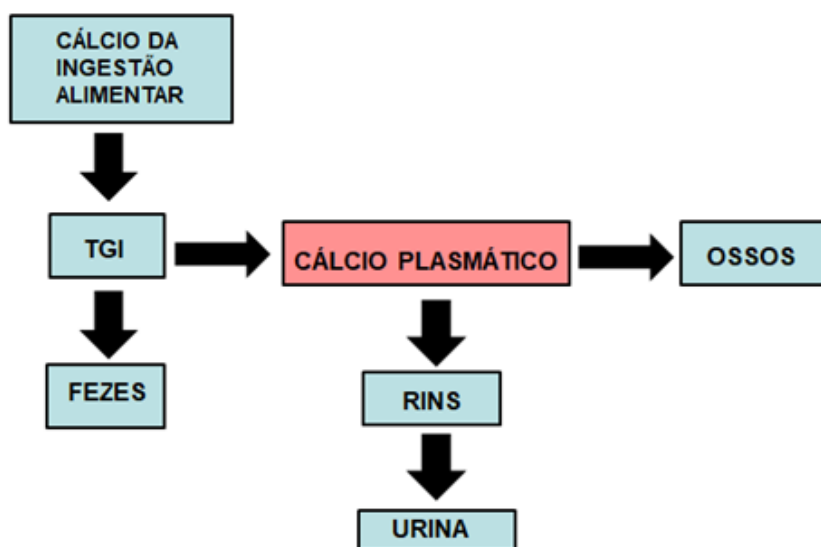


Figura 5: O balanço de cálcio no organismo. A concentração plasmática de cálcio é resultado do que é absorvido do íon pelo trato gastrointestinal, menos o cálcio armazenado nos ossos, menos o cálcio que é excretado nas fezes e na urina. Fonte: a autora.

Através da reabsorção tubular e da excreção do excesso do cálcio, os rins auxiliam na homeostase do íon, mantendo o Ca^{2+} em torno de 1mM (EATON e POOLER, 2016; CHANG e SHOBACK, 2004). Para tanto, os rins precisam ser sensíveis a pequenas variações de Ca^{2+} e, de fato, o CaSR já foi encontrado ao longo de todo o néfron, desde o glomérulo até o ducto coletor. Apesar disso, a presença do CaSR em alguns segmentos continua a ser questionada, o que teria relação com o método utilizado para detectar a expressão do receptor (GRACA, 2016).

O CaSR já foi encontrado no glomérulo, porém com baixa expressão, em células mesangiais e nos podócitos. A presença e a função do CaSR no glomérulo é controversa, mas alguns estudos mostraram que a ativação do

receptor por calcimiméticos previne a progressão de danos glomerulares induzidos pelo antimicrobiano puromicina (OH et al., 2011).

Ao longo da região tubular do néfron, o CaSR apresenta-se com diferentes polaridades (Tabela 1), sendo que a localização na membrana relaciona-se diretamente com a função do receptor naquele segmento.

Região do néfron	Localização do CaSR
Túbulo Proximal	Membrana apical
Ramo Espesso da Alça de Henle	Membrana basolateral
Túbulo Distal	Membrana apical e basolateral
Ducto Coletor	Membrana apical

Tabela 1: Localização do CaSR na membrana ao longo do néfron. Fonte: a autora.

Cerca de 60% do cálcio é reabsorvido já nas células do túbulo proximal e a ativação do CaSR promove a reabsorção de cálcio e de fosfato (Pi) (Figura 6 - A). O receptor inibe a atividade do PTH, o qual além de ser um hormônio calciotrópico, é fundamental para o metabolismo do fosfato. O PTH promove fosfatúria ao inibir o contra transportador Na^+/H^+ e o co-transportador Na^+/Pi . Dessa forma, a ativação do CaSR permite que esses receptores voltem a reabsorver Na^+ e Pi. O acúmulo de Na^+ no interstício do túbulo proximal faz com que a osmolaridade aumente nesta região, levando à reabsorção de água e solutos (incluindo o Ca^{2+}) via paracelular. Além do mais, o CaSR ativa diretamente o trocador Na^+/H^+ (CAPASSO et al., 2013).

O ramo espesso da alça de Henle é responsável por reabsorver cerca de 25% do cálcio filtrado. Nesta região do néfron, a reabsorção de cálcio é dependente da reabsorção de NaCl (Figura 6 - B). Via aumento da atividade do co-transportador NKCC ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$), o PTH aumenta a reabsorção de sódio, potássio e cloreto; e via aumento da atividade dos canais ROMK (*renal outer medullary potassium channel*) aumenta a secreção de K^+ . Com isso, o PTH cria uma força motriz para reabsorção passiva de cálcio, por tornar o espaço basolateral mais negativo do que o espaço luminal. Porém, diferente do que acontece no túbulo proximal, a ativação do CaSR pelo aumento do cálcio no ramo espesso da alça de Henle leva a uma diminuição na reabsorção de cálcio, o que

está relacionado ao fato de o receptor estar localizado na membrana basolateral. Quando ativado, o CaSR inibe a atividade do PTH e diminui a força motriz para reabsorção de cálcio. Ainda, o CaSR inibe diretamente a reabsorção de cálcio, de forma independente de PTH, ao inibir uma das proteínas que controlam a permeabilidade celular, a claudina 14 (GONG et al., 2015).

O túbulo contorcido distal é um pequeno segmento do néfron que tem um papel-chave no ajuste fino da reabsorção do cálcio e de magnésio. Neste segmento, tanto a ação do hormônio PTH quanto a atividade do CaSR estimulam a reabsorção de cálcio (Figura 6 - C), o que ocorre via ativação de receptores TRPV5 (*transiente receptor potential cation channel subfamily V member 5*) presentes na membrana luminal (DE GROOT, BINDELS e HOENDEROP, 2008). Neste segmento, o CaSR já foi identificado na membrana apical e basolateral, bem como em vesículas que expressam o TRPV5 (TOPALA et al., 2009).

O CaSR é expresso em células intercalares e em células principais do ducto coletor (Figura 6 – D) (RICCARDI e BROWN, 2010; GRACA et al., 2016). Nas células principais, o CaSR é expresso na membrana apical e co-expresso em vesículas com as aquaporinas 2 (AQP2) (SANDS et al., 1997). Vários estudos *in vitro*, *in vivo* e observacionais em humanos sugeriram que a ativação do CaSR pelo aumento do cálcio inibe o tráfego de vesículas e a expressão de AQP2 na membrana apical dependente do hormônio anti-diurético (ADH) (TAMA et al., 2014). Uma possível explicação fisiológica para este mecanismo seria o fato de que, ao diminuir a reabsorção de água, a urina torna-se mais diluída, prevenindo a formação de cálculos de Ca^{2+} (ARCIDIACONO et al., 2014). Ainda, a concentração de NaCl no lúmen parece ter um efeito direto sobre a ativação do CaSR na medula interna do ducto coletor. Quando a concentração de NaCl está elevada nesta parte do néfron, o CaSR é inibido, o que aumenta a capacidade de reabsorção de água quando a tonicidade da urina no ducto coletor está elevada (SANDS et al., 1997).

Nas células intercalares, a ativação do CaSR por cálcio na membrana luminal promove acidificação da urina pelo aumento da atividade da H^+ -ATPase_v luminal (RENKEMA et al., 2009b). Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que o estímulo do CaSR aumenta a atividade bioquímica da H^+ -ATPase_v no córtex e na medula dos rins de camundongos (CASARE, MILAN e

FERNANDEZ, 2014). O aumento da secreção de prótons pela membrana apical da célula intercalar pode estar relacionado com a prevenção da nefrolitíase, já que uma urina mais ácida dificulta a formação de cristais de cálcio (RICCARDI e VALENTI, 2016).

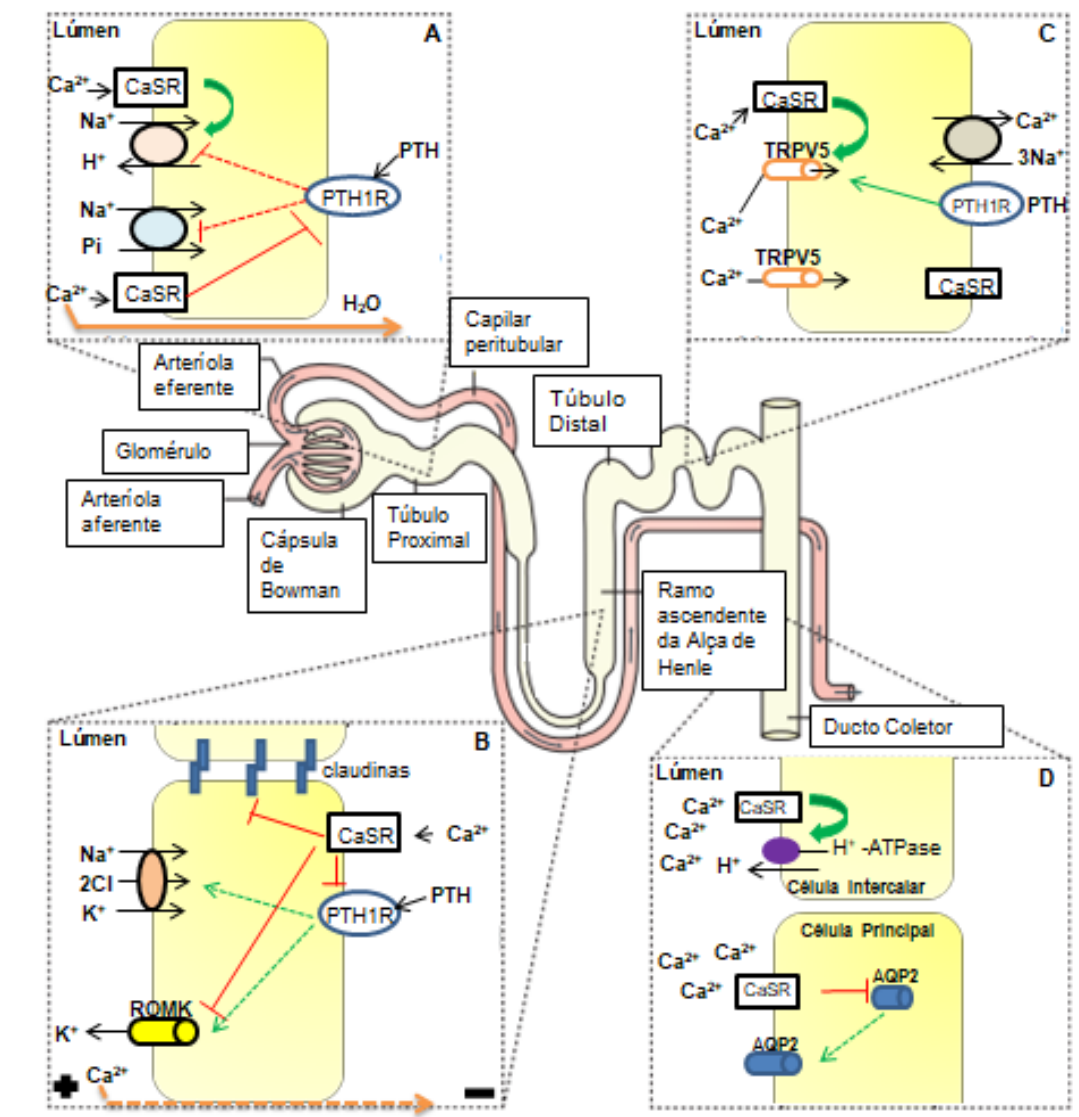


Figura 6: Funções do CaSR ao longo do néfron. A: célula do túbulo proximal. B: células do ramo espesso ascendente da alça de Henle. C: célula do túbulo distal. D: células do ducto coletor. As flechas em verde indicam ativação, enquanto as linhas em vermelho indicam inibição. As flechas e linhas pontilhadas indicam processos anteriores à ativação do CaSR. Fonte: modificada a partir de RICCARDI e VALENTI, 2016.

