

HORACIO JAVIER NOVAIRA

“MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO CANAL DE SÓDIO CNG-A3 E DO CANAL DE CLORETO CFTR NOS EPITÉLIOS RENAIIS E INTESTINAIS DE RATOS POR HORMÔNIOS RELACIONADOS COM A REGULAÇÃO DO VOLUME DO FLUIDO EXTRACELULAR”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2 0 0 6

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Novaria, Horacio Javier

Modulação da expressão gênica do canal de sódio CNG-A3 e do canal de cloreto CFTR nos epitélios renais e intestinais de ratos por hormônios relacionados com a regulação do volume do fluido extracelular / Horacio Javier

Novaira

Rio de Janeiro: UFRJ; IBCCF; 2006

xiii; 111 fls;

Orientador: Marcelo Marcos Morales

Tese: Doutorado – UFRJ / IBCCF / Programa de Ciências Biológicas (Fisiologia), 2006

Referência Bibliográfica: f. 93-108

1. Volume do fluido extracelular
2. Canais iônicos
3. CFTR
4. CNG-A3
5. Fator Atrial Natriurético
6. Aldosterona

I. Morales, Marcelo Marcos II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

III. Título

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO CANAL DE SÓDIO
CNG-A3 E DO CANAL DE CLORETO CFTR NOS EPITÉLIOS RENAIIS E
INTESTINAIS DE RATOS POR HORMÔNIOS RELACIONADOS COM A
REGULAÇÃO DO VOLUME DO FLUIDO EXTRACELULAR

HORACIO JAVIER NOVAIRA

Tese De Doutorado Apresentada Ao Programa De Pós-Graduação Em Ciências
Biológicas (Fisiologia), Instituto De Biofísica Carlos Chagas Filho, Da Universidade
Federal Do Rio De Janeiro, Como Parte Dos Requisitos Necessários À Obtenção Do
Título De Doutor Em Ciências Biológicas (Fisiologia)

Aprovada por:

Prof^a. TÂNIA MARIA ORTIGA CARVALHO
Prof^a. Adjunta, IBCCF^o, UFRJ

Prof^a. JENNIFER LOWE
Prof^a. Adjunta, IBCCF^o, UFRJ

Prof^a. PATRÍCIA CRISTINA LISBÔA DA SILVA
Prof^a. Professor Visitante, UERJ

Orientador: Prof. MARCELO MARCOS MORALES
Prof. Adjunto, IBCCF^o, UFRJ

Revisor: Prof^a. CARMEM CABANELAS PAZOS DE MOURA
Prof^a. Adjunta, IBCCF^o, UFRJ

Rio de Janeiro
Junho/2006

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Financiador de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano,
mas sem ele, o oceano seria menor...”**

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o carinho e compreensão, pelo apoio incondicional moral e econômico. Sem eles não poderia ter chegado até aqui.

Ao meu orientador, Marcelo Morales, pela oportunidade que me deu, conselhos, conhecimentos e por viabilizar a realização de cada um dos experimentos incluídos nesta tese.

Aos colaboradores desta tese e dos artigos publicados, Prof^a Regina Goldenberg, Prof^a Tânia Ortiga-Carvalho, Débora Ornellas, Jackson Menezes e Bruno Botelho, que participaram da realização direta dos experimentos, sem eles nunca poderia ter concluído estes trabalhos.

A Débora, minha colega, amiga, quem guiou meus primeiros passos aqui no Brasil, agradeço pela grande ajuda na realização desta tese. Obrigado!

A meus queridos colegas de trabalho e amigos, Carol, Roberta, Felipe, Carolzinha, Sabrina, Graziela, Vera, Maria Cristina e André por toda a colaboração na realização deste trabalho e por todo o carinho, paciência, respeito, saídas e viagens...

Aos pais dos meus colegas do laboratório que me ajudaram no início difícil do meu doutorado, em especial a Dona Vilma. Muito Obrigado.

Ao Fabio, Cirene e a Dida, por abrirem as portas do coração pra mim.

Ao Leandro, meu amigo, pelo apoio, experiências de vida e exemplo de pessoa do bem.

Ao Gildo, Regina, Juliana, Telmo e ao Tom especialmente por fazerem me sentir mais um membro da família.

A Edna, por todo o apoio, pela sua alegria e positividade.

RESUMO

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO CANAL DE SÓDIO CNG-A3 E DO CANAL DE CLORETO CFTR NOS EPITÉLIOS RENAIIS E INTESTINAIS DE RATOS POR HORMÔNIOS RELACIONADOS COM A REGULAÇÃO DO VOLUME DO FLUIDO EXTRACELULAR

Horacio Javier Novaira

Orientador: Marcelo Marcos Morales

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

A distribuição do RNAm do canal de sódio CNG-A3 e a regulação da sua expressão foi avaliada em ratos Wistar submetidos a dietas com diferentes concentrações de NaCl, tratados com furosemida e, adrenalectomizados repostos ou não com aldosterona. Os RNAm foram avaliados por RPA e/ou RT-PCR e a proteína por *western blot*. O RNAm do CNG-A3 está expresso em todos os segmentos dissecados do néfron de rato, exceto em alça fina de Henle. O RNAm, bem como a proteína CNG-A3 estão diminuídos (64% e 49%, respectivamente) em rim total de ratos tratados com dieta hipersódica, comparados com animais tratados com dieta hipossódica. Essas variações foram secundárias à diminuição do RNAm na porção cortical espessa da alça de Henle (cTAL, 49%) e ducto coletor cortical (CCD, 37%). A expressão do RNAm do CNG-A3 também diminui nos segmentos cTAL (25%) e CCD (58%) de ratos adrenalectomizados voltando aos valores normais após a reposição da aldosterona.

A participação do fator atrial natriurético (FAN) na regulação da expressão do canal de cloreto CFTR em cólon proximal foi avaliada em ratos submetidos a expansão do VFEC e a infusão (i.v.) de FAN sintético, mostrando aumento da expressão do RNAm do CFTR (60% e 50%, respectivamente). Em células CaCo-2 o FAN (10^{-9} M) aumentou a expressão do RNAm (74%) e a proteína CFTR (4-5 vezes). O promotor do CFTR teve uma moderada resposta ao FAN.

Concluimos que a expressão do canal CNG-A3 em epitélio renal e do CFTR no intestino, são estimuladas pela aldosterona e pelo FAN, respectivamente.

Palavras-chave: Aldosterona; FAN; CNG-A3; CFTR; Canal de sódio; Canal de cloreto; Néfron; Trato gastrointestinal; Fibrose Cística; CaCo-2; RNAm; RPA; RT-PCR.

Rio de Janeiro
Junho/2006

ABSTRACT

GENE EXPRESSION MODULATION OF CNG-A3 SODIUM CHANNEL AND CFTR CHLORIDE CHANNEL IN RENAL AND INTESTINAL EPITHELIA OF RATS BY HORMONES RELATED TO EXTRACELLULAR FLUID VOLUME REGULATION.

Horacio Javier Novaira

Orientador: Marcelo Marcos Morales

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

The distribution of CNG-A3 mRNA and the regulation of its expression was evaluated in Wistar rats subjected to low and high- Na^+ diets, furosemide treated and, adrenalectomized with or without aldosterone replacement. To evaluate the mRNA expression it was performed RNase protection assay (RPA) and/or RT-PCR. To analyze the protein expression, the western blot was performed. In all dissected nephron segments the CNG-A3 mRNA was detected, except in the thin segments of Henle's loop. The mRNA, as well as the CNG-A3 protein, were reduced (64% and 49%, respectively) in the whole kidney of the rats treated with high- Na^+ diet, compared with the rats treated with low- Na^+ diet. Those variations were secondary to mRNA reduction in cortical thick ascending limbs (cTAL, 49%) and cortical collecting ducts (CCD, 37%). The CNG-A3 mRNA expression was also reduced in cTAL (25%) and CCD (58%) segments of adrenalectomized rats. It was restored to the normal levels after aldosterone replacement.

The role of atrial natriuretic peptide (ANP) in the regulation of CFTR chloride channel mRNA was evaluated in rats proximal colon subjected to extracellular volume expansion and the infusion (i.v.) of synthetic ANP. It was observed an increase in the proximal colon CFTR mRNA expression (60% and 50%, respectively). In CaCo-2 cells, the ANP (10^{-9} M) enhanced the CFTR mRNA (74%) and protein (4-5 times) expressions. The CFTR promoter was stimulated by ANP.

We conclude that the renal epithelia CNG-A3 channel and intestinal CFTR expressions are stimulated by aldosterone and ANP, respectively.

Key-words: Aldosterone; ANP; CNG-A3; CFTR; Sodium channel; Chloride channel; Nephron; Gastrointestinal tract; Fibrosis Cystic; CaCo-2; mRNA; RPA; RT-PCR.

Rio de Janeiro

June/2006

SUMÁRIO

Ficha catalográfica.....	ii
Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Sumário.....	ix
Índice de Figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
I – INTRODUÇÃO.....	14
I.1 - Regulação do volume do fluido extracelular.....	15
I.2 - Trato gastrintestinal e o canal de cloreto CFTR.....	18
I.2.1 - Sistema Digestivo: Absorção e secreção intestinal de água e eletrólitos.....	18
I.2.1.a - Mecanismos celulares para a absorção de água no intestino.....	20
I.2.1.b - Processos celulares de absorção e secreção de eletrólitos no cólon.....	22
I.2.2 - O canal de cloreto CFTR.....	25
I.2.2.a - CFTR como regulador de outras condutâncias.....	32
I.3 - Sistema Renal e o canal de sódio CNG-A3.....	34
I.3.1 - Rim: Reabsorção e secreção renal de água e eletrólitos	34
I.3.1.a - Transporte de sódio e água ao longo do néfron	34
I.3.2 - O canal de sódio CNG-A3.....	40
I.4 - Sistema endócrino: O papel de diferentes hormônios na regulação do volume do fluido extracelular.....	43

I.4.1 - Hormônio Antidiurético.....	43
I.4.2 - Sistema Renina-Angiostensina.....	44
I.4.3 - Aldosterona.....	45
I.4.4 - Fator Atrial Natriurético	47
II – OBJETIVOS.....	49
II.1 - Trabalho 1.....	50
II.2 - Trabalho 2.....	51
III - TRABALHOS PUBLICADOS.....	52
IV - DISCUSSÃO TRABALHO 1	76
V - DISCUSSÃO TRABALHO 2.....	83
VI - CONCLUSÕES.....	91
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
VIII – ANEXOS.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Volumes aproximados de fluidos que atingem o trato gastrointestinal.....	19
Figura 2 – Absorção intestinal de água	20
Figura 3 – Representação esquemática da absorção de íons no cólon	23
Figura 4 – Representação esquemática da secreção intestinal de Cl ⁻	25
Figura 5 – Esquema demonstrativo do canal de cloreto CFTR.....	26
Figura 6 – Mecanismo de abertura do canal de cloreto CFTR.....	30
Figura 7 – Possíveis interações do CFTR com outros canais.....	33
Figura 8 – Diagrama de estrutura de néfron.....	35
Figura 9 – Mecanismos de transporte de sódio no segmento inicial do túbulo proximal.....	36
Figura 10 – Mecanismos de transporte de sódio e água na parte final do túbulo proximal	37
Figura 11 – Mecanismos de transporte no ramo grosso ascendente da alça de Henle.....	38
Figura 12 – Esquema dos mecanismos de transporte nas células principais do túbulo distal e duto coletor.....	39
Figura 13 – Sub-unidades e estequiometria dois canais CNG.....	41
Figura 14 (anexos) – Células CaCo-2 tratadas com diferentes concentrações de aldosterona, vasopressina e FAN	111

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – família de proteínas que ligam ATP (*ATP-binding cassette*)

ADP – adenosina difosfato

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ATP – adenosina trifosfato

CaCo-2 – células de adenocarcinoma colônico humano

CFTR – regulador transmembranar da fibrose cística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

CLC-2 – canal de cloreto – 2 (*chloride channel – 2*)

CNG – canal dependente de GMPc (*cyclic nucleotide-gated channel*)

CNG-A3 – canal dependente de GMPc isoforma A3 (CNG-A3)

cTAL – porção cortical espessa ascendente da alça de Henle

DCC – ducto coletor cortical

ENaC – canal de Na⁺ epitelial

FAN – Fator atrial natriurético

FEC – fluido extracelular

FC – fibrose cística

GI – gastrintestinal

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

HAD – hormônio antidiurético, vasopressina

IMCD – ducto coletor medular interno

MBL – membrana basolateral

ML – membrana luminal

NBD – domínio de ligação de nucleotídeo

NKCC – co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$

NPR-(A B ou C) – receptor de peptídeo natriurético tipo A, B e C

ORCC – canal de cloreto retificador de corrente para fora (*outwardly rectifying chloride channel*)

PKA – proteína quinase dependente de AMPc

PKC – proteína quinase dependente de Ca^{+2}

PKG – proteína quinase dependente de GMPc

RNAm – RNA mensageiro

RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

TMD – domínio transmembrana

VFEC – volume do fluido extracelular

I.1 - Regulação do volume do fluido extracelular

Á água é o solvente biológico por excelência, e portanto, constitui a maior parte, em peso, de praticamente todas as estruturas biológicas, a exceção das estruturas esqueléticas. Assim, cerca de 45 a 75% do peso corporal humano são constituídos de água, dependendo do teor de gordura do indivíduo. A água está subdividida em uma série de compartimentos separados por membranas celulares ou epiteliais que são, em grande parte, responsáveis pelas diferentes características dos compartimentos que limitam (Holliday, 1999).