1.3. CÉLULAS MDCK C11

As células MDCK, derivadas do rim de cachorro (Cocker Spaniel) por Madin-Darby em 1958, estão entre as mais bem caracterizadas células do epitélio renal. Fazem parte de uma linhagem de células permanentes do néfron distal, mais especificamente do ducto coletor. São comumente utilizadas como modelo para estudos envolvendo polarização epitelial, formação e regulação de *tight junctions*, transporte transepitelial, mecanismos de infecção, propriedades e regulação de canais iônicos, etc. Apresentam, na membrana apical, mecanismos de transporte como trocador Na^+/H^+ , H^+ -ATPase, H^+/K^+ -ATPase e trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, bem como canais para Cl^- e K^+ (FERNANDEZ, OLIVEIRA-SOUZA e MALNIC, 2000). Na membrana basolateral foi verificada atividade do co-transportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$, Na^+/K^+ -ATPase, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, canais para K^+ e Ca^{2+} . A diferença de potencial transepitelial é de aproximadamente -50 mV (lúmen negativo) e a resistência está entre 200 e $4000 \Omega/\text{cm}^2$ (LANG e PAULMICH, 1995). São células capazes de secretar Cl^- e H^+ .

Contudo, as MDCK não representam uma população homogênea de células, consistindo em dois subtipos diferentes denominados C7 e C11. As MDCK C7 são células baixas, poligonais, com espaços intercelulares pouco nítidos e núcleo visível. Apresentam uma alta resistência ($>4000 \Omega/\text{cm}^2$), são secretoras de K^+ e têm sensibilidade ao amiloride e à aldosterona. As MDCK C11 são células altas, poligonais, com espaços intercelulares nítidos e núcleo invisível. Têm baixa resistência, em torno de $330 \Omega/\text{cm}^2$ (GEKLE et al., 1994).

É possível relacionar estes dois tipos de células MDCK citados a dois tipos de células predominantes no ducto coletor. Os ductos coletores situados no córtex do rim têm diâmetro de cerca de $40 \mu\text{m}$ e possuem células epiteliais cuboides. Mas à medida que adentram a medula passam a apresentar células colunares e seu diâmetro aumenta para cerca de $200 \mu\text{m}$. Ao microscópio eletrônico, o epitélio do ducto coletor revela a presença de células principais e de células intercalares. As células principais ou claras, em maior número (70%), e com citoplasma elétron-lúcido, são responsáveis pela reabsorção de íons Na^+ e secreção de íons K^+ . As células intercalares ou escuras (30%), as quais têm sua frequência diminuída à proporção que o túbulo desce a medula, apresentam

citoplasma elétron-denso com muitas mitocôndrias. Ainda, as células intercalares podem ser de dois tipos, alfa e beta. As intercalares alfa possuem H^+ -ATPase_v na membrana luminal, tornando-as responsáveis pela secreção ativa eletrogênica de H^+ . Além disso, também são responsáveis pela reabsorção de K^+ através de uma H^+K^+ -ATPase. As do tipo beta caracterizam-se por secreção de íons bicarbonato (MELLO-AIRES, 2013). Deste modo, é possível relacionar o subtipo C7 com as células principais e o subtipo C11 com as células intercalares do ducto coletor.

Portanto, as células MDCK C11, por assemelharem-se às células intercalares do ducto coletor, apresentam-se como um modelo ideal para o estudo da ação do CaSR sobre a atividade da H^+ -ATPase_v. Este modelo já foi utilizado previamente em nosso laboratório (SANTOS et al, 2009).

Como citado na seção anterior, alguns estudos indicam que o estímulo do CaSR é capaz de incrementar a atividade bioquímica da H^+ -ATPase_v na região cortical e medular externa do rim de camundongos (CASARE, MILAN e FERNANDEZ, 2014) e a secreção de H^+ numa preparação de ducto coletor medular externo de camundongo perfundido (RENKEMA et al., 2009b). Desta forma, a possível relação entre o CaSR e a atividade da H^+ -ATPase_v em células intercalares precisa ser melhor estudada.

1.4. JUSTIFICATIVA

A urolitíase é a terceira doença mais comum que afeta o trato urinário, além de ter uma alta taxa de recorrência. Os cálculos formados por oxalato de cálcio (CaOx) são os mais comuns, atingindo 80% do total. Existem diferentes técnicas para remoção dos cálculos atualmente, como o tratamento com ondas de choque, a ureteroscopia e a nefrolitotomia percutânea. Porém, são tratamentos que possuem custo elevado e ficam limitados a uma pequena parcela de pacientes (LI et al., 2016). Assim sendo, é importante estudar mecanismos que estejam envolvidos na formação dos cálculos. Para isso, este trabalho visou elucidar a relação entre a ativação do CaSR e a secreção de prótons pela H^+ -ATPase_v em células do néfron distal, mecanismo que, ao aumentar a acidez tubular, dificulta a formação de cristais de cálcio.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal foi investigar a interação do CaSR com o transporte de prótons em um modelo de células intercalares renais do ducto coletor de mamíferos, as células MDCK C11.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito de um agonista específico, de agonistas não específicos e de um antagonista seletivo de CaSR sobre a atividade da $H^+ -ATPase_v$
- Estudar se mudanças na concentração extracelular de cálcio alteram a atividade bioquímica da $H^+ -ATPase$ vacuolar, e se a inibição do CaSR utilizando o antagonista seletivo é capaz de interferir neste processo.
- Estudar possíveis vias de sinalização envolvidas no processo de ativação do CaSR.
- Estudar o efeito da ativação do CaSR sobre a $[Ca^{2+}]_i$ promovida pelos agonistas específico e não-específico do receptor.
- Determinar se as eventuais modificações na $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pelo estímulo do CaSR estão relacionadas ao aumento da entrada de cálcio do meio extracelular ou à liberação de estoques intracelulares de cálcio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CULTIVO DAS CÉLULAS MDCK C11

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular MDCK C11, gentilmente cedidas pelo Dr. H. Oberleither, do Departamento de Fisiologia da Universidade de Münster, Alemanha. O subtipo C11 das células MDCK (figura 7) foi cultivado em *Minimum Essential Medium* (MEM) - Gibco, que contém: sais de Earle, glutamina e aminoácidos essenciais, com adição de NaHCO_3 2 g/l, penicilina e estreptomicina (10000 U/ml). O meio foi suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10% (Gibco™, Grand Sland, NY). As células foram cultivadas em garrafas plásticas (Jet-Biofil) a uma densidade de $10^4/\text{cm}^2$, acondicionadas em estufa CO_2 (5%), a 37°C (Sanyo, Japão). Após observação da confluência (cerca de 72h após a realização da cultura), as células foram tratadas com Tripsina - EDTA (Gibco™, Grand Sland, NY), centrifugadas, ressuspensas em meio acrescido de soro bovino fetal e semeadas em placas de 6 poços (Kasvi) ou lamínulas 20 x 20 mm, de acordo com o protocolo a ser realizado. O número de passagens utilizadas foi de 70 a 95.

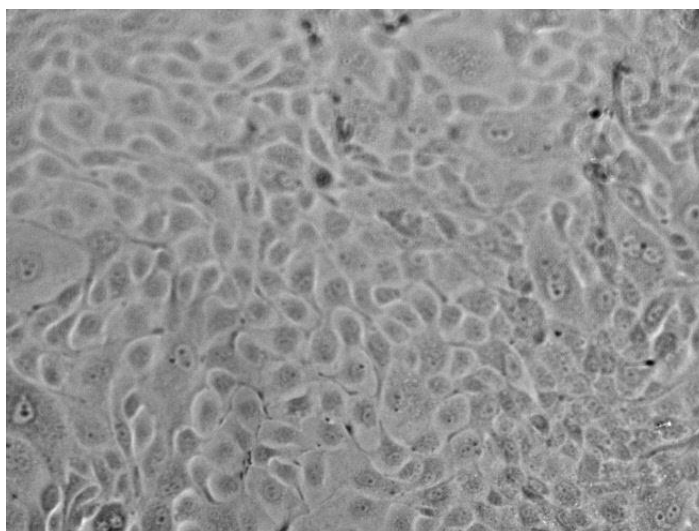


Figura 7: Células MDCK C11. Aumento: 20x. Fonte: fotografada pela autora.

3.2. ESTUDOS BIOQUÍMICOS DA ATIVIDADE DA H⁺-ATPASE_v

Os experimentos bioquímicos visaram confirmar a relação entre ativação do CaSR e a atividade da H⁺-ATPase_v renal sensível à concanamicina. Através destes experimentos é possível estimar a atividade de uma determinada ATPase, desde que se conheça a quantidade de íons fosfato (Pi) liberados pela mesma durante a reação. A primeira etapa do processo consiste na obtenção de um homogeneizado de células, para em seguida ser mensurada a atividade da H⁺-ATPase_v.

3.2.1. Obtenção do homogeneizado celular.

O procedimento de obtenção do homogeneizado de células MDCK C11 (figura 8) foi adaptado daquele descrito por Boumendil-Podevin e Podevim (1983) e Caruso-Neves (1999). Este procedimento deu-se da seguinte forma: 1) descartou-se o meio de cultura das placas de seis poços; 2) o epitélio foi lavado duas vezes com PBS (*phosphate buffered saline*) livre de Mg²⁺ e Ca²⁺; 3) adicionou-se PBS novamente para realizar a remoção mecânica das células (*i. e.*, raspagem) com auxílio do *cell scraper*; 4) centrifugação a 1.200 rpm (120 g) por cinco minutos a temperatura ambiente (Excelsa Baby I, Fanem, São Paulo, Brasil); 5) após a remoção do sobrenadante, o sedimento formado (*i. e.*, as células) foi ressuspenso com 500 µl da Solução de Solubilização a 4°C e pH de 7,4 (Triton X-100 1%; EDTA 50 mM; HEPES 0,5 M; Sacarose 0,5 M), e mantido no gelo por 30 minutos. O Triton X-100 é um surfactante não iônico utilizado para separar proteínas de lipídios, sem perda de atividade biológica (MANKO, ZDZIENNICKA e JANCZUK, 2017). Para determinar a concentração de proteínas do homogeneizado de células foi utilizado o método de Bradford, utilizando albumina como padrão (BRADFORD, 1976). O procedimento é baseado na formação de um complexo entre o corante Brilliant Blue G, presente na Solução de Bradford, e as proteínas em solução. O complexo formado entre a proteína e o corante provoca uma mudança na absorção máxima nas leituras entre 465 e 595 nm. O valor de absorção é proporcional à concentração de proteína presente.

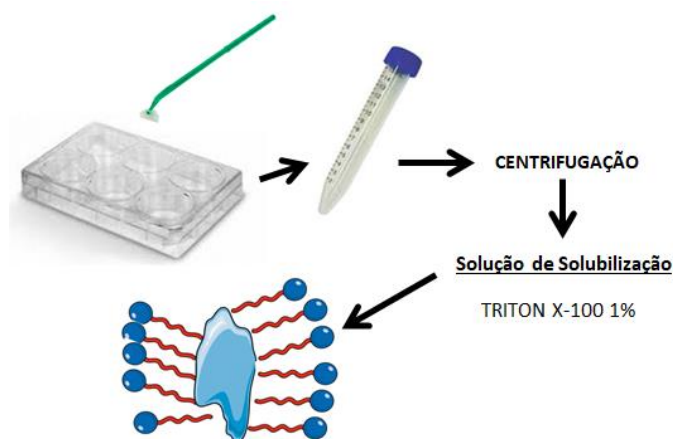


Figura 8: Obtenção do homogeneizado celular. Após remoção das monocamadas de células com o *cell scraper*, estas foram transferidas para tubos *falcon* e centrifugadas com PBS. O sobrenadante foi removido e foi adicionada a solução de solubilização ao tubo, a qual possibilita o estudo das proteínas de membrana.

3.2.2. Determinação da Atividade da H^+ -ATPase_v.

O protocolo utilizado para mensurar a atividade da H^+ -ATPase_v foi adaptado a partir do desenvolvido por Fiske & Subbarow no ano de 1925 (SANTOS et al., 2009). O fosfato inorgânico (Pi) foi quantificado utilizando-se uma reação colorimétrica através da adição de Reagente de Cor, o qual é composto por duas diferentes soluções: Molibdato de amônio 10% diluído em NH_4OH 1%; e Metovanadato de amônio 0,47% diluído em HNO_3 . O Pi forma um complexo colorido ao reagir com o Molibdato de Amônio e com o Metovanadato de Amônio.

Independente do protocolo bioquímico desenvolvido foi adicionado a todos os tubos um meio de reação comum (MRC), contendo: Oligomicina $1\mu M$ (inibe ATPase mitocondrial), Azida de Na^+ 10mM (inibe ATPase mitocondrial), Ouabaína 1 mM (inibe a Na^+/K^+ -ATPase), $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 4 mM, ATP_{Na^+} 4 mM, HEPES 50 mM (tampão com pH 7,0) e KCl 50 mM, conforme demonstrado na figura 9.

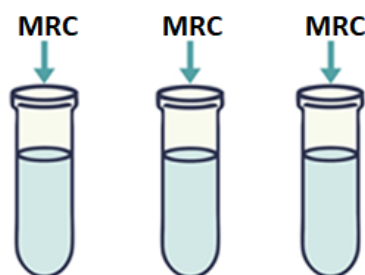


Figura 9: Adição da solução MRC aos tubos de ensaio.

A reação inicia-se com a adição da amostra (concentração final de proteína de aproximadamente 0,3 mg/ml) à solução de reação de cada protocolo específico, com intervalos de 30 segundos entre um tubo de ensaio e outro (figura 10).

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 µl de Ácido Tricloro Acético 12% (4°C) e os tubos foram colocados imediatamente no gelo. Nos tubos brancos, a reação foi disparada com a adição da amostra à solução de reação após 28 minutos de incubação, com interrupção da reação logo em seguida. Desta forma, o tubo branco contém a amostra, mas não há reação. Este procedimento é utilizado para determinar a hidrólise espontânea do fosfato.

Após esta etapa, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 2.000 rpm (450 g) 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. Em seguida à centrifugação, 500 µl do sobrenadante - contendo o Pi resultante da hidrólise do ATP – foi transferido para novos tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 500 µl do Reagente de Cor. Os tubos foram submetidos à agitação no *vortex* e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 380 nm (*ThermoScientific, USA*).

A quantidade de Pi encontrada nos tubos experimentais é diminuída pelo valor observado no tubo branco, a fim de obter o valor real de Pi liberado apenas pela atividade das ATPases. A atividade da H⁺-ATPase_v foi calculada pela diferença entre o Pi liberado na ausência e na presença de concanamicina 10⁻⁸M. Previamente aos experimentos bioquímicos, foram realizadas curvas de calibração de Pi utilizando uma solução mãe de Pi (1 mM) que continha Fosfato Monobásico (1 mM) e Fosfato Dibásico (1 mM) a pH 7.0. Com estas curvas foi possível então obter, a partir da absorbância, a quantidade de Pi (mM) resultante da reação colorimétrica. A atividade da H⁺-ATPase_v é expressa pela velocidade de liberação do Pi, em nmol de Pi liberados por mg de proteína por unidade de tempo (nmol Pi. mg⁻¹.min⁻¹).

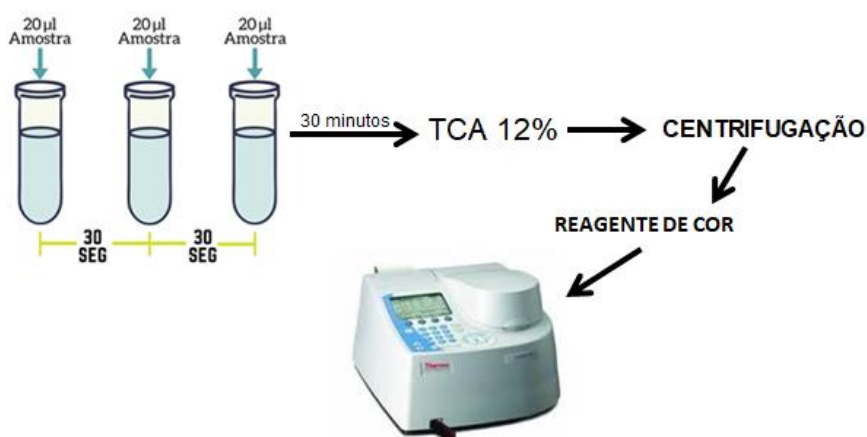


Figura 10: Determinação da atividade da H⁺-ATPase_v. 20 µl da amostra contendo as proteínas foram adicionados aos tubos de ensaio, com intervalo de 30 segundos entre cada tubo. Após 30 minutos, foi adicionado TCA a cada tubo, interrompendo a reação. Depois da centrifugação, 500 µl do sobrenadante dos tubos foram transferidos para novos tubos de ensaio, aos quais se adicionou o reagente de cor. A leitura da absorbância do fosfato foi realizada no espectrofotômetro. Fonte: a autora.

Os protocolos utilizados apresentam-se a seguir:

1) Protocolo Agonistas de CaSR: Nestes experimentos foram utilizados agonistas não específicos do receptor, gadolínio 300 µM (Gd³⁺) e neomicina 200 µM (Neom) (concentrações são semelhantes às utilizadas em estudos prévios - CHAMPIGNEULLE, 1997; RENKEMA, 2009b); e o agonista específico de CaSR, R-568, nas concentrações de 0,5 µM e 1 µM.

Tubo	MRC	Conc. 10 ⁻⁸ M	Neom	Gd ³⁺	R568	H ₂ O	Proteína	V.Total
Branco	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	0,04	0,02	0,2
6	0,1	0,02			0,01	0,05	0,02	0,2

Tabela 2: Protocolo Agonistas de CaSR. Br: tubo branco. MRC: meio de reação comum. Conc: concanamicina. V. Total: volume total. Os valores representados estão em ml.

2) Protocolo Antagonista de CaSR: Nestes experimentos foi utilizado o antagonista seletivo do CaSR, NPS 2143 150 nM.

Tubo	MRC	Conc. 10^{-8} M	Ca ²⁺ 1mM	NPS 2143	H ₂ O	Proteína	V.Total
Branco	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	0,01	0,03	0,02	0,2

Tabela 3: Protocolo Antagonista de CaSR. Br: tubo branco. MRC: meio de reação comum. Conc: concanamicina. V. Total: volume total. Os valores representados estão em ml.

3) Protocolo Cálcio Extracelular: Nestes experimentos a concentração extracelular de Ca²⁺ foi modificada, tendo sido utilizadas concentrações crescentes de Ca²⁺ (0,01; 0,5; 1 e 2 mM). O EGTA atua como um quelante de Ca²⁺.

Tubo	MRC	Conc. 10^{-8} M	EGTA 50mM	CaCl ₂ 0,01mM	CaCl ₂ 0,5mM	CaCl ₂ 1mM	CaCl ₂ 2mM	H ₂ O	Proteína	V.Total
Br	0,1							0,08	0,02	0,2
1	0,1							0,08	0,02	0,2
2	0,1	0,02	0,02					0,04	0,02	0,2
3	0,1	0,02		0,02				0,04	0,02	0,2
4	0,1	0,02			0,01			0,05	0,02	0,2
5	0,1	0,02				0,02		0,04	0,02	0,2
6	0,1	0,02					0,04	0,02	0,02	0,2

Tabela 4: Protocolo [Ca²⁺]_o. Br: tubo branco. MRC: meio de reação comum. Conc: concanamicina. V. Total: volume total. Os valores representados estão em ml.

4) Protocolo via de sinalização do CaSR: Nestes experimentos foram utilizados PMA 10^{-9} M (ativador de proteína quinase C (PKC)); e U-73122 5×10^{-8} M (inibidor das fosfolipases A e C) para avaliar possíveis vias de sinalização envolvidas no mecanismo de ação do CaSR.

Tubo	MRC	Conc. 10 ⁻⁸ M	Gd ³⁺	PMA	U-73122	H ₂ O	Prot	V.Total
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	0,04	0,02	0,2

Tabela 5: Protocolo PMA e U-73122. Br: tubo branco. MRC: meio de reação comum. Conc: concanamicina. Prot: proteína. V. Total: volume total. Os valores representados estão em ml.