Desta forma, o *volume extracelular* corresponde à água do organismo que se encontra fora das células (aproximadamente 20% do peso corporal) e inclui o compartimento do fluido intersticial (que corresponde de 15 a 16% do peso corporal) e também à água plasmática presente no compartimento vascular (de 4 a 5% do peso corpóreo) (Holliday, 1999). Pertencem ainda ao espaço extracelular os compartimentos chamados transcelulares que são delimitados por epitélios, tais os que revestem as cavidades pleurais e peritoneal bem como as mucosas digestivas. O volume destes fluidos, de fato, é pequeno e corresponde de 1 a 3% do peso corporal sendo que a sua constituição é, de maneira geral, semelhante ao dos outros compartimentos do fluido extracelular (Brochner-Mortensen, 1982; Holliday, 1999).

A composição do meio extracelular é diferente comparada a do meio intracelular. O fluido extracelular (FEC) é constituído predominantemente de sódio (Na^+) 140 mEq/l e cloreto (Cl^-) 100 mEq/l, contendo, diferentemente do meio intracelular, uma concentração baixa de potássio (K^+). O segundo ânion em abundância no FEC é o bicarbonato (HCO_3^-), presente na concentração de cerca de 25 mEq/l (Macknight & Leaf, 1977). Desta forma, o volume do FEC (VFEC) é,

praticamente determinado pelo balanço entre a ingestão e a excreção renal de NaCl por serem os íons osmoticamente ativos mais abundantes nesse meio.

Os mecanismos renais e intestinais de transporte de NaCl participam da manutenção do FEC por serem os determinantes, respectivamente, da excreção e absorção destes íons. Esses dois órgãos, portanto, constituem os reguladores primários do volume extracelular (Cowley & Roman, 1996). Alterações na ingestão de NaCl ou dos mecanismos que levam à retenção desse sal constituem os processos responsáveis pela expansão do VFEC podendo estar relacionados com a gênese da hipertensão, entre outras patologias. A hipertensão pode levar ao acometimento de vários órgãos e ao desenvolvimento de doenças tais como as nefropatias, acidentes vasculares cerebrais e infarto do miocárdio. Essas doenças apresentam alta mortalidade e constituem causa de incapacidade física e laboral na população economicamente ativa, com grande impacto social (Heagerty & cols., 1993; Brown & Haydock, 2000).

Dessa maneira, o organismo depende de um grande número de processos regulatórios para manter o equilíbrio do seu meio interno (líquido extracelular), o que inclui o controle da pressão arterial sistêmica, do volume extra e intracelular, da osmolaridade, do pH, das concentrações iônicas, etc. Estas propriedades do meio interno devem ser mantidas dentro de faixas estreitas de variação para permitir a adequada função celular. Estas propriedades, em seu conjunto, são denominadas de homeostase, e seu estudo é um dos principais objetivos da Fisiologia.

O *sistema digestivo* mantém a constituição do meio interno através da ingestão, e, posteriormente, a absorção tanto de nutrientes (hidratos de carbono, proteínas e lipídeos), quanto de água e íons (Greger, 2000). Da mesma forma, o *rim*, participa da homeostase através da manutenção das concentrações plasmáticas de

água e eletrólitos, mantendo, principalmente, o volume, o pH e a osmolaridade do FEC (Yucha & Keen, 1996; Yucha, 2004). O *sistema endócrino* contribui para a manutenção do FEC, através das ações de vários hormônios, sendo as ações mais conhecidas e estudadas as dos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Johnston & cols., 1993; Agarwal & Mirshahi, 1999), a do fator atrial natriurético (FAN) (Ballermann & Zeidel, 1992), e o da vasopressina (HAD) (Bankir & cols., 1989).

Apesar de muitos estudos, os papéis de vários transportadores iônicos, tanto ao longo do néfron quanto no epitélio intestinal, não estão totalmente esclarecidos. Muito menos são conhecidas as suas participações no transporte regulado por hormônios e os mecanismos moleculares envolvidos.

É evidente, no entanto, que muitos fatores endócrinos e parácrinos podem modular a excreção urinária e a absorção intestinal de NaCl através da ação sobre os transportadores iônicos presentes tanto no epitélio renal quanto no intestinal (Kunzelmann & Mall, 2002). Nesse sentido, vários processos patológicos, principalmente os que alteram a excreção renal de NaCl, conduzem aos desequilíbrios eletrolíticos (Kunzelmann & Mall, 2002). Alterações dos níveis circulantes e locais de substâncias natriuréticas (FAN, bradicinina, adenosina) e antinatriuréticas (angiotensina, HAD, aldosterona, hormônio tireóideos) estão associadas a mudanças do volume extracelular e a modificações na atividade e na expressão dos transportadores dos íons acima mencionados (Repke & cols., 1995; Morales & cols., 1996).

Muito embora a ação destes fatores (natriuréticos e antinatriuréticos) sobre a absorção de Na⁺ no epitélio intestinal e ao longo do néfron sejam mecanismos muito estudados, o Cl⁻ é o principal ânion transportado com o Na⁺ tanto pela via

transcelular quanto pela paracelular. Assim, pela via transcelular, dentre os vários transportadores localizados nas membranas plasmáticas celulares, destacamos os canais que representam uma importante via de transporte e que podem ser controlados por interferência de hormônios e seus mediadores. Os canais iônicos são geralmente seletivos e transportam íons a favor de seu gradiente eletro-químico (Kunzelmann & Mall, 2002).

Nesta tese, destacaremos dois canais iônicos: a) o de cloreto denominado *cystic fibrosis transmembrane regulator* (CFTR) e sua expressão no epitélio colônico; e b) o canal catiônico *cyclic nucleotide-gated channel* isoforma A3 (CNG-A3), um canal dependente de GMP cíclico, no rim. Esses canais, apesar de estarem abundantemente expressos no epitélio intestinal e nos rins, respectivamente, não possuem seus papéis fisiológicos definidos nesses epitélios.

I.2 – Trato gastrintestinal e o canal de cloreto CFTR

I.2.1 – Sistema Digestivo: Absorção e secreção intestinal de água e eletrólitos

Diariamente chegam ao intestino delgado de 7 a 10 L de água. Do volume total deste fluido, dois litros derivam dos alimentos e a água ingerida, sendo estes acompanhados por uma quantidade de 5 a 10 g de NaCl por dia. Os 7 L restantes de fluidos derivam das secreções do trato gastrintestinal (GI) (secreções gástricas, pancreática, biliar, salivar e, secreções do intestino delgado), contendo 25 a 30 g de NaCl, o que representa cerca de 20% do volume de água corpórea total e 15% do conteúdo total de NaCl do organismo, respectivamente. Fica, assim, fácil entender porque distúrbios da absorção intestinal de água e eletrólitos induzem grandes alterações do volume extracelular e de sua tonicidade, conduzindo a rápida

desidratação e desequilíbrios eletrolíticos (Johnson, 1997; Sanioto, 1999; Greger, 2000). O esquema da figura 1 fornece informações quantitativas sobre o volume de água que atingem o trato GI diariamente pelas vias antes mencionadas, bem como estão lá representados, quantitativamente, os volumes de água absorvidos por dia no intestino delgado e no cólon. O volume de fluido excretado pelas fezes está também representado no esquema.

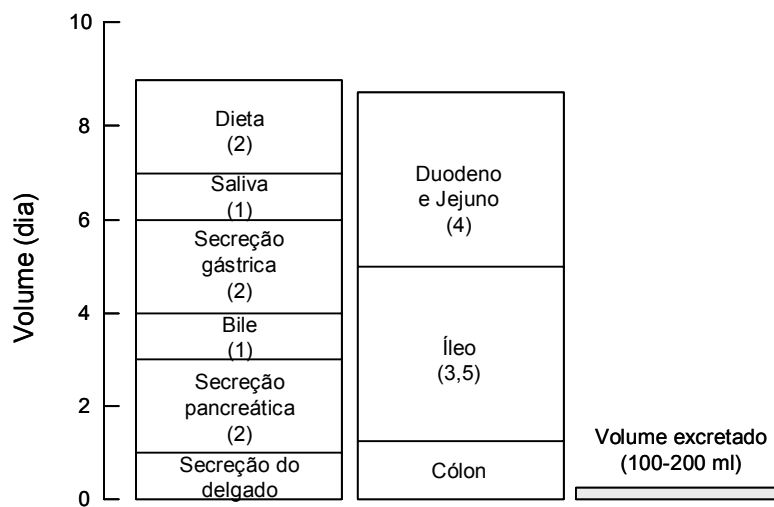


Figura 1: Volumes aproximados de fluidos que atingem o trato gastrointestinal e volume de fluido absorvido e excretado em litros por dia (Sanioto, 1999)

Dos 7 a 10 L de água que chegam ao trato GI por dia, o delgado absorve cerca de 80 a 90% do total. Deste montante, chegam ao cólon cerca de 0,5 a 1,5 L sendo excretados por volta de 100 ml de água nas fezes.

Calcula-se que a capacidade absorptiva do cólon é de 4 a 6 L/dia, e desta forma, o intestino grosso apresenta uma grande reserva funcional absorptiva no que diz respeito aos volumes de fluido. Este fato tem grande significado fisiopatológico pois protege o organismo contra perdas excessivas de água e eletrólitos, principalmente em condições onde as funções do intestino delgado estão comprometidas (Johnson, 1997; Sanioto, 1999; Greger, 2000).

I.2.1.a - Mecanismos celulares para a absorção de água no intestino

O movimento de água que atravessa o epitélio do espaço intercelular para o lúmen (secreção) é menor que o movimento de água do lúmen para o espaço intercelular (absorção), resultando, desta forma, em absorção de água. A absorção de água no intestino, tanto no delgado como no grosso, é secundária e dependente totalmente da absorção de solutos. Como é bem sabido, a água é atraída pelas partículas de solutos (nos fluidos corporais o Na^+ é o principal cátion e o Cl^- o principal ânion) em um movimento denominado força osmótica. Desta forma, a absorção resulta de um movimento passivo de água através da membrana epitelial em resposta a pressão osmótica (Johnson, 1997) (Fig. 2).

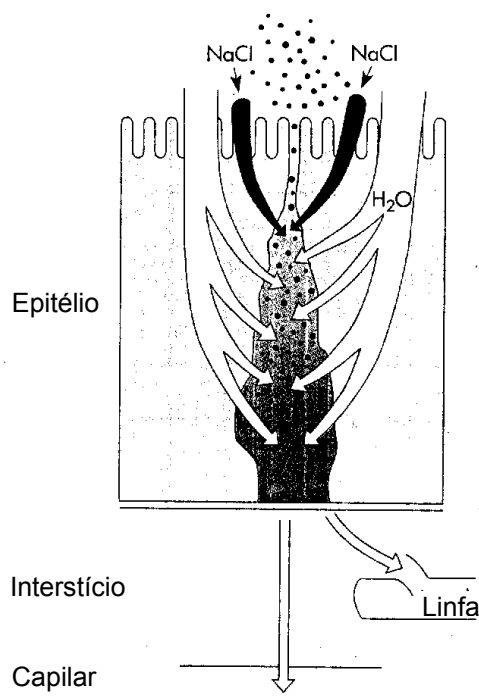


Figura 2: Absorção intestinal de água conforme a hipótese do gradiente osmótico (Johnson, 1997)

A composição iônica do fluido luminal pode variar muito ao longo do intestino. No entanto, o fluido luminal na porção inicial geralmente permanece isotônico em

relação ao plasma por causa da relativa permeabilidade à água da membrana intestinal neste segmento (Johnson, 1997).