3.3. MENSURAÇÃO DO Ca²⁺_i

Mudanças qualitativas na [Ca²⁺]_i das culturas celulares foram monitoradas pela emissão da intensidade fluorescente do marcador FLUO 4-AM. O espectro de excitação para este marcador fluorescente é de 480 nm, enquanto a fluorescência é medida a 520 nm a cada 5 segundo. O *probe* FLUO-4 apresenta um incremento da intensidade fluorescente na faixa verde (520 nm) após sua ligação com o Ca²⁺. 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 durante os experimentos foram expressas como porcentagem em relação à intensidade de fluorescência no período basal (período de registro com solução controle).

A lamínula contendo a monocamada celular foi colocada na câmara termostaticada acoplada (37°C) à platina do microscópio invertido de fluorescência (*Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Germany*). Após 20 minutos de incubação com o marcador fluorescente (10 µM Fluo-4 AM), as células foram lavadas com solução *Ringer* controle para remover os restos de *probe* desesterificados. A solução *Ringer* controle apresenta a seguinte composição: NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, Hepes

10 mM, glucose 10 mM e Na_2SO_4 1 mM. As áreas de interesse foram identificadas com um aumento de 20x utilizando o software AxioVision 4.8.1 (Carl Zeiss, Germany). O tamanho da amostra é expresso em número de áreas/número de lamínulas.

Após a estabilização do registro fluorescente na presença da solução controle (cerca de 2 minutos), cada lamínula foi exposta a diferentes soluções e protocolos, os quais estão descritos a seguir:

- 1) Protocolo agonista não específico de CaSR: Após o registro com a solução controle, foi adicionado às células Gd^{3+} com uma concentração final de 300 μM e, imediatamente, foi feito o registro durante 5 minutos.
- 2) Protocolo agonista específico de CaSR: Após o registro com a solução controle, foi adicionado às células R-568 com uma concentração final de 1 μM e, imediatamente, foi feito o registro durante 5 minutos.
- 3) Protocolo tapsigargina e agonista específico de CaSR: Após o registro com a solução controle, foi adicionado às células tapsigargina - depleta os estoques intracelulares de cálcio - a uma concentração final de 0,1 μM . O registro foi feito 15 minutos após sua adição. Depois, esta solução foi removida e foi adicionado R-568 com uma concentração final de 1 μM , seguido de registro por 5 minutos.
- 4) Protocolo zero cálcio: Após o registro com a solução controle, foi adicionado às células tapsigargina e EGTA (quelante de cálcio extracelular), com concentrações finais de 0,1 μM e 2 mM, respectivamente. Em seguida, esta solução foi removida e foi adicionado R-568 com uma concentração final de 1 μM , seguido de registro por 5 minutos.

3.4. REAGENTES

Concanamicina, Ouabaína, EGTA (Ethylene Glycol – bis (β -Aminoethyl Ether) – N,N,N',N' – Tetra-acetic acid), ATP-Na^+ , EDTA, PMSF (fenilmetil-sulfonil fluorito), NMDG+ (N-metil-D-glucamina), Tapsigargina e Gadolínio (Gd^{3+}), obtidos da SIGMA; Azida sódica obtida da MERCK; Neomicina, obtida da Fisher Bioreagentes; Nigericina, PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), R-568, U-73122 e DMSO (dimetil-sulfóxido) obtidos da Santa Cruz Biotechnology; FLUO-4 da Molecular Probe; NPS 2143 obtido da TOCRIS Bioscience.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados na forma de valores médios com erro padrão da média (EPM). Inicialmente, a normalidade da amostra foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as análises entre dois grupos foi utilizado o teste *t* de *student* para amostras pareadas. Para as análises com mais de dois grupos foi feita análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey quando aquela análise era estatisticamente significativa. Para as análises de dados não paramétricos foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas e o teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas. O critério de significância estatística se obteve com valores de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 7 (*GraphPad Software*, San Diego, California - EUA).

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA H^+ -ATPase_v.

Nestes experimentos, investigamos modificações na atividade da H^+ -ATPase_v de células MDCK C11 a partir da utilização de diferentes moduladores da atividade do CaSR. Foi observado que o incremento do íon cálcio na solução de incubação estimulou a atividade da H^+ -ATPase_v de forma dose-dependente (figura 11).

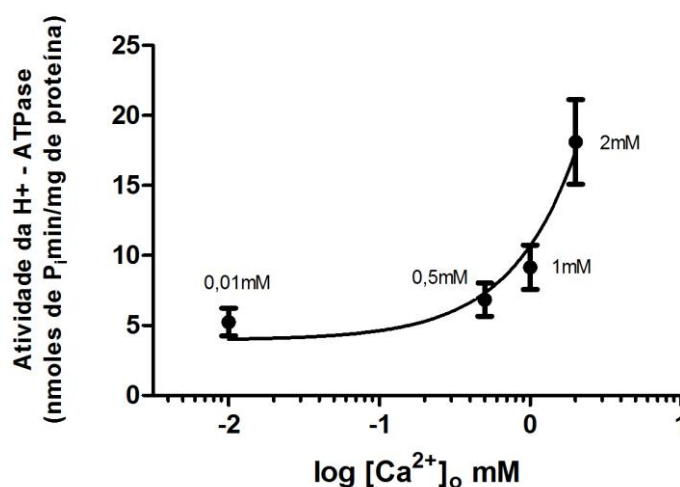


Figura 11: Curva dose-resposta da atividade da H^+ -ATPase_v na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} extracelular (0.01, 0.5, 1 e 2 mM).

O Ca^{2+}_o não é o único agonista de CaSR. Outros cátions como o Gd^{3+} são capazes de ativar o receptor, assim como antimicrobianos aminoglicosídeos como a neomicina (CHANG e SHOBACK, 2004). Neste trabalho, a utilização do agonista não específico de CaSR, Gd^{3+} 300 μM , incrementou de forma significativa a atividade da H^+ -ATPase_v em relação a atividade basal da bomba (Basal: 6.810 ± 1.590 ; Gd^{3+} : 17.37 ± 3.01 nmoles de Pi/min/mg de proteína, com $p < 0.05$) (figura 12). Já o agonista não específico de CaSR, neomicina 200 μM , incrementou a atividade da H^+ -ATPase_v em relação a atividade basal da bomba, porém não de forma significativa (basal: 6.810 ± 1.590 ; neomicina: 12.77 ± 2.57 nmoles de Pi/min/mg de proteína, com $p > 0.05$) (figura 12).

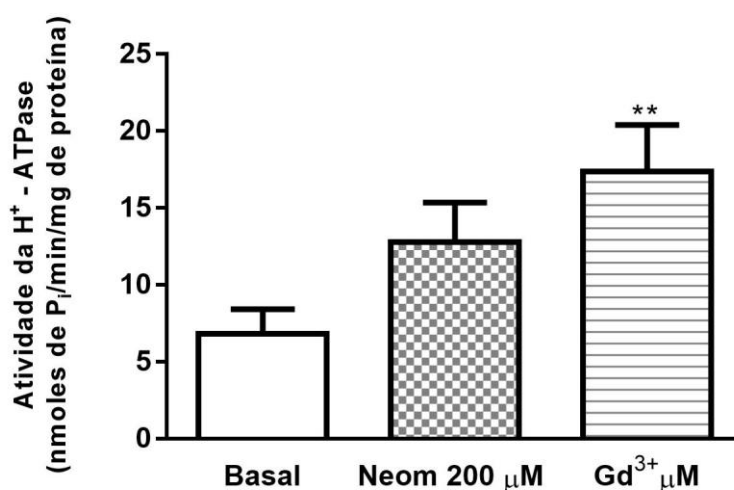


Figura 12: Atividade da H^+ -ATPase_v em nmol P_i /mg/min. À esquerda, atividade basal; ao centro, atividade na presença do agonista não específico de CaSR, neomicina 200 μM ; à direita, atividade na presença do agonista não específico de CaSR, Gd^{3+} 300 μM . ** $p < 0,05$ x Basal; $n = 8$.

Para se estudar especificamente a atividade do CaSR uma série de ligantes que mimetizam ou potencializam o efeito do Ca^{2+}_o , os chamados calcimiméticos, vem sendo sintetizados. O R-568 foi um dos primeiros calcimiméticos a serem desenvolvidos (MURAKAMI et al., 2000). Nestes experimentos com células MDCK C11, o agonista R-568 na concentração de 0,5 μM aumentou em 108,4% a atividade da H^+ -ATPase_v em relação à atividade basal, com $p = 0,03$. Já com a concentração de 1 μM do agonista específico de CaSR, o aumento da atividade da bomba em relação à atividade basal foi mais significativo do que o obtido com 0,5 μM , sendo de 195,64%, com $p < 0,0001$ (figura 13).

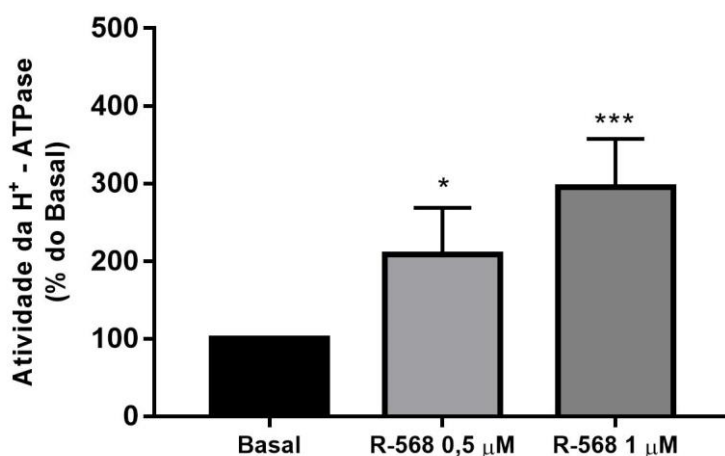


Figura 13: Modificação em % da atividade da H⁺ -ATPase_v em relação à Basal. À esquerda, atividade basal; ao centro, atividade na presença de R-568 0,5 μM; e à direita, atividade na presença de R-568 1 μM. *p = 0,03 x Basal; ***p < 0,0001 x Basal. n = 8 para a concentração de 0,5 μM e n = 11 para a concentração de 1 μM.

O NPS 2143 foi o primeiro calciolítico sintetizado para atuar como antagonista alostérico seletivo de CaSR (LETZ et al., 2014). O NPS 2143 150 nM, bloqueou o aumento da atividade da H⁺ -ATPase_v promovido pelo Ca²⁺_o 1 μM (Basal: 4.55 ± 0.86; Ca²⁺ 1 mM: 9.62 ± 1.7; NPS 2143 150 nM + Ca²⁺ 1 mM: 6.73 ± 1.93 nmoles de Pi/min/mg de proteína) (figura 14).

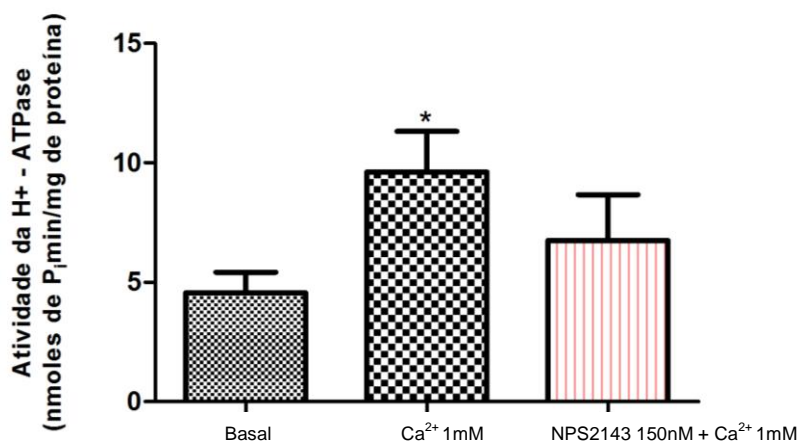


Figura 14: Atividade da H⁺ -ATPase em nmol Pi/min. À esquerda, atividade basal; ao centro, atividade na presença de Ca²⁺ 1mM; à direita, atividade na presença de NPS 2143 150nM + Ca²⁺ 1 mM. *p < 0,05 x Basal; n = 8.

A ativação do CaSR envolve diferentes via de sinalização com a participação de diversas proteínas quinases, fosfolipases e segundos mensageiros intracelulares. As fosfolipases C e A (PLC e PLA) e a proteína quinase C (PKC) são enzimas intermediárias na via de sinalização do CaSR e modificam o metabolismo intracelular (DÍAZ-SOTO et al., 2016). Neste estudo, o inibidor das fosfolipases A e C, U-73122 5×10^{-8} M, reverteu o incremento na atividade da bomba observado na presença de gadolínio $300 \mu\text{M}$ (Gd^{3+} : 17.73 ± 1.46 ; U-73122: 9.70 ± 2.38 nmoles de $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, com $p < 0.05$). Por outro lado, o ativador de PKC, PMA 10^{-9} M, incrementou a atividade da H^+ - ATPase_v, porém não de forma significativa (Basal: 5.28 ± 1.17 ; PMA: 8.42 ± 1.65 , com $p > 0,05$) (figura 15).

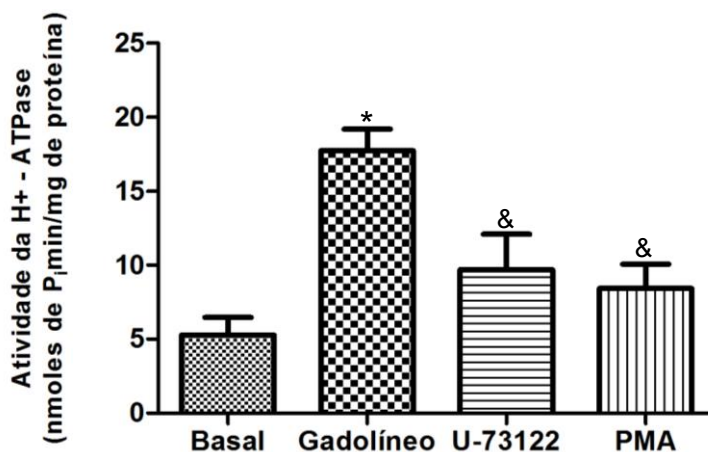


Figura 15: Atividade da H^+ - ATPase em $\text{nmol Pi}/\text{mg}/\text{min}$ na presença de Gd^{3+} $300 \mu\text{M}$; do ativador de proteína quinase C, PMA 10^{-9} M; e de inibidor das fosfolipases A e C, U-73122 5×10^{-8} M. * $p < 0,05$ x Basal; & $p < 0,05$ x Gd^{3+} ; $n = 9$.

4.2. MENSURAÇÃO DO Ca^{2+}_i

As modificações na concentração de Ca^{2+}_i de células MDCK C11 foram obtidas durante os experimentos com a utilização do marcador fluorescente FLUO-4 10 μM , sendo os resultados expressos como porcentagem em relação à intensidade de fluorescência no período de registro com solução controle. A utilização do agonista não específico de CaSR, Gd^{3+} 300 μM , promoveu uma queda significativa na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em relação ao controle ($-2,81 \pm 0,47\%$) (figura 16).

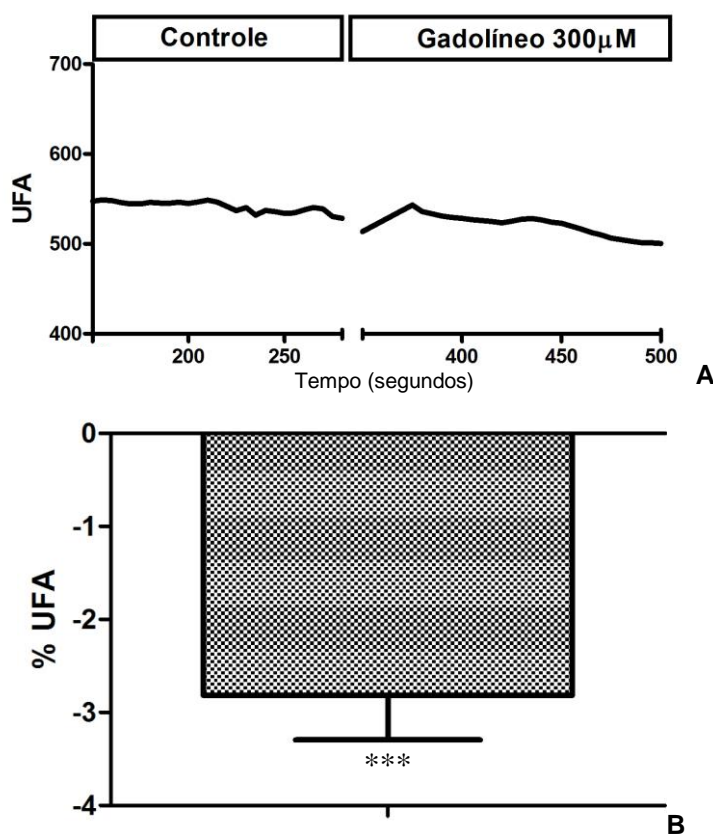


Figura 16: Registro da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pela adição de Gd^{3+} 300 μM . Em A, registro único de UFA obtido ao longo do tempo (segundos) com solução controle seguida da adição de Gd^{3+} 300 μM . Em B, modificação de UFA em porcentagem (%) \pm E.P.M; $n = 149/12$. *** $p < 0,0001$.

Já o agonista específico de CaSR, R-568 1 μ M, promoveu um aumento significativo na $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao controle ($39.23 \pm 8.37\%$), com $p < 0,0001$ (figura 17).

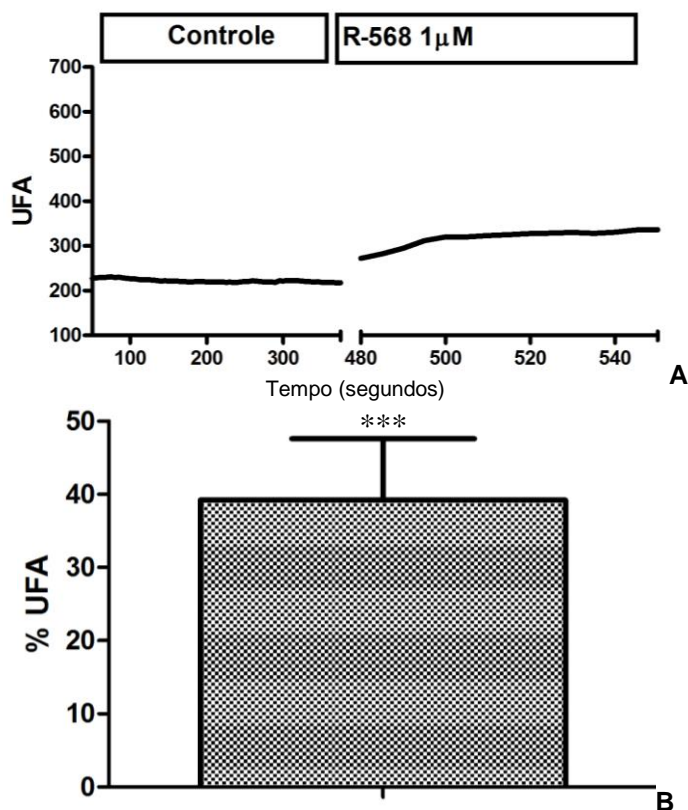


Figura 17: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de R-568 1 μ M. Em A, registro único de UFA obtido com solução controle seguida da adição de R568 1 μ M. Em B, modificação de UFA em porcentagem (%) \pm E.P.M; $n = 151/12$. *** $p < 0,0001$.

Para determinar se a via de ativação do CaSR depende exclusivamente da liberação dos estoques intracelulares de cálcio, foi utilizado tapsigargina 0,1 μ M para impedir o armazenamento de cálcio no retículo via bloqueio da Ca^{2+} - ATPase. A lamínula foi incubada durante 15 minutos com tapsigargina e após este período foi adicionado o agonista de CaSR R-568 1 μ M para observar possíveis modificações na $[Ca^{2+}]_i$. Foi observado um incremento significativo na $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao registro com solução controle ($26.57 \pm 4.3\%$), com $p < 0,0001$ (figura 18), indicando que o incremento observado não depende da liberação de estoques intracelulares de cálcio.