O epitélio do trato intestinal apresenta células assimétricas mantidas coesas em monocamadas. Estas células apresentam diferenças estruturais e funcionais entre suas membranas luminais (ML) e basolaterais (MBL) sendo que essas diferenças se referem principalmente à distribuição dos canais e outros transportadores iônicos ativos e passivos que são proteínas transportadoras associadas às bicamadas lipídicas. Desta forma, ocorre uma assimetria entre as permeabilidades das duas membranas (ML e MBL).

Quando se estuda o transporte trans-epitelial devemos considerar duas vias possíveis: a transcelular (através das duas membranas celulares, ML e MBL) e a inter- ou paracelular (através das *tight-junctions* ou zonas de oclusão dos complexos juncionais intercelulares, que são regiões de fusão das membranas de duas células adjacentes).

Vale ressaltar que uma característica comum entre epitélios transportadores é a localização do transportador ativo, a Na^+/K^+ -ATPase, que está expressa sempre na MBL dos principais epitélios. Essa bomba é a principal força motriz de todo transporte de água e solutos tanto nos rins quanto no trato intestinal.

No *intestino delgado*, os íons, principalmente Na^+ e Cl^- , transportados por via transcelular, depositam-se nas regiões intercelulares e subepiteliais delimitadas pela MBL do epitélio, estabelecendo um gradiente osmótico entre estes espaços e a luz intestinal de apenas alguns mOsm/l, suficiente para mover água através do epitélio. Nesta porção do intestino, as vias transcelulares (através de canais constitutivos de água) e intercelulares (*tight-junctions*) são altamente permeáveis à água, permitindo que esses pequenos gradientes osmóticos formados sejam suficientes para

promover um fluxo absorvivo de água e de solutos em proporções isotônicas (epitélio *leaky*). Assim, a osmolaridade do fluido absorvido não difere da do plasma (Chang, 1996).

No *cólon*, por sua vez, a situação é bastante diferente. Como em seu epitélio as *tight-junctions* e os espaços intercelulares são menos permeáveis (epitélio *tight*), e pelo fato da permeabilidade à água da ML através de canais ser pequena, o fluxo transepitelial de água ocorre em menor proporção que o do soluto, e, assim, o fluido absorvido é hipertônico em relação ao plasma. Esse fato torna o compartimento luminal hipotônico (Chang, 1996).

Também é sabido que, a absorção de água e de íons no *cólon* ocorre predominantemente na sua metade proximal, ou seja, no *cólon* ascendente e parte do transversal (Sanioto, 1999). O *cólon* descendente funciona principalmente como um segmento de armazenamento, assim, os materiais orgânicos não digeridos e não absorvidos no intestino delgado chegam ao *cólon* sendo armazenados na porção final deste, constituindo o material fecal que será excretado em resposta ao reflexo da defecação (Sanioto, 1999).

I.2.1.b - Processos celulares de absorção e secreção de eletrólitos no cólon

Todas as regiões do *cólon* absorvem e/ou secretam Na^+ e Cl^- , mas como dito anteriormente, esses processos ocorrem predominantemente na sua metade proximal. A absorção e a secreção de íons são realizadas por diferentes mecanismos, porém, não foi determinada a existência de células específicas para uma ou outra função. A secreção de eletrólitos ocorre paralelamente à absorção em um processo mantido em equilíbrio para evitar a gênese de diarreia secretora ou

instalação de perdas importantes de eletrólitos. Nesta porção do cólon (cólon ascendente e parte do transversal) o gradiente iônico intracelular é originado pela bomba Na^+/K^+ , presente na MBL. Seu funcionamento diminui as concentrações intracelulares de Na^+ em troca de um aumento das concentrações intracelulares de K^+ . Assim, é gerada a condição para que ocorra a absorção de Na^+ , não só pelos clássicos canais sensíveis ao amiloride, mas também por transportadores eletroneutros (contra-transporte Na^+/H^+), ambos localizados na ML. Por outro lado, esta absorção de Na^+ é acompanhada pela absorção de Cl^- , movido, principalmente, pelo gradiente elétrico estabelecido. Acredita-se que o Cl^- entre na célula por canais localizados na ML como também através dos espaços intercelulares (Kunzelmann, 1997; Mall & cols., 1999) (Fig. 3). O Na^+ intracelular é transportado para fora da célula pela MBL através da bomba Na^+/K^+ enquanto que o Cl^- é transportado por canais específicos ou pelo contra-transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, ambos localizados na MBL (Greger & cols., 1996) (Fig. 3).

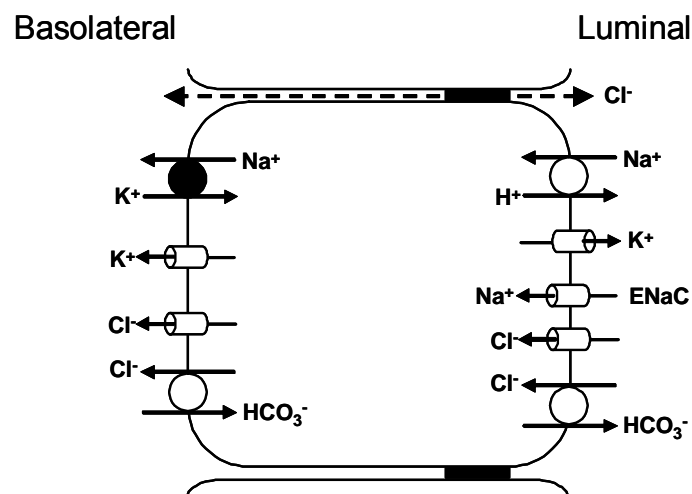


Figura 3: Representação esquemática dos principais mecanismos de absorção de íons no cólon (Geibel, 2005)

Ainda nas criptas do intestino grosso, semelhantemente ao que ocorre no intestino delgado, existe um mecanismo de secreção de NaCl que envolve o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC) da MBL das células epiteliais (Nilius & Droogmans, 2003). A bomba Na^+/K^+ na MBL gera a energia necessária para a entrada do Na^+ através do co-transportador NKCC, sendo esta acompanhada pela entrada de Cl^- e K^+ . As altas concentrações destes íons intracelulares difundem através da ML por canais seletivos (Fig. 4). Estes canais estão relativamente inativos sob condição de repouso, mas podem ser ativados por secretagogos tais como: hormônios, neurotransmissores gastrintestinais e por toxinas bacterianas (Field & Semrad, 1993; Binder & Sandle, 1994; Rolfe, 1999). Estes secretagogos, ligam-se a receptores específicos nas membranas das células epiteliais do intestino, estimulando a adenilatociclase e a guanilatociclase originando os nucleotídeos cíclicos: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente. Estes nucleotídeos cíclicos estimulam a via de secreção de Cl^- através do canal regulador da condutância de transmembrana da fibrose cística (CFTR) localizado na ML, estimulando também o co-transportador NKCC, este processo resulta numa rápida hipersecreção de Cl^- . A secreção aumentada de Cl^- por ação dos secretagogos, inibe os mecanismos de absorção de eletrólitos alterando os gradientes de potencial eletroquímico, o que torna o lúmen intestinal mais negativo. Esta diferença de potencial elétrico (lúmen negativo) causa a saída de Na^+ pela via paracelular, sendo o processo final a secreção de NaCl. Estes processos então, alteram o gradiente osmótico transepiteliais produzindo também uma diminuição da absorção de água (Colegio & cols., 2002; Spring, 2002; Nilius & Droogmans, 2003; Geibel, 2005) (Fig. 4).

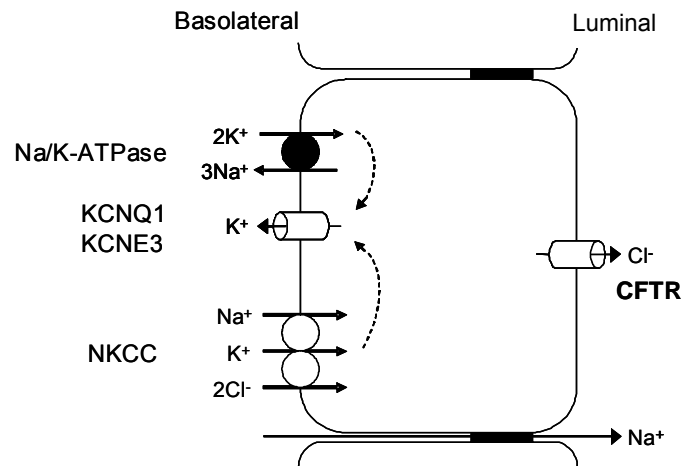


Figura 4: Representação esquemática da secreção intestinal de Cl^- através do canal de cloreto CFTR (Nilius & Droogmans, 2003)

O canal de cloreto CFTR, como descrito anteriormente, tem um importante papel no mecanismo de secreção intestinal de íons (Nilius & Droogmans, 2003). Por ser ativado e/ou modulado pelos nucleotídeos AMPc e GMPc (Cheng & cols., 1991; Tien & cols., 1994) este canal pode ser alvo de vários neurotransmissores, hormônios e toxinas bacterianas (Currie & cols., 1992) que alteram os níveis intracelulares de AMPc e GMPc, entre outros. Essa informação ressalta a importância do estudo da ação destes fatores sobre a atividade e/ou expressão do CFTR e, conseqüentemente, na secreção de NaCl que está intimamente associada à diminuição da absorção de água no epitélio intestinal.

I.2.2 – O canal de cloreto CFTR

O canal de cloreto CFTR, está localizado primariamente na membrana luminal das células sendo uma via para o movimento do Cl^- que regula o fluxo deste íon através do tecido epitelial. No intestino e pâncreas, o CFTR participa na *secreção* de água e eletrólitos; nos ductos de glândulas sudoríparas e epitélio de vias aéreas,

este participa na *absorção* de água e eletrólitos. Nos rins, este canal está presente ao longo de todo néfron, exceto no glomérulo, participando da reabsorção de Cl^- .

A mutação e conseqüente disfunção do canal de Cl^- CFTR origina a doença genética conhecida como fibrose cística (FC) (Sheppard & Welsh, 1999). Em pacientes com FC o transporte transepitelial de íons é alterado o que leva a disfunções nos diferentes órgãos secretores. Desta forma, as manifestações clínicas desta doença são produzidas por disfunções principalmente das vias aéreas, do pâncreas e do trato gastrintestinal. Também é detectada a infertilidade masculina e elevados níveis de NaCl no suor nesses pacientes (Wang & Freedman, 2002; Chow & Cheung, 2006).

O CFTR é uma proteína de membrana plasmática com 1480 aminoácidos de aproximadamente 170 kD, composta por dois domínios transmembrana (TMD1 e TMD2), e dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBD1 e NBD2), separados por um grande domínio regulador R contendo múltiplos sítios de fosforilação (Fig. 5).