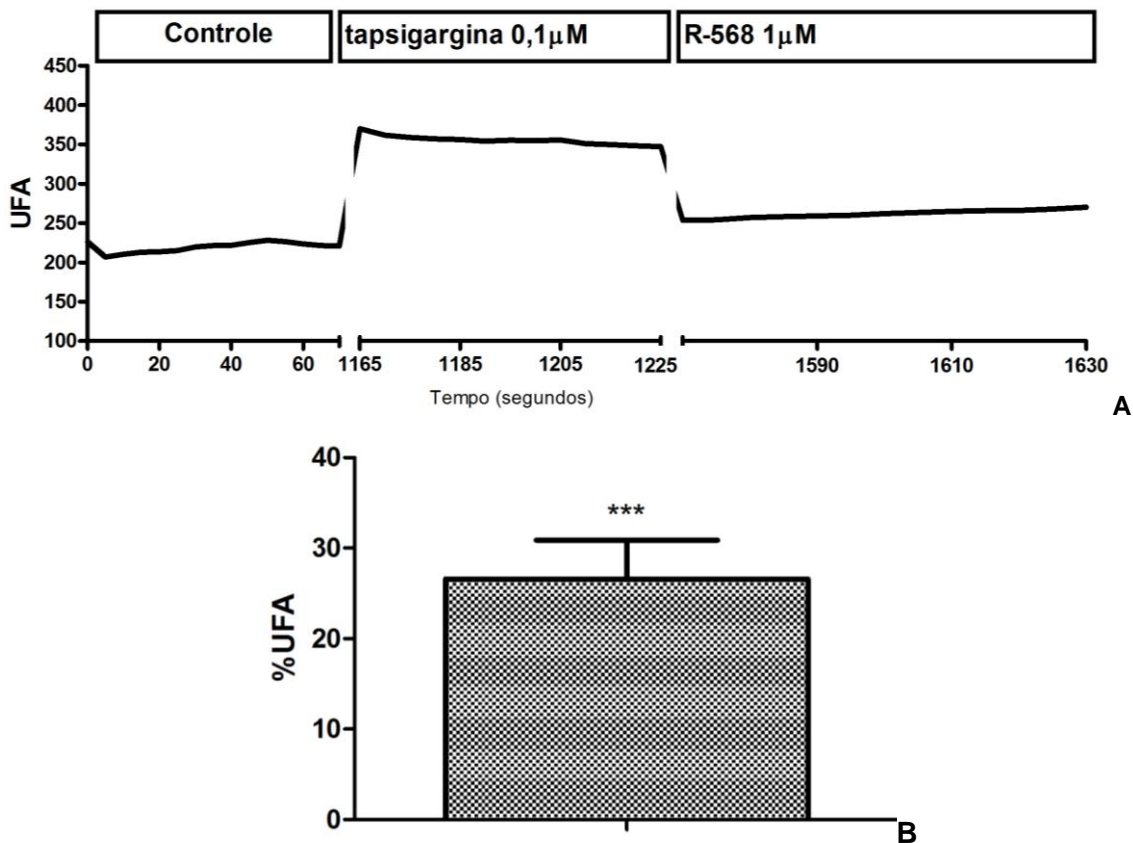
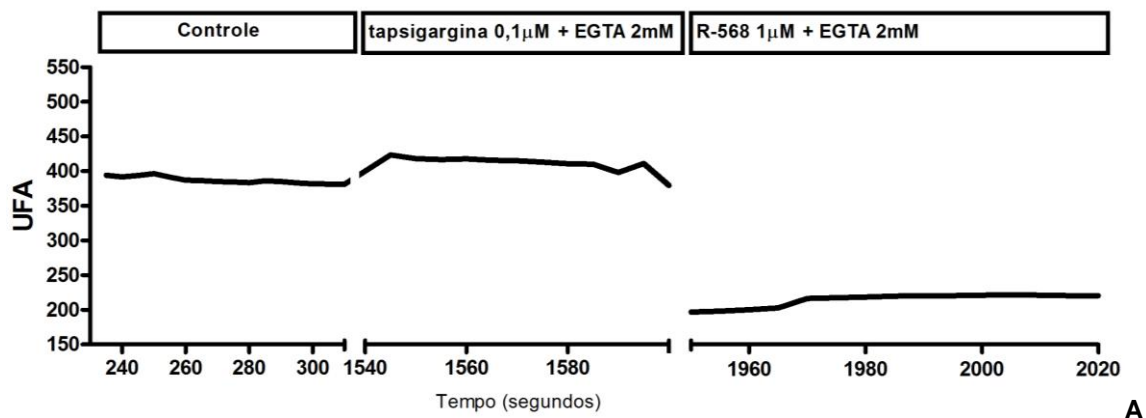


Figura 18: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de R-568 1 μ M após taspigargina 0,1 μ M. Em A, registro único de UFA com solução controle, seguido da adição de R-568 1 μ M pós-taspigargina 0,1 μ M. Em B, modificação de UFA em porcentagem (%) \pm E.P.M; n= 165/11. Em B, ***p < 0,0001.

Todavia, com a utilização de EGTA 2 mM para quelar o Ca^{2+}_o , o aumento do cálcio intracelular não ocorreu, sendo observada uma queda da intensidade fluorescente quando comparada ao registro com solução controle (-12.0 \pm 4.16%), com p < 0,0001 (figura 19), o que indica que o incremento na $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo estímulo do CaSR depende da entrada de cálcio extracelular.



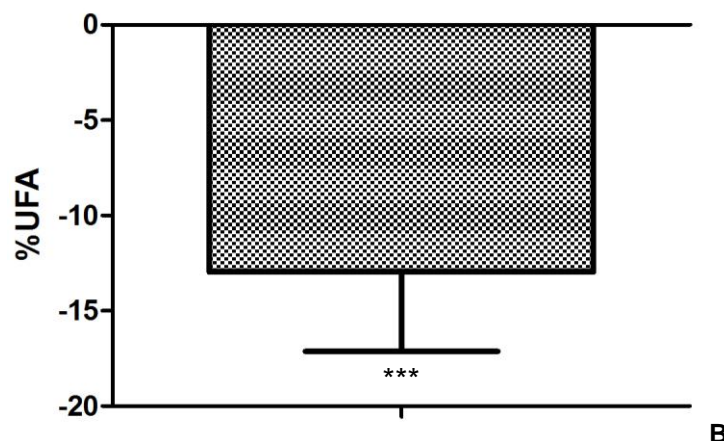


Figura 19: Registro da $[Ca^{2+}]_i$ pela adição de R-568 1 μ M na presença de EGTA 2 mM. Em A, registro único de UFA com solução controle, seguido da adição de R-568 1 μ M em solução de EGTA 2 mM. Em B, modificação de UFA em porcentagem (%) \pm E.P.M; n= 108/7. ***p < 0,0001.

5. DISCUSSÃO

O CaSR é um receptor sensível ao Ca^{2+}_o que já foi encontrado em diferentes tecidos. Nos rins, está presente na membrana apical e/ou basolateral ao longo de todo o néfron e colabora com a homeostase do cálcio e de outros íons no organismo. As técnicas de hibridização *in situ* e imuno-histoquímica mostraram a expressão do CaSR no ducto coletor de ratos, camundongos e humanos (GRACA et al., 2016). Já foi demonstrado também, pelos métodos de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR), que células MDCK *wild type* expressam o CaSR (ARTHUR et al., 1997). Sendo as células intercalares do ducto coletor fundamentais para o processo de acidificação da urina, procurou-se investigar neste estudo se o estímulo do CaSR por diferentes agonistas é capaz de aumentar a extrusão de prótons via H^+ -ATPase_v em células MDCK C11 e, ainda, quais as possíveis vias de sinalização envolvidas neste processo.

Para o túbulo proximal, vários fatores que regulam o transporte ácido-base já foram identificados: a concentração de eletrólitos; o estado ácido-base; diferentes hormônios, como o PTH, a angiotensina II, a aldosterona, a endotelina-1 e alguns glicocorticoides. Estes fatores, juntos ou de forma independente, são capazes de alterar a $[Ca^{2+}]_i$ e modular a secreção de prótons via H^+ -ATPase_v (BOBULESCO e MOE, 2009; LEITE-DELLOVA, MALNIC e MELLO-AIRES, 2001;

WAGNER et al., 2004). Na ausência da regulação da reabsorção de cálcio via hormonal nos rins, a relação linear entre a concentração de cálcio plasmático e na urina persiste, indicando a presença de outro mecanismo calciotrópico: a sensibilidade do CaSR ao cálcio extracelular.

No presente trabalho com células do néfron distal, diferentes agonistas de CaSR promoveram o estímulo da atividade da H^+ -ATPase_v: Ca^{2+}_o , Gd^{3+} e neomicina. O aumento da $[Ca^{2+}]_o$ determinou uma maior atividade da H^+ -ATPase_v de forma dose-dependente (figura 11). Contudo, o inibidor de CaSR, NPS 2143 150 nM, impediu o aumento da atividade da bomba observado com o Ca^{2+}_o 1 mM (figura 14), o que sugere que este aumento dá-se via ativação do CaSR.

Os agonistas não específicos de CaSR, Gd^{3+} 300 μ M e neomicina 200 μ M promoveram o aumento da atividade da H^+ -ATPase_v, porém, apenas o Gd^{3+} resultou em um incremento significativo quando comparado à atividade basal da bomba (figura 12). O agonista específico de CaSR, R-568, nas concentrações de 0,5 e 1 μ M, promoveu um aumento significativo da atividade da H^+ -ATPase_v (figura 13). Comparativamente, este aumento foi inferior ao observado com o Gd^{3+} 300 μ M, mesmo para a concentração de 1 μ M do calcimimético (Tabela 6).

Agonista de CaSR	% de aumento da atividade da H^+ -ATPase _v em relação à basal
Gd^{3+} 300 μ M	203,3%
R-568 0,5 μ M	108,4%
R-568 1 μ M	195,64%

Tabela 6: Aumento da atividade da H^+ -ATPase_v, em porcentagem (%) em relação à atividade basal da bomba, com o estímulo do CaSR com os agonistas Gd^{3+} e R-568.

Nos últimos anos surgiram alguns estudos indicando uma relação entre o CaSR e os mecanismos de secreção de prótons presentes no túbulo proximal e no ducto coletor. Estudos com animais utilizando micropunção e perfusão de túbulos proximais isolados demonstraram que ao se ativar o CaSR, pelo aumento do cálcio luminal ou por calcimiméticos, ocorre um concomitante aumento na extrusão de prótons dependente de sódio pelo trocador Na^+/H^+ . Já em animais knockout para o gene que codifica o CaSR, este mecanismo não ocorre no túbulo proximal (CAPASSO et al., 2013). Ainda, em nosso laboratório, já foi verificado que o estímulo do CaSR pelos agonistas Gd^{3+} e neomicina, em cultura de células do túbulo proximal (células OKP – *Opussum Kidney*), promove o incremento significativo da atividade da H^+ -ATPase_v (SANTOS, 2012).

Em relação ao néfron distal, Renkema et al. (2009b) demonstrou que ao expor ductos coletores da região medular externa do rim de camundongos a uma elevada concentração de cálcio extracelular (5 mM), ocorre o estímulo da atividade da H^+ -ATPase_v. Casare, Milan e Fernandez (2014), ao estimular o CaSR com Gd^{3+} 300 μM e neomicina 200 μM no córtex e na medula externa de camundongos, observaram um incremento na atividade bioquímica da H^+ -ATPase_v e da H^+/K^+ -ATPase.

Os cátions agonistas de CaSR, como o Gd^{3+} , e os calcimiméticos, como o R-568, ligam-se ao receptor em diferentes regiões (figura 2), o que poderia explicar a diferença no aumento da atividade da H^+ -ATPase_v pelo estímulo de diferentes vias de sinalização. Os resultados obtidos na mensuração do Ca^{2+} mostraram que o Gd^{3+} promoveu a queda do cálcio intracelular (figura 16), enquanto o agonista específico de CaSR R-568 1 μM promoveu um aumento significativo da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figura 17). Possivelmente, o incremento da atividade da H^+ -ATPase_v em células MDCK C11, promovido pelo estímulo do CaSR por Gd^{3+} e por R-568 1 μM , faz com que o CaSR interaja com proteínas G diferentes, sendo que a ligação do calcimimético envolve o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a ligação do Gd^{3+} não. Mas, independente da região do CaSR em que se ligam, parece existir uma seletividade funcional aos agonistas do receptor, a qual seria uma característica de receptores da família GPCR (COLELLA et al., 2016). Esta especificidade determina que cada ligante tenha a habilidade de ativar preferencialmente determinada via de sinalização. Isto explicaria por que apenas o Gd^{3+} , e não a

neomicina, foi capaz de aumentar significativamente a atividade da H^+ -ATPase_v em células MDCK C11, mesmo que ambos liguem-se na mesma região do CaSR.

Neste estudo, foi investigado a via de sinalização envolvida na interação entre o CaSR e a proteína G_{q/11} (figura 3), a qual resulta na ativação das fosfolipases A e C (PLA e PLC). A ativação da PLC resulta no estímulo do inositol- 1,4,5 -tri-fosfato (IP₃) e do diacilglicerol (DAG). Ao inibir a PLA e a PLC com U-73122 5×10^{-8} M, a atividade da H^+ -ATPase_v foi reduzida se comparada à atividade apenas na presença de Gd³⁺ 300 μM (figura 15). Todavia, na presença deste inibidor houve um aumento, porém não significativo, da atividade da bomba quando comparada à basal, o que sugere que o incremento na atividade da H^+ -ATPase_v induzido pelo CaSR depende apenas em parte da ativação destas fosfolipases. A ativação do DAG resulta no estímulo da proteína quinase C (PKC). Ao estimular a PKC com PMA 10^{-9} M, ocorreu um aumento não significativo da atividade da H^+ -ATPase_v se comparada à basal, o que determina que o aumento da atividade da bomba depende somente em parte da ativação da PKC.

O estímulo do CaSR através do agonista específico R-568 provocou um incremento significativo na concentração intracelular de cálcio, sendo que este efeito não é dependente da liberação de cálcio dos estoques intracelulares. A utilização de tapsigargina 0,1 μM impediu a receptação de cálcio pelo retículo, o que levou a um aumento do Ca²⁺_i observado na figura 18 – A. Em seguida, foi adicionado às células o R-568 1 μM, o qual promoveu, da mesma forma como observado na figura 15, o aumento do cálcio intracelular, mesmo com a depleção do estoque de cálcio do retículo. De fato, além da liberação de cálcio do retículo via IP₃, o estímulo do CaSR pode promover a elevação da [Ca²⁺]_i de outras maneiras, como pela entrada de cálcio proveniente do meio extracelular (via canais ou transportadores de Ca²⁺) ou, até mesmo, pela combinação de ambos os mecanismos (VAN DE GRAAF, BINDELS e HOENDEROP, 2007). No experimento em que foi utilizado EGTA 2 mM para quelar o Ca²⁺_o (figura 19), o incremento no cálcio intracelular pelo agonista R-568 1μM não foi observado, indicando que este aumento ocorre preferencialmente via entrada de cálcio extracelular. Logo, mais estudos são necessários para determinar quais vias estão envolvidas no aumento da atividade da H^+ -ATPase_v promovido pelo estímulo do CaSR.

A hipercalciúria constitui um dos principais fatores de risco para o aparecimento de cálculos no trato urinário, a qual pode ser proveniente da elevada absorção de Ca^{2+} pelo intestino, pela elevada reabsorção de Ca^{2+} dos ossos, ou pela deficiência na reabsorção tubular do íon nos rins. Aproximadamente 80% dos cálculos encontrados em humanos são compostos de oxalato de cálcio com quantidades variáveis de fosfato de cálcio. No caso do fosfato de cálcio, sua supersaturação aumenta rapidamente quando o pH urinário aumenta de 6 para 7 unidades (LI et al., 2016). No túbulo distal, o TRPV 5 é a principal proteína na membrana apical responsável pela reabsorção do cálcio. Ratos *knockout* para o gene que codifica esta proteína desenvolvem hipercalciúria, predispondo-os a uma maior chance de formar cálculos. Entretanto, ao mesmo tempo, estes animais apresentam intensa poliúria e aumento da acidificação urinária, mostrando que o néfron aparenta ter algum mecanismo protetor para evitar a litíase (RENKEMA et al., 2009a). Realmente, em situação fisiológica, a inibição da reabsorção passiva de Ca^{2+} via ativação do CaSR no ramo espesso da Alça de Henle (figura 6 – B) oferece um maior risco ao aparecimento da nefrolitíase. Mas, como a ativação do CaSR no túbulo proximal e no ducto coletor leva a maior extrusão de prótons, este efeito acaba sendo contrabalanceado, uma vez que a acidificação da urina dificulta a formação de cálculos (RICCARDI e VALENTI, 2016). Portanto, a ativação do CaSR, ao incrementar a atividade da H^+ -ATPase, pode ser fundamental para prevenir a formação de cálculos no néfron.

6. CONCLUSÃO

- A ativação do CaSR pelos agonistas Gd^{3+} 300 μM , R-568 0,5 μM e R-568 1 μM promoveram um aumento significativo da atividade da H^+ -ATPase_v.
- Em relação às vias de sinalização envolvidas na ativação do CaSR em células MDCK C11, a PLA e a PLC e a PKC parecem intermediar somente em parte o aumento da atividade da H^+ -ATPase_v.
- A utilização do agonista não específico de CaSR, Gd^{3+} 300 μM , promoveu uma queda significativa na $[Ca^{2+}]_i$.
- O agonista específico de CaSR, R-568 1 μM , promoveu um aumento significativo na $[Ca^{2+}]_i$, o qual não depende da liberação dos estoques de cálcio intracelular, mas depende da presença de cálcio no meio extracelular.
- Como neste trabalho apenas a via de sinalização que envolve a participação de PLA, PLC e PKC foi investigada, constatou-se que estudos futuros são necessários para elucidar quais vias estão envolvidas no aumento da atividade da H^+ -ATPase_v pela ativação do CaSR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKUKHUN, A.; MUNOZ-ABRAHAM, A.S.; JUDEEBA, S.; GEIBEL, J.P. Molecular Aspects of the Calcium-Sensing Receptor and Calcium Homeostasis. Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00002-6>, 2017.

ARCIDIACONO, T.; MINGIONE, A.; MACRINA, L.; PIVARI, F.; SOLBATI, L.; VEZZOLI, G. Idiopathic Calcium Nephrolithiasis: A Review of Pathogenic Mechanisms in the Light of Genetic Studies. **Am J Nephrol.** 40: 499-506, 2014.

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(1 Pt 2): F129-35, 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: F1233-F1243, 2003.

BAI, M.; SUNITA, T.; KIFOR, O.; QUINN, S.J.; BROWN, E.M. Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 196(6): 2834-9, 1999.

BERNE e LEVY. **Fisiologia**, 6^a Ed., Editora Elsevier, 2009.

BERRIDGE, M.J. The versatility and complexity of calcium signalling. **Novartis Found Symp.** 239:52-64, 2001.

BOBULESCO, I.A.; MOE, O.W. Luminal Na(+)/H (+) exchange in the proximal tubule. **Pflugers Arch.** 458(1): 5-21, 2009.

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 et Biophysica Acta**, 735: 86-94, 1983.

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

BRAVO-SAGUA, R.; MATTAR, P.; DÍAZ, X.; LAVANDERO, S.; CIFUENTES, M. Calcium Sensing Receptor as a Novel Mediator of Adipose Tissue Dysfunction: Mechanisms and Potential Clinical Implications. **Front Physiol.** 7:395, 2016.

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 an extracellular Ca^{2+} - sensing receptor from bovine parathyroid. **Nature**, 366: 575-580, 1993.

CAPASSO, G.; GEIBEL, P.T.; DAMIANO, S.; JAEGER, P.; RICHARDS, W.G.; GEIBEL, J.P. The calcium sensing receptor modulates fluid reabsorption and acid secretion in the proximal tubule. **Kidney Int.** 84(2): 277-84, 2013.

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.; MILAN, D.; FERNANDEZ, R. Stimulation of calcium-sensing receptor increases biochemical H^+ -ATPase activity in mouse cortex and outer medullary regions. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 92: 181–188, 2014.

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.

CHANG, W.; PRATT, S.; CHEN, T.H.; NEMETH, E.; HUANG, Z.; SHOBACK, D. Coupling of calcium receptors to inositol phosphate and cyclic AMP generation in mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes and immunodetection of receptor protein by region-specific antipeptide antisera. **J Bone Miner Res.** 13:570-580, 1998.

CHANG, W.; SHOBACK, D. Extracellular Ca^{2+} -sensing receptors-an overview. **Cell Calcium.** 35(3): 183-96, 2004.

CHANG, W.; TU, C.; CHEN, T.; BIKLE, D.; SHOBACK, D. The Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Is a Critical Modulator of Skeletal Development. **Sci Signal.** 1(35), 2008.

COLELLA, M.; GERBINO, A.; HOFER, A.M. CURCI, S. Recent advances in understanding the extracellular calcium-sensing receptor. *F1000Res*; 5. pii: F1000 Faculty Rev-2535. eCollection, 2016

CONIGRAVE, A.D. The Calcium-Sensing Receptor and the Parathyroid: Past, Present, Future. **Front Physiol.** 7: 563, 2016.

DE GROOT, T.; BINDELS, R.J.; HOENDEROP, J.G. TRPV5: an ingeniously controlled calcium channel. **Kidney Int.** 74: 1241-1246, 2008.

DÍAZ-SOTO, G.; ROCHER, A.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C.; NÚÑEZ, L.; VILLALOBOS, C. The Calcium-Sensing Receptor in Health and Disease. **Int Rev Cell Mol Biol.** 327:321-369, 2016.

EATON e POOLER. **Fisiologia Renal de Vander**. 8ª edição, McGraw-Hill Education / Artmed, 2016.

ELLINGER, I. The Calcium-Sensing Receptor and the Reproductive System. **Front Physiol**. 7: 371, 2016.

FERNANDEZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G. Na⁺-independent proton secretion in MDCK-C11 cells. *Pflugers Arch*. 441(2-3): 287-293, 2000.

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

GANITKEVICH, V.; HASSE, V.; PFITZER, G. Ca²⁺ -dependent and Ca²⁺ independent regulation of smooth muscle contraction. **J. Muscle Res. Cell Motil**. 23: 47-52, 2002.

GEKLE, M.; WÜNSCH, S.; OBERLEITHNER, H.; SILBERNAGL, S. Characterization of two MDCK cells subtypes as model system to study principal cell and intercalated cell properties. **Pflügers Arch**, v. 428, p. 157-162, 1994.

GILBERT, T.; LECLERC, C.; MOREAU, M. Control of kidney development by calcium ions. **Biochimie**. 93: 2126–2131, 2011.

GONG, Y.; HIMMERKUS, N.; PLAIN, A.; BLEICH, M.; HOU, J. Epigenetic regulation of microRNAs controlling CLDN14 expression as a mechanism for renal calcium handling. **J Am Soc Nephrol**. 26(3): 663-76, 2015.