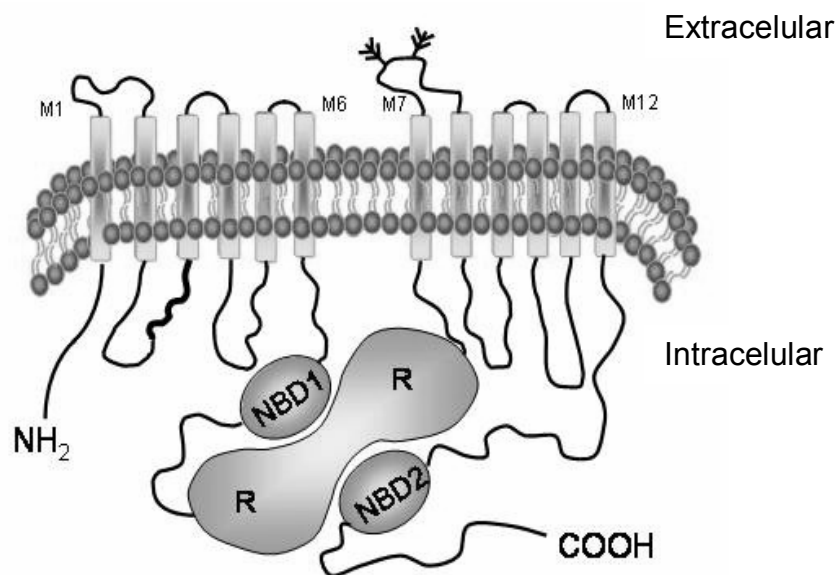


Figura 5: Esquema da estrutura do canal de cloreto *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), mostrando os grupos NH_2 (N) e COOH (C) terminais, os domínios de ligação a nucleotídeos (NBD1, NBD2), o domínio regulador (R) e os dois domínios transmembrana, TMD1 (M1-M6) e TMD2 (M7-M12). NBD1 e NBD2 se encontram próximos entre eles e em contacto com o domínio R. Adaptado de Linsdell, 2006)

A estrutura primária da proteína do canal de cloreto CFTR permite a sua classificação entre os membros da família de transportadores chamada *ATP-binding cassette* (ABC), pois muitos dos membros desta família utilizam-se da energia da hidrólise de ATP para transportar substratos através das membranas celulares, e também por sua seqüência primária não se assemelhar com a de nenhum outro canal de cloreto (Riordan & cols., 1989).

O domínio regulatório R contém vários sítios potenciais de fosforilação para proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e proteína quinase dependente de Ca^{++} (PKC) produzindo a abertura do canal (Tien & cols., 1994; Stanton, 1997). Destes, somente cinco serinas são fosforiladas pela PKA (Cheng & cols., 1991) e duas serinas são fosforiladas pela PKC também (Picciotto & cols., 1992). Há ainda dados que propõem que a PKC pode facilitar a fosforilação do CFTR pela PKA, já que a adição de ativadores de PKC antes da adição de agonistas de AMPc aumenta a fosforilação do CFTR (Tabcharani & cols., 1991; Jia & cols., 1997). Isoformas dependentes e independentes de Ca^{++} podem fosforilar o CFTR e ativá-lo, mas só alcançando 15% da magnitude atingida pela PKA. A proteína quinase dependente de GMPc (PKG) também é capaz de fosforilar o CFTR resultando em uma corrente de Cl^- de magnitude similar à atingida pela PKA (Berger & cols., 1993; Vaandrager & cols., 1998).

As características do canal de Cl^- CFTR são outorgadas pelas funções dos domínios TMDs, os domínios NBDs e o domínio regulador R. O CFTR tem características distintas de outros canais de cloreto, dentre elas, uma baixa condutância que corresponde a 6 - 10 pS, a relação corrente-voltagem (I/V) linear (Tabcharani & cols., 1990; Berger & cols., 1991), ser seletivo para ânions, ter sua

abertura independente de tempo e voltagem e ser regulado por fosforilação dependente de AMPc e por nucleotídeos intracelulares (Anderson & cols., 1991b).

Estudos de eletrofisiologia indicam que o canal de cloreto CFTR é seletivo a ânions. A razão da permeabilidade do Na^+ sobre a do Cl^- ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$) encontra-se no intervalo entre 0,1 - 0,03 (Anderson & cols., 1991a; Berger & cols., 1991), sugerindo significativamente uma maior atividade para o Cl^- que para Na^+ .

A permeabilidade aniônica do CFTR, medida através da técnica de eletrofisiologia de *patch clamp* mostrou a seguinte seqüência de permeabilidade a ânions: $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Anderson & cols., 1991a). Esta permeabilidade distingue o CFTR de outros canais de cloreto epiteliais, que geralmente têm maior permeabilidade a I^- em relação ao Cl^- , tal como ocorre com os canais de cloreto retificadores de corrente para fora, os *outwardly rectifying chloride channels* (ORCC).

Linsdell & cols (1997b) mediram a permeabilidade do CFTR para ânions poliatômicos de dimensões conhecidas e obtiveram a seguinte seqüência: $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{formato} > \text{acetato}$. Em contraste, piruvato, propanoato, metanosulfato, etanosulfato e gluconato não são permeáveis ao CFTR. Com base nestes dados, o grupo de Linsdell estimou que o diâmetro mínimo para o poro do CFTR é de $\sim 5,3$ angstroms, similar ao que já foi demonstrado para outros canais de cloreto (Bormann & cols., 1987; Arreola & cols., 1995). Foram encontrados também dados que comprovam a permeabilidade do CFTR à água, uréia e ATP, mas as evidências quanto à permeabilidade ao ATP ainda são controversas (Hasegawa & cols., 1992; Reisin & cols., 1994; Grygorczyk & cols., 1996; Reddy & cols., 1996; Pasyk & Foskett, 1997).

A proteína do CFTR possui seis resíduos positivamente carregados (K95, R134, R334, K335, R347 e R1030) dentro dos domínios transmembrana que são,

provavelmente, responsáveis pelo alinhamento do poro (Riordan & cols., 1989). Estes aminoácidos estão conservados através das espécies, sendo dois deles sítios de mutações associadas à fibrose cística (R334Q/W e R347C/H/L/P), o que sugere que estes tenham um papel funcional importante (Welsh & cols., 1995). Os estudos realizados até hoje permitem supor que o CFTR é um canal com três sítios de ligação ao cloreto (Linsdell & cols., 1997a). Em ambos NBDs, existem seqüências de aminoácidos específicos que são conservadas e são chamadas de motivos Walker A e B e uma seqüência chamada consenso C (denominada também *signature sequence*). Essas seqüências conservadas são conhecidas por ligarem e hidrolisarem Mg.ATP intracelular. O motivo Walker A interage com o fosfato α - ou γ - do ATP sendo essencial para a hidrólise do ATP, enquanto que o motivo Walker B coordena a ligação do Mg^{++} , sendo importante para a ligação do ATP. A seqüência consenso C participa na ligação da molécula de água para hidrólise. A importância dos NBDs é realçada por existirem várias mutações associadas a fibrose cística nestes domínios que levam a importantes disfunções do canal (Walker & cols., 1982; Higgins, 2001; Smith & cols., 2002).

Assim, podemos concluir que, os TMDs contribuem para a formação do poro seletivo a cloreto (Anderson & cols., 1991a); os NBDs hidrolisam o ATP para regular a abertura e fechamento do canal (Anderson & cols., 1991b; Baukowitz & cols., 1994). Sendo a atividade do canal de cloreto CFTR controlada pela fosforilação do domínio R (Berger & cols., 1991).

Como foi mencionado anteriormente, a abertura e o fechamento do canal de cloreto CFTR é fortemente controlada pelo balanço intracelular da proteína quinase, das fosfatases e pelos níveis de ATP. A ativação da PKA ou PKC causa a fosforilação de múltiplos resíduos de serina no domínio regulador R. Uma vez que o

domínio R foi fosforilado a abertura do canal ocorre em função da hidrólise do ATP nos NBDs. Finalmente, o canal retorna para o seu estado inicial quando as fosfatases desfosforilam o domínio R. Muitos modelos diferentes foram propostos para demonstrar a regulação do canal pela hidrólise do ATP, um deles é o proposto por Gadsby & Nairn (1999). Neste modelo, como pode ser observado na figura 6, em C1 (estado fechado) o canal não está ligado ao ATP. Pela ligação do ATP aos NBDs, o canal passa de C1 para C2 e C3. Em C3, o canal encontra-se fechado, mas a hidrólise do ATP ligado ao NBD1 abre o canal (C3→O1). O fechamento do canal resulta da hidrólise do ATP ligado ao NBD2 com liberação de ADP de um ou, dos dois NBDs (O1→O2→C1).

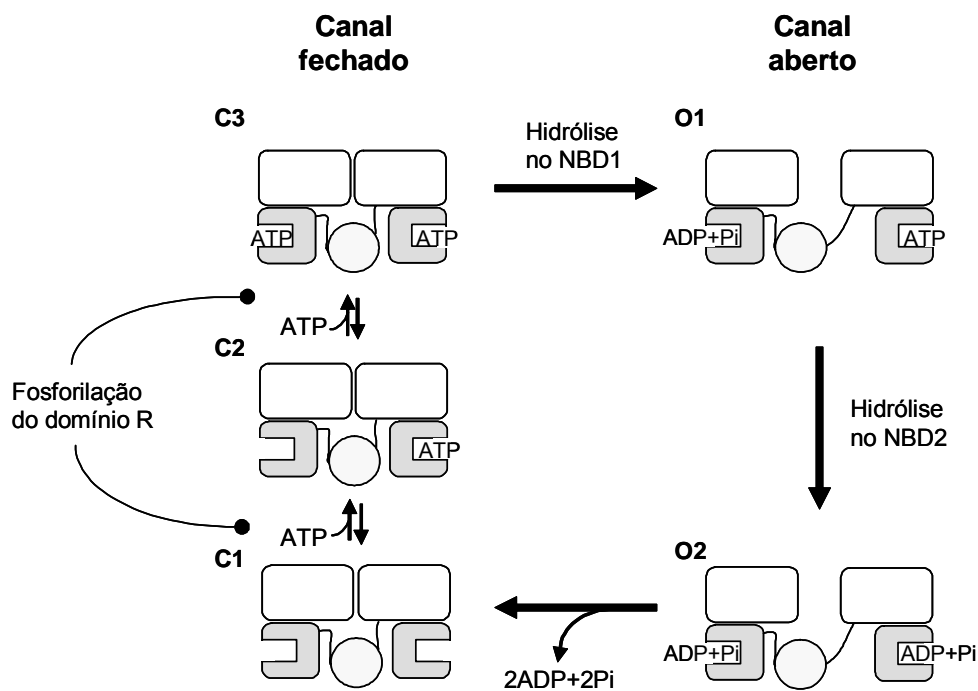


Figura. 6: Mecanismo de abertura proposto para o canal de cloreto CFTR (Gadsby & Nairn, 1999)

A hidrólise de ATP é um passo importante para a ativação do CFTR. No entanto, a adição de Mg.ATP à solução intracelular não possui efeito ativador sobre

esse canal, a não ser após a fosforilação pela PKA (Anderson & cols., 1991a). Quando a PKA e o Mg.ATP são removidos, o poro do CFTR é fechado. Com o aumento da concentração de ATP, o tempo médio de fechamento diminui, mas o tempo médio de abertura não muda, o que pode levar a crer que o ATP é o responsável por regular a abertura do canal de cloreto CFTR (Tilly & cols., 1992; Gunderson & Kopito, 1994; Venglarik & cols., 1994; Winter & cols., 1994; Li & cols., 1996).

Vários trabalhos mostram que o CFTR funciona como uma ATPase (Ko & Pedersen, 1995; Linsdell & cols., 1997b; Pasyk & Foskett, 1997) em taxas de hidrólise de ATP menores do que a Na^+/K^+ -ATPase. Outros estudos mostraram ainda que as taxas de hidrólise dos NBDs 1 e 2 determinam a duração dos estados de abertura e fechamento do canal (Carson & Welsh, 1995; Manavalan & cols., 1995).

A fosforilação do domínio R estimula a atividade do CFTR, já que variantes do CFTR com sítios de fosforilação mutados têm sua atividade extremamente depletada (Rich & cols., 1993; Ma & cols., 1997; Winter & Welsh, 1997). Também foi demonstrado que a fosforilação pela PKA do domínio R do CFTR determina a interação do ATP com os NBDs (Gunderson & Kopito, 1994; Winter & cols., 1994; Li & cols., 1996; Winter & Welsh, 1997). Além disso, os sítios de fosforilação não contribuem igualmente para a atividade, o que permite especular que a fosforilação tenha efeitos gradativos na estimulação do canal. Logo, a fosforilação do domínio R pode ter dois efeitos, sendo o primeiro permissivo, liberando a inibição alostérica, e o segundo, estimulatório, facilitando as interações dos NBDs com ATP (Carson & cols., 1995; Gilman, 1987). Depois de fosforilado, o domínio R estimula a atividade ATPásica e a abertura do canal.

A inativação do CFTR provavelmente resulta da defosforilação do domínio R do CFTR por fosfatases associadas à membrana como, por exemplo, a proteína fosfatase 2 A (PP2A) e outras fosfatases não-identificadas similares a fosfatase alcalina, o que foi visto nas vias aéreas e no intestino (Berger & cols., 1993; Hwang & cols., 1993; Becq & cols., 1994; Gadsby & Nairn, 1994). A suposição deste tipo de inativação baseia-se no fato de que após a remoção da PKA, a atividade do canal de cloreto CFTR diminui com o tempo, mesmo na presença de Mg.ATP (Sheppard & Welsh, 1999).

I.2.2.a - CFTR como regulador de outras condutâncias

Muitos estudos indicam também que o CFTR regula a função de outros canais, entre os quais o canal de cloreto *outwardly rectifying chloride channels* (ORCC) (Schwiebert & cols., 1995) e o canal epitelial de Na⁺ (ENaC) (Kunzelmann & cols., 1997; Barbry & Hofman, 1997; Matosin-Matekalo & cols., 1998), participando também na secreção de ATP (Morales & cols., 1999).

A hipótese original de ação do CFTR era de regulador de condutância, e não de um canal de cloreto. Essa hipótese ainda se mantém como uma das funções do CFTR, já que anormalidades no transporte iônico observadas na fibrose cística no epitélio das vias aéreas não podem ser explicadas apenas por alterações do transporte de cloreto atribuído ao CFTR.

Schwiebert e colaboradores (1995) mostraram que o CFTR é capaz de regular os canais de cloreto ORCCs através de um mecanismo autócrino envolvendo a liberação de ATP pelo próprio CFTR para fora da célula. No entanto, outros pesquisadores sugerem que, na verdade, o CFTR seja um canal duplo capaz de transportar Cl⁻ e ATP (Reisin & cols., 1994; Abraham & cols., 1997). De qualquer

forma, uma vez fora da célula, o ATP poderia interagir com receptores purinérgicos que, depois de ativados, estimulariam ORCCs através de segundos mensageiros, aumentando o transporte de Cl^- . Já foi também revelado que o NBD1 é essencial para a regulação de ORCCs (Schwiebert & cols., 1998) e que, a deleção do domínio R do CFTR deixa o poro do canal intacto, porém, elimina o transporte de ATP (Sugita & cols., 1998). Estes mesmos pesquisadores também demonstraram que a fosforilação e a abertura do CFTR estão diretamente envolvidos na abertura do canal de ATP associado a ele, sugerindo que as mudanças estruturais do CFTR que controlam os mecanismos de abertura e fechamento deste canal têm efeitos similares na via de condução de ATP.

Canais epiteliais de Na^+ (ENaCs) são inibidos durante ativação de secreção de Cl^- em células expressando CFTR, o que sugere que, quando o CFTR é ativado, inibe ENaCs (Stutts & cols., 1995; Mall & cols., 1996; Morales & cols., 1999). Outros trabalhos já sugeriram que o CFTR e ENaCs interagem diretamente por ligação proteína-proteína, além do transporte de Cl^- pelo CFTR contribuir para a inibição de ENaCs, mas sem um mecanismo ainda definido (Ismailov & cols., 1996 e 1997; Kunzelman & cols., 1997; Briel & cols., 1998) (Fig. 7).

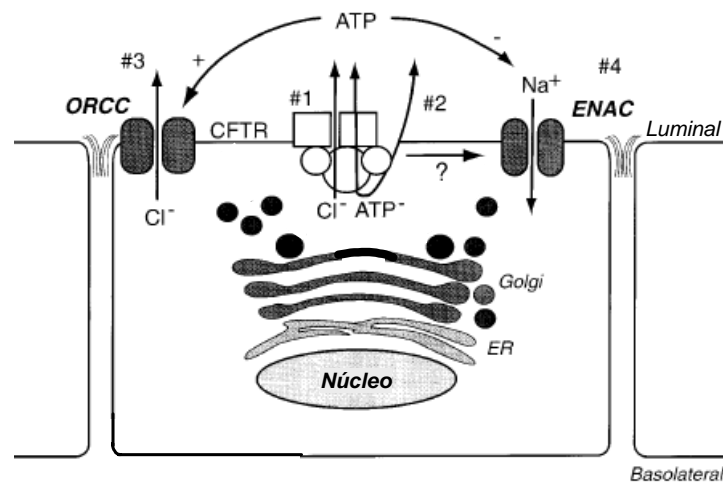


Figura 7: Modelo de célula epitelial mostrando as funções do CFTR e possíveis interações com outros canais: 1) Canal de cloreto, 2) secreção de ATP, 3) possível regulação do *outwardly rectifying chloride channels* (ORCC), 4) inibição do canal epitelial de Na^+ (ENaC), ER, retículo endoplasmático (Schwiebert & cols., 1999)

I.3 – Sistema Renal e o canal de sódio CNG-A3

I.3.1 – Rim: Reabsorção e secreção renal de água e eletrólitos

Diariamente, dos 1200 litros de sangue que chegam até os rins, 180 L de plasma são filtrados nos glomérulos, sendo eliminado pelos rins apenas um total de 1 a 2 L de urina em virtude da grande reabsorção que ocorre ao longo túbulos renais. A maior parte do sódio filtrado nos glomérulos é reabsorvida ao longo dos vários segmentos do néfron, sendo que nos túbulos proximais, alça de Henle e túbulos distais a reabsorção de sódio é proporcional à quantidade filtrada (Dantzler, 2003). Em contrapartida, ao longo do sistema coletor, composto pelas porções cortical, medular externa e medular interna, a reabsorção do íon é finamente regulada por hormônios sendo esta fundamental para a manutenção da volemia. Alterações dos níveis circulantes e locais de substâncias que aumentam a eliminação de sódio, ou seja, natriuréticas (fator atrial natriurético, bradicinina, adenosina) e que diminuem a eliminação de sódio, ou seja, anti-natriuréticas (angiotensina, vasopressina, aldosterona, hormônios tireóideos) estão associadas a modificações na atividade e na expressão dos transportadores iônicos renais e a mudanças do volume extracelular, já que, a reabsorção de Na^+ ao longo do néfron é o processo primário responsável pela reabsorção de água e manutenção do VFEC (Repke & cols., 1995; Morales & cols., 1996; Dantzler, 2003).

I.3.1.a – Transporte de sódio e água ao longo do néfron

Quando se estuda o transporte trans-epitelial renal deve-se considerar, semelhantemente ao que ocorre no trato gastrintestinal, duas vias possíveis: a transcelular (através das duas membranas celulares, ML e MBL) e a inter- ou paracelular (através das *tight-junctions*), como foi comentado anteriormente.

Na reabsorção no túbulo proximal (Fig. 8), o transporte de água segue o de soluto, graças ao pequeno gradiente osmótico existente, pois o fluido luminal é ligeiramente hipotônico em relação ao plasma peritubular. O túbulo proximal reabsorve aproximadamente 67% de água filtrada, Na^+ , Cl^- , K^+ e outros solutos. O processo de reabsorção de íons tem como força motriz geradora de gradiente, a Na^+/K^+ -ATPase localizada na MBL.

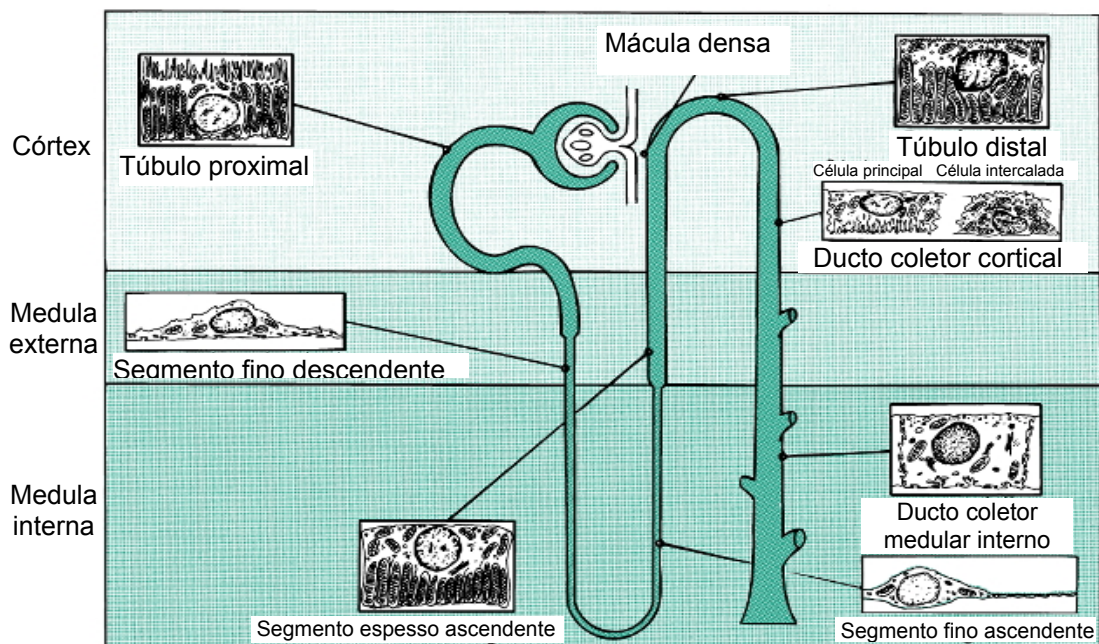


Figura 8: Diagrama de um néfron, incluindo a ultra-estrutura celular (Tomado de Stanton & Koeppen, 2004)

O Na^+ é reabsorvido por mecanismos diferentes na primeira metade e na segunda metade do túbulo proximal. No segmento inicial (Fig. 9), o Na^+ é reabsorvido, pela ML, através do co-transporte eletrogênico com solutos orgânicos, tais como açúcares e aminoácidos, e também pelo contra-transporte Na^+/H^+ eletroneutro. Este último transporta Na^+ para dentro da célula em troca da secreção luminal de H^+ . Também é observado o co-transporte neutro de Na^+ com ânions orgânicos como o lactato na ML nesse segmento (Aronson, 1996; Knepper & Brooks, 2001; Dantzler, 2003) (Fig. 9).

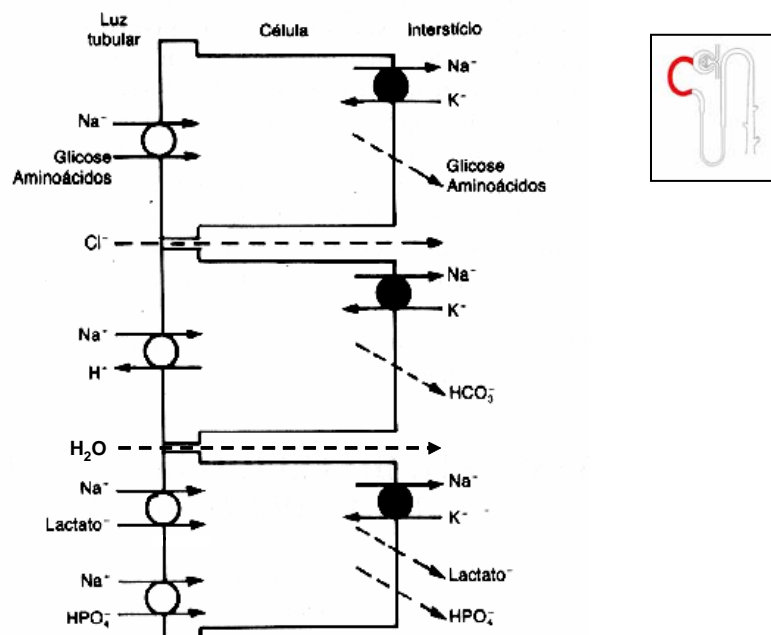


Figura 9: Esquema indicando os principais mecanismos de transporte de sódio pelo segmento inicial do túbulo proximal. Os círculos fechados representam transporte ativo; os abertos mecanismos ativos secundários; e as setas pontilhadas, difusão passiva (Adaptado de Aires, 1999a).

Na segunda metade do túbulo proximal (Fig. 10), o Na^+ é reabsorvido através tanto da via trans-celular como da para-celular. Este entra na célula pela ação paralela do trocador Na^+/H^+ e um ou mais trocadores aniônicos envolvendo a reabsorção de Cl^- localizados na ML deste segmento. A energia necessária para este processo é originada pelo gradiente eletroquímico gerado pela bomba Na^+/K^+ da MBL, sendo o Na^+ reabsorvido para o interstício através desta. O Cl^- por sua vez, é reabsorvido para o interstício pela ação de um co-transportador K^+-Cl^- também localizado na MBL (Fig.10).