GORDON, A.M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiol Rev**. 80(2): 853-924, 2000.

GRACA, J.A.Z.; SCHEPELMANN, S.C.; BRENNAN, S.C.; REENS, J.; CHANG, W.; YAN, P.; TOKA, H.; RICCARDI, D.; PRICE, S.A. Comparative expression of the extracellular calcium-sensing receptor in the mouse, rat, and human kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**. 310(6): F518-33, 2016.

HARNETT, M.K.; CHEN, W.; SMITH, S.M. Calcium-sensing receptor: a high-affinity presynaptic target for aminoglycoside-induced weakness. **Neuropharmacology**. 57(5-6): 502–505, 2009.

HENDY, G. N.; GUARNIERI, V.; CANAFF, L. Calcium-sensing receptor and associated diseases. **Prog Mol Biol Trans Sci**. 89, 31–95, 2009.

HENDY, G.N.; CANAFF, L. Calcium-Sensing Receptor Gene: Regulation of Expression. **Front Physiol**. 7:394, 2016.

JOURET, F.; WU, J.; HULL, M.; RAJENDRAN, V.; MAYR, B.; SCHÖFL C.; GEIBEL, J.; CAPLAN, M. Activation of the Ca^{2+} -sensing receptor induces deposition of tight junction components to the epithelial cell plasma membrane. **J Cell Sci.** 126(22): 5132–5142, 2013.

KIFOR, O.; DIAZ, R.; BUTTERS, R.; BROWN, E.M. The Ca^{2+} - sensing receptor (CaSR) activates phospholipase C, A_2 and D in bovine parathyroid and CaSR-transfected , human embryonic kidney (HEK 293) cells. **J Bone Miner Res.** 12: 715-725, 1997.

KIM, J.Y.; HO, H.; KIM, N.; LIU, J.; TU, C.; YENARI, M.A.; CHANG, W. Calcium-sensing receptor (CaSR) as a novel target for ischemic neuroprotection. **Annals of Clinical and Translational Neurology.** 1(11): 851–866, 2014.

LANG, F.; PAULMICH, M. Properties and regulation of ions channels in MDCK cells. **Kidney Int**, v. 48, p. 1200-1205, 1995.

LEE, J.W.; PARK, H.A.; KNOW, O.K.; PARJ, J.W.; LEE, G.; LEE, H.J.; LEE, S.J.; OH, S.R.; AHN, K.S. NPS 2143, a selective calcium-sensing receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. **Mol Immunol.** 90:150-157, 2017.

LEITE-DELLOVA, D.C.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H^+ -ATPase in proximal S3 segments. **Am J Physiol Renal Physiol.** 300(3): F682-91, 2001.

LETZ, S.; HAAG, C.; SCHULZE, E.; FRANK-RAUE, K.; RAUE, F.; HOFNER, B.; MAYR, B.; SCHÖFL, C. Amino Alcohol- (NPS-2143) and Quinazolinone-Derived Calcilytics (ATF936 and AXT914) Differentially Mitigate Excessive Signalling of Calcium-Sensing Receptor Mutants Causing Bartter Syndrome Type 5 and Autosomal Dominant Hypocalcemia. **PLoS One.** 9(12): e115178, 2014.

LI, X.; MA, J.; SHI, W.; SU, Y.; FU, X.; YANG, Y.; LU, J.; YUE, Z. Calcium Oxalate Induces Renal Injury through Calcium-Sensing Receptor. **Oxid Med Cell Longev.** 2016: 5203801, 2016.

LIU, A.P.; SEI, Y.; ZHAO, X.; FENG, J.; LU, X.; THOMAS, C.; PECHHOLD, S.; RAYBOULD, H.E.; WANK, S.A. The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 300(4): G538–G546, 2011.

MCLARNON, S.; HOLDEN, D.; WARD, D.; JONES, M.; ELLIOTT, A.; RICCARDI, D. Aminoglycoside antibiotics induce pHsensitive activation of the calciumsensing 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.

MANKO, D.; ZDZIENNICKA, A.; JANCZUK. Composition of Surface Layer at the Water–Air Interface and Micelles of Triton X-100 + Rhamnolipid Mixtures. **J Solution Chem.** 46: 1251–1271, 2017.

MELLO-AIRES, M. Fisiologia, 4ª ed., Editora Guanabara - Koogan, 2013.

MILLER, D.J. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. **J Physiol.** 555(Pt 3): 585–587, 2004.

MOLOSTVOV, G.; HIEMSTRA, T.F.; FLETCHERS.; BLAND, R.; ZEHNDER, D. Arterial Expression of the Calcium-Sensing Receptor Is Maintained by Physiological Pulsation and Protects against Calcification. **PLoS ONE** 10(10): e0138833, 2015.

MURAKAMI, Y.; FURUYA, Y.; WADA, M.; SAKAI, T.; NEGANO, N. Pharmacological properties of the calcimimetic compound NPS R-568 in vitro and in vivo. **Clin Exp Nephrol.** 4: 293-299, 2000.

OH, J.; BECKMANN, J.; BLOCH, J.; HETTGEN, V.; MUELLER, J.; LI, L.; HOEMME, M.; GROSS, M.; PENZEL, R.; MUNDEL, P.; SCHAEFER, F.; SCHMITT, C.P. Stimulation of the calcium-sensing receptor stabilizes the podocyte cytoskeleton, improves cell survival, and reduces toxin-induced glomerulosclerosis. **Kidney International.** 80: 483–492, 2011.

OWEN, L.S.; CHENG, S.X.; GE, Y.; SAHAY, B.; MOHAMADZADEH, M. The Role of the Calcium-Sensing Receptor in Gastrointestinal Inflammation. **Semin Cell Dev Biol.** 49: 44–51, 2016.

PHILLIPS, C.G.; HARNETT, M.T.; CHEN, W.; SMITH, S.M. Calcium-sensing receptor activation depresses synaptic transmission. **J Neurosci.** 28(46): 12062–12070, 2008.

QUIROS Y, VICENTE-VICENTE L, MORALES AI, LÓPEZ-NOVOA JM, LÓPEZ-HERNÁNDEZ FJ. An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. **Toxicol Sci.** 119(2): 245-56, 2011.

RENKEMA K.Y.; LEE, K.; TOPALA, C.N.; GOOSSENS, M.; HOUILLIER, P.; BINDELS, R.J.; HOENDEROP, J.G. TRPV5 gene polymorphisms in renal hypercalciuria. **Nephrol Dial Transplant.** 24(6): 1919-24, 2009a.

RENKEMA, K.Y.; 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.** 20(8): 1705-13, 2009b.

RICCARDI, D.; BRENNAN, S.C.; CHANG, W. The extracellular calcium-sensing receptor, CaSR, in fetal development. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.** 27(3): 443–453, 2013.

RICCARDI, D.; BROWN, E.M. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.** 298(3): F485-99, 2010.

RICCARDI, D.; VALENTI, G. Localization and function of the renal calcium-sensing receptor. **Nat Rev Nephrol.** 12(7): 414-25, 2016.

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

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.

SANDS, J.M.; NARUSE, M.; BAUM, M.; JO, I.; HEBERT, S.C.; BROWN, E.M.; HARRIS, H.W. Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. **J Clin Invest.** 99(6): 1399-405, 1997.

SANTOS, P. **Influência do receptor sensível a cálcio extracelular (CaSR) sobre a atividade da H^+ -ATPase vacuolar em células do túbulo proximal.** Dissertação (mestrado em Fisiologia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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.

SQUIRES PE, JONES PM, YOUNIS MY, HILLS CE. The calcium-sensing receptor and β -cell function. **Vitam Horm.** 95: 249-67, 2014.

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

VAN de GRAAF. S.F.J.; BINDELS, R.J.M.; HOENDEROP, J.G.J. Physiology of epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** p: 77 – 160, 2007.

VIZARD, T.N.; O'KEEFFE, G.H.; GUTIERREZ, H.; KOS, C.H.; RICCARDI, D.; DAVIES, A.M. Regulation of axonal and dendritic growth by the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR). **Nat Neurosci.** 11(3): 285–291, 2008.

TAMA, G.; DI MESE, A.; RANIERI, M.; SVELTO, M.; PISOT, R.; BILANCIO, G.; CAVALLO, P.; DE SANTO, N.G.; CIRILLO, M.; VALENTI, G. A decrease in aquaporin 2 excretion is associated with bed rest induced high calciuria. **J Trans Med.** 12: 133, 2014.

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

TOPALA, C.N.; SCHOEBER, J.P.; SEARCHFIELD, L.E.; RICCARDI, D.; HOENDEROP, J.G.; BINDELS, R.J. Activation of the Ca²⁺-sensing receptor stimulates the activity of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. **Cell Calcium.** 45(4): 331-9, 2009.

UN SIL JEON, M.D. Kidney and Calcium Homeostasis. **Electrolyte Blood Press.** 6(2): 68–76, 2008.

WAGNER, C.A.; FINBERG, K.E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; GEIBEL, J.P. Renal vacuolar H⁺-ATPase. **Physiol Rev.** 84(4):1263-314, 2004.

WANG, H.; LIU, X.; HAN, G.; WANG, Z.; LI, X.; JIANG, Z.; JIANG, C. LPS induces cardiomyocyte injury through calcium-sensing receptor. **Mol Cell Biochem.** 379:153–159, 2013.

WU, B.; WANG, O.; JIANG, Y.; LI, M.; XING, X.; XIA, W. Atypical skeletal manifestations of rickets in a familial hypocalciuric hypercalcemia patient. **Bone Research.** 5: 17001, 2017.

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

YAROVA, P.L.; STEWART, A.L.; SATHISH, V.; BRITT, R.D. JR.; THOMPSON, M.A.; LOWE, A.P.; FREEMAN, M.; ARAVAMUDAN, B.; KITA, H.; BRENNAN, S.C.; SCHEPELMANN, M.; DAVIES T.; YUNG, S.; CHOLISOH, Z.; KIDD, E.J.; FORD, W.R.; BROADLEY, K.J.; RIETDORF, K.; CHANG, W.; KHAYAT, M.E.B.; WARD, D.T.; CORRIGAN, C.J.; WARD, J.P.T.; KEMP, P.J.; PABELICK, C.M.; PRAKASH, Y.S.; RICCARDI, D. Calcium-sensing receptor antagonists abrogate airway hyperresponsiveness and inflammation in allergic asthma. **Sci Transl Med.** 7(284): 284ra60, 2015.

ZHANG, C.; MILLER, C.L.; GORKHALI, R.; ZOU, J.; HUANG, K.; BROWN, E.M.; YANG, J.J. Molecular Basis of the Extracellular Ligands Mediated Signaling by the Calcium Sensing Receptor. **Front Physiol.** 7: 441, 2016.