O NaCl é reabsorvido também pela via para-celular nesta porção do túbulo proximal favorecida pelo gradiente de concentração de Cl^- gerada pelo aumento da sua concentração na luz tubular produzida pela grande reabsorção de água nesse segmento. Todavia, uma parte deste NaCl é reabsorvido carregado pelo movimento de água entre os espaços intercelulares (*solvent drag*) (Aronson, 1996; Aronson & Giebisch, 1997; Knepper & Brooks, 2001) (Fig. 10).

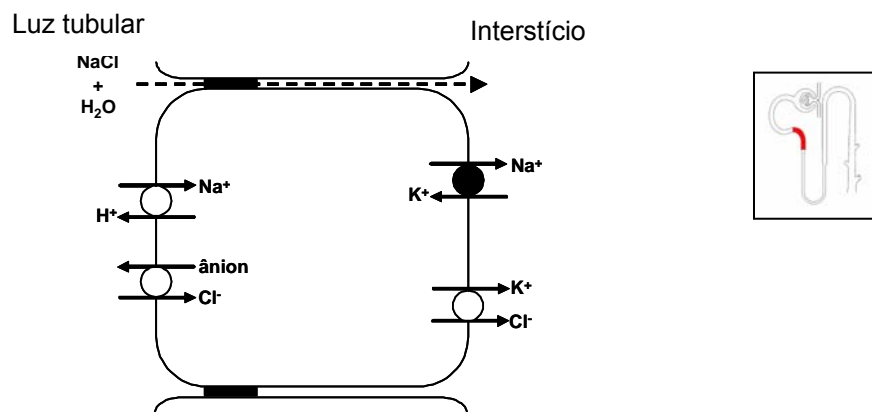


Figura 10: Representação esquemática do transporte de sódio e água na parte final do túbulo proximal. Os círculos fechados representam transporte ativo; os abertos mecanismos ativos secundários e as setas pontilhadas, difusão passiva (Adaptado de Stanton & Koepfen, 2004).

O segmento fino descendente (Fig. 8) é altamente permeável a água pela presença de aquaporinas. Nesse segmento, o Na^+ é secretado passivamente para a luz tubular, pelo menos em algumas espécies animais. Já o segmento fino ascendente é impermeável a água e a reabsorção de NaCl é preferencialmente passiva.

A porção grossa ascendente (Fig. 8) reabsorve aproximadamente 25% do NaCl e K^+ filtrados, a reabsorção de Na^+ é feita através de transporte ativo secundário, pelo co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, localizado na membrana luminal (Fig. 11) e inibido pelo diurético furosemida. Neste segmento não ocorre reabsorção de água, pois seu epitélio é altamente impermeável à água. A reabsorção de Na^+ no túbulo distal convoluto é passiva, através dos simporte Na^+-Cl^- ou ativa secundária, pelo trocador Na^+/H^+ . Virtualmente não existe reabsorção de água no túbulo distal convoluto, na presença ou não do hormônio antidiurético (HAD) (Greger, 1985; Haas, 1989; Kaplan & cols., 1996; Dantzler, 2003).

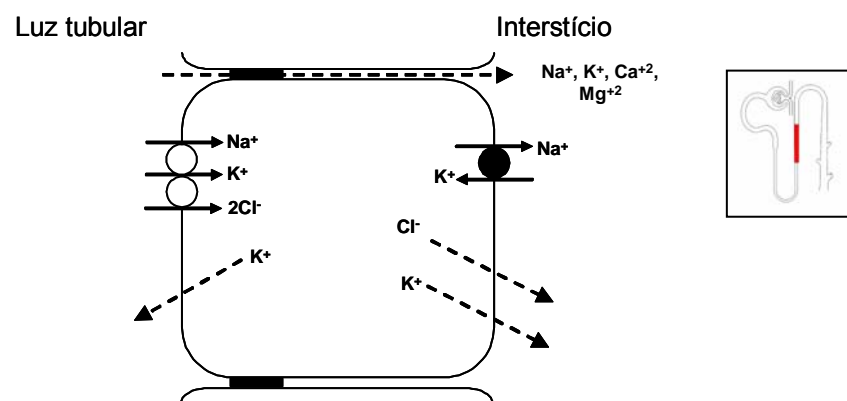


Figura 11: Representação esquemática dos principais mecanismos de transporte presentes no ramo grosso ascendente da alça de Henle. O círculo fechado representa os mecanismos de transporte ativo; os abertos mecanismos ativos secundários; e as setas pontilhadas, difusão passiva (Adaptado de Aires, 1999b).

O ducto coletor cortical e o medular (Fig. 8) reabsorvem aproximadamente 7% do NaCl filtrado, a reabsorção de Na^+ é eletrogênica, pois esse íon difunde-se da luz tubular para o interior da célula “principal” do ducto coletor, através de canais sensíveis ao amiloride, localizados na ML, a favor tanto de um gradiente químico como elétrico (Fig. 12).

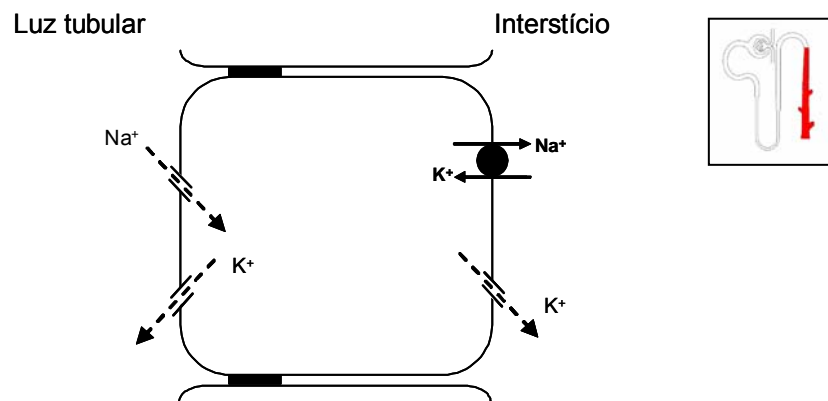


Figura 12: Representação esquemática das vias de transporte nas células “principais” do túbulo distal e ducto coletor (Aires, 1999b).

Ao contrário dos outros segmentos do néfron, o ducto coletor reabsorve Na^+ em atendimento às necessidades do organismo, e não em função da quantidade de Na^+ que lhe é oferecida. A reabsorção de Na^+ neste segmento é regulada pela ação da aldosterona, hormônio liberado pela glândula supra-renal. Estes segmentos do néfron foram classificados como epitélios *tight*, ou de baixa permeabilidade, igual à porção distal do trato GI. A permeabilidade à água varia diretamente com a concentração plasmática de HAD, que aumenta a permeabilidade à água desses segmentos, permitindo que a água passe, a favor do gradiente de concentração, da luz tubular para o interstício peritubular hipertônico, reabsorvendo uma quantidade variável de água (entre 8 a 17%) (Breyer & Ando, 1994; Hebert, 1999).

As células do ducto coletor reabsorvem quantidades significativas de Cl^- , provavelmente através da via para-celular. A reabsorção de Cl^- é movida pela diferença de voltagem através do túbulo distal e do ducto coletor.

Em 1997, foi clonado o canal de sódio sensível ao amiloride, pertencente à família dos canais dependentes de GMP cíclico, *cyclic nucleotide-gated channel* (CNG), denominado CNG-A3, cujos outros membros (CNG-A1 e CNG-A2) tem função comprovada na transdução de sinais sensoriais como o olfato e a visão (Misaka, 1997).

O canal de sódio CNG-A3 é uma proteína abundantemente expressa no tecido cardíaco, renal e testicular. Especificamente na porção medular interna do ducto coletor do néfron, este canal é responsável pelo transporte eletrogênico de sódio o qual é inibido pelo fator atrial natriurético, processo que envolve a participação do GMP cíclico (Stanton, 1991).

Essas informações sugerem que o CNG-A3 possa exercer papel fisiológico importante na função renal, através do ajuste da reabsorção de sódio modulada pela aldosterona e outros hormônios relacionados com a regulação do VFEC ao longo dos segmentos do néfron, e especialmente através do ducto coletor.

1.3.2 – O canal de sódio CNG-A3

O transporte do sódio através de canais sensíveis ao amiloride, no túbulo renal e em outros tecidos corporais, tem comprovado papel na regulação do VFEC e da pressão sangüínea (Cowley & Roman, 1996; Garty & Palmer, 1997). Dentre esses canais o papel clássico é referido ao canal de Na^+ , ENaC, expresso no ducto coletor e inibido pelo amiloride.

Por outro lado, é proposto que canais CNG possam ter um papel importante nos rins. Eles têm estrutura heterotetramérica consistindo de subunidades

“principais” e “modulatórias” (Richards & Gordon, 2000; Bradley & cols., 2005). As subunidades principais se caracterizam pela habilidade de induzir a formação funcional do canal, expressa em sistemas heterólogos. No entanto, a subunidade modulatória somente quando co-expressa com a subunidade principal, confere ao canal propriedades nativas do CNG, como aumento da sensibilidade a nucleotídeos cíclicos e bloqueadores do canal além de modular a afinidade por cálcio (Biel, 1999).

Assim, os canais CNG de mamíferos estão divididos em duas diferentes subfamílias. A sub-família representada pelas sub-unidades principais, designadas CNG-A1, CNG-A2, CNG-A3 e CNG-A4, sendo que o CNG-A4, encontra-se dentro desta família, mas sem capacidade de induzir a formação funcional do canal (freqüentemente denominada sub-unidade modulatória), e a segunda sub-família compreendida por dois membros, o CNG-B1 e o CNG-B3, denominados de sub-unidades modulatórias (Kaupp & Seifert, 2002) (Fig. 13A, B e C).

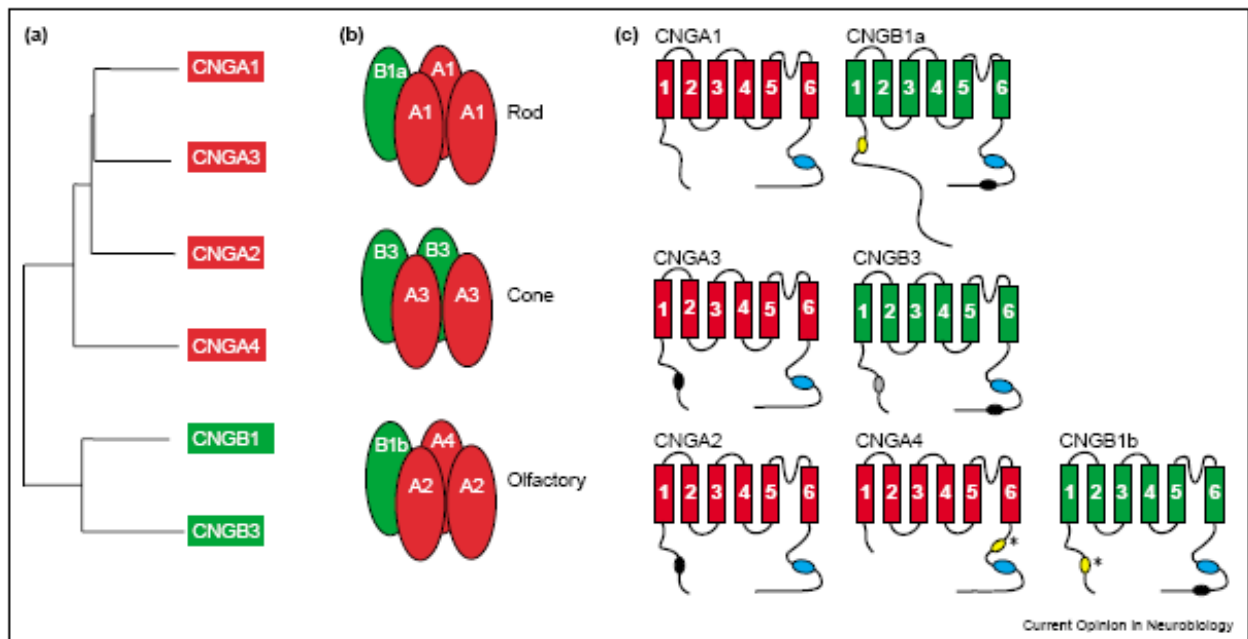


Figura 13: Sub-unidades e estequiometria dos canais CNG em fotorreceptores e neurônios sensoriais do olfato. (a) Árvore filogenética das sub-unidades A e B dos canais CNG de humano. (b) Composição estequiométrica e sub-unidades dos canais CNG em bastonetes, cones e neurônios sensoriais do olfato. (c) Modelo esquemático dos canais CNG em bastonetes, cones e neurônios sensoriais do olfato. (Bradley & cols., 2005)

A sub-unidade CNG-A3 é uma proteína de aproximadamente 80 kD, formado por 6 domínios transmembranais (TMDs) sendo o poro localizado entre os domínios 5 e 6. Ambos grupos NH₂ (N) e COOH (C) terminais contêm regiões funcionais de regulação do canal. O sítio de ligação de nucleotídeos cíclicos, localizado na região C terminal e, o sítio de ligação de Ca⁺⁺ e de cálcio-calmodulina, localizado na região N terminal (Fig. 13C). A sub-unidade CNG-A3 é inibido pelo GMPc no rim ao contrário de outros tecidos onde CNG-A3 é estimulado pelo aumento do GMPc (Biel & cols., 1996; Muller & cols., 1998; McCoy & cols., 1995). A afinidade do canal pelo GMPc é modulada pelo cálcio intracelular, bem como pela cálcio-calmodulina (Biel & cols., 1996). Sabe-se que o CNG-A3 é sensível ao amiloride (McCoy & cols., 1995) com coeficiente de Hill \cong 4 quando ativado por GMPc (McCoy & cols., 1995) e demonstra uma seletividade a uma série de íons (n=6): NH₄⁺: Na⁺: K⁺: Li⁺ : Rb⁺: Cs⁺ = 2,32: 1,0: 0,93: 0,91: 0,62: 0,34. O CNG-A3 apresenta ainda permeabilidade a outros cátions divalentes tais como o cálcio (Stanton, 1991; Qiu & cols., 2000), sendo inibido pelo L-cis-diltiazem (McCoy & cols., 1995).

Evidências experimentais mostram que o CNG-A3 está expresso nos cones fotorreceptores, testículo, rim, coração, cólon e nas glândulas pineal e adrenal (McCoy & cols., 1995). No cólon esse canal participa da absorção de cálcio e sódio através de células epiteliais intestinais (Qiu & cols., 2000). O canal de sódio CNG-A3 é bastante abundante no rim, quando comparado a outros canais dependentes de GMPc como o CNG-A1, existindo na proporção 16:1 (McCoy & cols., 1995). Especificamente na porção medular interna do ducto coletor do néfron, este canal é responsável pelo transporte eletrogênico de sódio sendo inibido pelo FAN via GMPc (Stanton, 1991).

No entanto, ainda não está definido se a sub-unidade CNG-A3 está co-

expressa com uma das sub-unidades modulatórias no rim. Por outro lado, a subunidade CNG-B1 forma um canal hetero-oligomérico funcional com o CNG-A3 *in-vitro*, sendo proposto então, a formação de canais formados pela sub-unidade CNG-A3 e CNG-B1 com propriedades modulatórias em tecidos intactos (Biel & cols., 1996). Mais recentemente, estudos realizados em cones de fotorreceptores demonstraram que sub-unidades CNG-A3 estão co-expressas com sub-unidades CNG-B3 (Peng & cols., 2004; Bradley & cols., 2005) (Fig. 13B e C), mas ainda nenhum estudo foi realizado em tecido renal para determinar a estrutura destes canais nesse epitélio.

Assim, a presença do CNG-A3 no rim e a evidência de ser modulado por hormônios que alteram a concentração de GMPc intracelular, como mencionado anteriormente, sugerem que este possa ter um papel fisiológico importante na função renal, através do ajuste da reabsorção de sódio ao longo dos segmentos do néfron, especialmente através do ducto coletor.

I.4 – Sistema Endócrino: O papel de diferentes hormônios na regulação do volume do fluido extracelular

I.4.1 – Hormônio antidiurético

O hormônio antidiurético (HAD), é produzido nos corpos celulares dos neurônios dos núcleos supra-óticos e paraventriculares do hipotálamo e é armazenado na neuro-hipófise. Esse hormônio é liberado principalmente em situações onde há aumento da osmolaridade plasmática quando os sensores cerebrais são estimulados. Por outro lado, grandes perdas de volume podem estimular também tanto a liberação de HAD armazenado quanto a sua produção. O HAD circula em níveis basais nas concentrações de 1 pg/ml de plasma (10^{-12} M),

liga-se a um receptor específico de membrana sobre a superfície peritubular (serosa) das células do túbulo distal convoluto e do ducto coletor medular induzindo a atividade da adenilatociclase. O aumento de AMPc ativa a proteína quinase que inicia a cascata de fosforilação resultando na inserção dos canais de água, aquaporina, na membrana luminal, aumentando a permeabilidade a água. O aumento da permeabilidade da membrana luminal a água dependente de HAD permite a reabsorção de água livre de solutos, o que resulta no decréscimo do volume e aumento da osmolaridade urinário (Guthrie & Yucha, 2004).

No cólon, parte terminal de trato GI, foi demonstrado também que o HAD poderia afetar o transporte de água e eletrólitos em diferentes espécies de animais e em humanos, mas ainda estes resultados são contraditórios com estudos realizados *in-vitro* (Sato & cols., 1999).

I.4.2 – Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina é um sistema complexo de regulação da pressão arterial e do balanço de sódio, potássio e fluidos corporais atuando na liberação de aldosterona (Dzau & cols., 1988). Como mecanismo regulador, este sistema responde a modificações de qualquer destas variáveis. O papel do sistema renina-angiotensina na regulação da pressão arterial está relacionado com a sua capacidade de alterar a natriurese, mais do que ao seu efeito vasoconstritor direto. Diminuições na pressão de perfusão renal são detectadas pelos rins desencadeando a liberação da enzima proteolítica denominada renina pelas células justaglomerulares contidas nas arteríolas aferentes dos glomérulos. Esta reage com o seu substrato, o angiotensinogênio que é produzido no fígado, formando a angiotensina I. Este último torna-se substrato da enzima conversora de

angiotensina (ECA) existente nos pulmões (em membrana luminal das células endoteliais vasculares) e em outros órgãos, para se transformar em angiotensina II (Dzau & cols., 1988; Hackenthal & cols., 1990). A angiotensina II é o produto desta cascata que está relacionada com uma série de efeitos sistêmicos e renais, diretos e indiretos, tais como:

Efeitos diretos:

- aumento do VFEC e do débito cardíaco através da retenção de sódio e água no organismo (aumentando a reabsorção de Na^+ no túbulo proximal)
- aumento da resistência periférica total (potente ação vasoconstritora)
- aumento da secreção de aldosterona por estímulo do córtex da supra-renal

Efeitos indiretos:

- aumento do VFEC e do débito cardíaco através da retenção de sódio e água no organismo (aumentando a reabsorção de Na^+ em túbulo distal, ducto coletor e órgãos extra-renais, através da ação da aldosterona)
- aumento da ingestão e retenção renal de água com conseqüente elevação do VFEC (estimulação do centro da sede e a liberação de HAD).

1.4.3 - Aldosterona

Aldosterona é um mineralocorticoide primário produzido e liberado pela zona glomerulosa do córtex da glândula supra-renal. Este hormônio é liberado para a circulação em resposta a um estímulo do sistema renina-angiotensina, como assim também em resposta a diminuição dos níveis plasmáticos de Na^+ , e aumentos das concentrações de K^+ . Sua ausência no organismo altera a concentração de eletrólitos e fluido corporal.

No rim, sua ação estimula a reabsorção de Na^+ e secreção de K^+ e H^+ , agindo

principalmente em túbulo coletor (Rossier & Palmer, 1992; Agarwal & Mirshahi, 1999; Booth & cols., 2002).

Os principais sítios de ação da aldosterona são o segmento ascendente grosso da alça de Henle (TAL), túbulo distal (DT) e ducto coletor (CD), onde esta determina o aumento da reabsorção do íon sódio. A análise de seu efeito mostra a existência de uma resposta bifásica, composta por uma fase rápida e outra lenta. A fase rápida denominada também de fase não genômica (<5 min) envolve a ativação e incorporação dos canais de sódio e da bomba Na^+/K^+ pré-existentes em vesículas intracelulares, nas membranas luminal e basolateral das células do epitélio tubular renal, respectivamente. Esta ação é realizada possivelmente por receptores de aldosterona localizados na membrana celular, diferentes aos receptores de aldosterona citoplasmáticos (receptores mineralocorticoides) já conhecidos. Gerando aumento de AMPc, PKC e Ca^{++} intracelular, capazes de produzir os efeitos mencionados (Booth & cols., 2002). Durante a fase lenta, também denominada fase genômica, ocorre primeiramente (1-6 h) estímulo da transcrição dos genes codificantes de fatores tais como quinase induzida por glicocorticoide (*glucocorticoid-inducible kinase*, Sgk), fator induzido pelo hormônio corticosteróide (*corticosteroid hormone-induced factor*, CHIF), e *Kirsten Ras* (Ki-Ras) que potencializam os efeitos da fase rápida. Uma segunda fase genômica (>6 h) estimula a transcrição dos genes codificantes de canais de sódio e da bomba Na^+/K^+ (Booth & cols., 2002).

No intestino, sua ação sobre os colonócitos regula o influxo de Na^+ , elevando o número de canais de Na^+ sensíveis a amiloride, presentes na membrana luminal, além de elevar a condutância dos canais individualmente. Outra ação da aldosterona é o aumento do metabolismo celular o qual eleva a relação ATP/ADP, dessa

maneira, aumentando a atividade Na^+/K^+ -ATPase da MBL e, portanto o transporte transepitelial absorptivo de Na^+ (Moreto & cols., 2005)

I.4.4 - Fator Atrial Natriurético

O fator atrial natriurético (FAN) é sintetizado, armazenado e liberado dos miócitos atriais, principalmente, sendo também encontrada a expressão de RNAm do peptídeo em outros órgãos (Gower & cols., 1994). O FAN é liberado em resposta ao estiramento atrial induzido por expansão do volume de sangue circulante. Os níveis normais de FAN no plasma são de 50 a 150 pg/ml e seu papel principal é normalizar a volemia através dos seguintes mecanismos:

- vasodilatação generalizada;
- aumento da permeabilidade vascular a água (favorece a saída de água dos capilares);
- aumento da filtração glomerular (aumentando o coeficiente de ultrafiltração, K_f e aumentando a pressão hidrostática glomerular);
- diurese e natriurese (inibição do efeito da angiotensina II, inibição da reabsorção de Na^+ no ducto coletor, redução da liberação de renina, aldosterona e ADH).

A ação do FAN no trato GI é uma forte evidência de que este possa atuar localmente através das vias neural, endócrina ou parácrina para modular a função gastrointestinal. Os mecanismos pelo qual atua são (Gonzalez & cols., 1998; Gower & cols., 1994; Hervieu & cols., 1996):

- contração do duodeno;
- relaxamento da capa longitudinal e contração da capa circular do músculo liso intestinal;

- inibe a absorção de Na^+ e água pelo intestino.
- estimula o fluxo de Na^+ , Cl^- , K^+ e água no duodeno e no cólon proximal.
- Incrementa a secreção de Na^+ e água no intestino.

O FAN atua por meio do GMPc como segundo mensageiro e os receptores do FAN acoplados ao GMPc foram detectados no intestino delgado e no cólon (Hervieu & cols., 1996)

II.1 – Objetivos do trabalho 1:

Objetivo geral:

- Estudo da modulação da expressão gênica do canal de sódio CNG-A3 pela aldosterona em rim de rato.

Objetivos específicos:

- 1- Estudar a distribuição do RNAm do CNG-A3 ao longo do néfron de ratos.
- 2- Avaliar se o RNAm do CNG-A3 é modulado em rim total e em segmentos dissecados do néfron de ratos submetidos a dietas com concentrações variadas de NaCl.
- 3- Avaliar a modulação do RNAm do CNG-A3 adrenalectomizados e adrenalectomizados com reposição de aldosterona.
- 4- Avaliar a modulação do RNAm do CNG-A3 em segmentos dissecados do néfron de ratos submetidos ao tratamento com furosemida.
- 5- Avaliar a modulação da expressão da proteína correspondente ao CNG-A3 em rim de ratos submetidos a dietas com diferentes concentrações de sódio.

II.2 – Objetivos do trabalho 2:

Objetivo geral:

- Estudo da modulação da expressão gênica do canal de cloreto CFTR em cólon proximal de ratos e em células CaCo-2 pelo FAN.

Objetivos específicos:

Estudo *in vitro*:

- 1- Avaliar a modulação da expressão gênica do canal de cloreto CFTR pelos hormônios aldosterona, HAD e FAN em células CaCo-2.
- 2- Avaliar a modulação gênica do RNAm do CFTR em células CaCo-2 tratadas com diferentes concentrações de FAN.
- 3- Analisar a participação do GMPc na modulação da expressão gênica do CFTR pelo FAN.
- 4- Investigar a possível regulação da transcrição do gene CFTR pela ação do FAN através do estudo da região promotora.
- 5- Avaliar a modulação da expressão da proteína correspondente ao CFTR em células CaCo-2 pelo FAN

Estudo *in vivo*:

- 1- Avaliar a modulação da expressão gênica do CFTR em cólon proximal de ratos submetidos a expansão de volume.
- 2- Avaliar a modulação da expressão gênica do CFTR em cólon proximal de ratos submetidos a tratamento com FAN sintético.

Muitos fatores endócrinos e parácrinos podem modular a excreção urinária de sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) através da ação sobre os transportadores iônicos presentes no epitélio renal, modulando, conseqüentemente, a reabsorção de água neste epitélio (Johnston & cols., 1993; Agarwal & Mirshahi, 1999). Dentre os vários tipos de transportadores iônicos, destacamos os canais que são proteínas presentes na membrana plasmática das células e que participam no transporte transcelular de íons em diferentes tipos de epitélios.

Alterações nas concentrações plasmáticas e locais de substâncias natriuréticas (fator atrial natriurético, bradicinina, adenosina) e antinatriuréticas (angiotensina II, hormônio antidiurético, aldosterona, hormônio tireóideos) estão associadas a modificações na atividade e na expressão dos diferentes transportadores e, conseqüentemente, podem levar a mudanças do volume extracelular (Repke & cols., 1995; Morales & cols., 1996). No rim, um dos mais importantes hormônios envolvido com a regulação do volume do fluido extracelular (VFEC), a aldosterona, leva a um aumento da reabsorção renal de Na^+ atuando através de canais epiteliais (ENaC) nos túbulos distal e coletor, enfatizando a importância dos canais de Na^+ na regulação do VFEC, assim como da pressão arterial (Cowley & Roman, 1996; Garty & Palmer, 1997). Além do ENaC, outros canais de Na^+ estão abundantemente expressos em células do epitélio renal, incluindo o *cyclic nucleotide-gated channel* (CNG) que, de maneira semelhante ao ENaC, poderia também ser modulado em condições de variação do VFEC (Garty & Palmer, 1997).

Como foi demonstrado nesta tese, o RNAm do canal de sódio CNG, isoforma A3 (CNG-A3) está expresso em todos os segmentos dissecados do néfron de rato, exceto em alça fina de Henle (Trabalho 1, figura 2). A primeira evidência

molecular de que o rim expressa o gene relacionado à família de canais CNG foi demonstrado por Ahmad e colaboradores, em 1990. Quatro anos mais tarde, Biel e colaboradores isolaram o DNA complementar que codifica para um canal da família CNG em rim bovino, com uma seqüência de aminoácidos muito semelhante a do canal de sódio CNG-A3, encontrado primariamente em cones fotorreceptores de aves, sendo posteriormente também detectado em rim de várias outras espécies de animais (Karlson & cols., 1995). A presença de canais de sódio CNG tem sido demonstrada por outros autores em todos os segmentos do néfron por estudos de eletrofisiologia, RT-PCR e *western blot* (McCoy & cols., 1995; Vandorpe & cols., 1997). Nosso trabalho mostra sistematicamente a distribuição do CNG-A3 ao longo do néfron e sua expressão em quase todos os segmentos indica que possa ter uma importante participação no transporte transepitelial de íons. Apesar da maioria dos canais de Na^+ serem encontrados mais comumente em túbulo distal de néfron, fomos capazes de observar grande expressão do RNAm do canal CNG-A3 em túbulo proximal de rato, o que poderia indicar sua participação na reabsorção de Na^+ neste segmento, uma vez que, aproximadamente 60 % do Na^+ filtrado no glomérulo é reabsorvido neste segmento do néfron.

Os canais CNG localizados ao longo do néfron têm propriedades biológicas semelhantes aos encontrados em bastonetes da retina, apresentando relação voltagem-corrente linear, permeabilidade ao Na^+ e K^+ semelhantes e, uma condutância de 28 pS (Stanton, 1991; Kaupp & Koch, 1992). Todavia, algumas características distintas entre eles também foram observadas, tais como, a inibição do canal CNG pelo GMPc, e aumento da sua atividade pela elevação dos níveis de cálcio, contrariamente aos resultados encontrados em bastonetes da retina, onde eles são estimulados pelo GMPc e inibidos por aumentos dos níveis de cálcio

(Stanton, 1991; Kaupp & Koch, 1992). Muito embora estudos bioquímicos e eletrofisiológicos tenham demonstrado que os canais CNG têm uma importante participação na tradução de sinais sensoriais, incluindo a visão e o olfato, o papel do canal de sódio CNG-A3 no epitélio renal ainda não foi estabelecido. Nossos resultados mostraram aumento da expressão do RNAm e da proteína do CNG-A3 em rim total de ratos tratados com dieta hipossódica, comparados com animais tratados com dieta hipersódica (Trabalho 1, figuras 1 e 3). Demonstramos também que essas variações, observadas em rim total, foram resultado de mudanças nos níveis de expressão do RNAm dada principalmente na porção cortical espessa ascendente da alça de Henle (cTAL) e ducto coletor cortical (DCC) (Trabalho 1, figura 2). Estes segmentos (cTAL e CCD) são conhecidos por serem os sítios de ação de hormônios, tais como a angiotensina II, fator atrial natriurético (FAN), hormônio antidiurético (HAD) e aldosterona (Yucha & Keen, 1996; Garty & Palmer, 1997). Esses resultados sugerem que o CNG-A3, de alguma forma, possa estar envolvido no transporte de Na^+ renal em situações de variação de VFEC.

A diminuição da expressão do RNAm e da proteína do CNG-A3 que observamos em ratos submetidos a dieta hipersódica, poderia ser atribuída à influência de diferentes hormônios relacionados à regulação do VFEC, ou também, por mudanças na tonicidade secundária ao procedimento realizado (Burg & cols., 1997). Animais submetidos a dieta hipersódica aumentam o VFEC, pois aumentos das concentrações plasmáticas de Na^+ atraem osmoticamente moléculas de água aumentando o volume deste compartimento. Nessa situação, o FAN é liberado pelo estiramento das células atriais, sendo que a secreção de aldosterona pelo córtex da glândula adrenal encontra-se inibida. É sabido que, o FAN, inibe completamente a reabsorção de sódio em ducto coletor medular interno (IMCD) através do bloqueio

do transporte através dos canais epiteliais de Na^+ sensíveis a amilorida (ENaC). Esta inibição é produzida nas células do IMCD pelo aumento do GMPc, segundo mensageiro do FAN, processo realizado por um mecanismo semelhante à inibição destes canais produzida pelo diurético amiloride (Zeidel, 1993; Kizer & cols., 1995; Stanton, 1991). Poderíamos sugerir então, que os canais de Na^+ CNG-A3, em epitélio renal, tenham tanto sua atividade inibida (como demonstrado por McCoy e colaboradores, em 1995) como também sua expressão modulada por este hormônio. Outros trabalhos corroboram os mesmos resultados onde foi demonstrado que o FAN é capaz de modular a expressão de outros genes como da fosfolipase D e do heme oxigenase-I entre outros (Peivandi & cols., 2005; Kiemer & cols., 2003). Futuros estudos devem ser ainda realizados para demonstrar definitivamente o possível envolvimento do FAN na regulação da expressão do canal de sódio CNG-A3 em rim de rato.

Outro dado importante ainda extraído neste trabalho foi a diminuição da expressão renal do RNAm do CNG-A3 nos segmentos cTAL e CCD de ratos adrenalectomizados e a reversão desta expressão pela reposição da aldosterona, sugerindo que este hormônio possa estar envolvido na expressão gênica deste canal (Trabalho 1, figura 4). No entanto, diferenças significativas na expressão renal do canal CNG-A3 em cTAL e CCD estão presentes em animais tratados com dieta hipossódica, o que leva também a um aumento da concentração de aldosterona plasmática, não foram observadas quando comparadas com animais controles (Trabalho 1, figura 4). Desta maneira, poderíamos especular que, a ausência de aldosterona promove uma diminuição da expressão do canal de Na^+ CNG-A3, especialmente nos segmentos cTAL e CCD de rim de ratos onde receptores de aldosterona estão presentes (Farman & Bonvalet, 1983; Vandewalle & cols., 1981).

Adicionalmente, muitos estudos têm mostrado que mudanças no metabolismo de eletrólitos e água durante o período de 5 a 14 dias induz uma adaptação funcional e estrutural na porção grossa ascendente de Henle e túbulo distal para evitar variações no meio interno (Kaissling, 1982; Stanton & Kaissling, 1988; Ellison, 1989). Essas adaptações levam a aumentos na capacidade de reabsorção tubular e até mudanças estruturais como hipertrofia tubular, com aumento da área da MBL, tamanho e número de mitocôndrias, e aumento da atividade da bomba Na^+/K^+ da MBL (Kaissling, 1982; Stanton & Kaissling, 1988; Ellison, 1989). Assim, mudanças no transporte iônico das células epiteliais, poderiam, por si só, levar a alterações na expressão de RNAm de diferentes genes (Moreno & cols., 1998).

Para avaliar se a modulação observada no RNAm do CNG-A3 em nosso trabalho não foi causada pela alteração do transporte de íons através das células desses epitélios, e sim por ação direta da aldosterona, foram utilizados ratos tratados com o diurético furosemida (Moreno & cols., 1998). Os animais tratados com esta droga em quantidades capazes de inibir o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, sem produzir aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona (10mg/kg) (Hirano & cols., 2000) não mostraram variações na expressão do RNAm do CNG-A3 em cTAL quando comparadas com animais controles (Trabalho 1, figura 5). Contrariamente, o tratamento com 100 mg/kg de furosemida, concentração capaz de inibir o co-transportador e, além disso, aumentar os níveis plasmáticos de aldosterona, pela perda aumentada de volume, produziram um aumento na expressão do RNAm do CNG-A3 no segmento cTAL de ratos, sugerindo a ação direta da aldosterona neste processo (Trabalho 1, figura 5).

A aldosterona também aumenta a atividade da Na^+/K^+ -ATPase aumentando a capacidade de transporte transepitelial (Feraille & cols., 2003). Porém, a atividade dos canais na ML é o fator limitante do movimento de íons transcelular e, aldosterona por sua vez, pode aumentar este transporte nas duas fases da ação deste hormônio. Na primeira fase de ação a aldosterona pode aumentar a probabilidade de abertura destes canais da ML e/ou promover a inserção de novos canais aumentando o número destes (Helman & cols., 1998; Kemendy & cols., 1992). Na segunda fase da ação da aldosterona, que é iniciada após 0,5-1,0 h da ação do hormônio, é produzida a modulação da expressão gênica de proteínas que estimulam o transporte através da membrana celular (Helman & cols., 1998; Kemendy & cols., 1992). A soma de todos nossos resultados sugere que o canal de sódio CNG-A3 possa estar incluído na família de transportadores estimulados pela aldosterona em epitélio renal tendo assim um importante papel na função deste órgão, como proposto no modelo representado na figura 6 do trabalho 1.

Dentre as várias funções do cólon, é destacado o papel do ajuste fino de excreção de eletrólitos e água, como acontece também de maneira semelhante na porção final do néfron. Dessa maneira, fica evidenciada a importância do cólon na manutenção do VFEC, mas os mecanismos envolvidos nesse processo não estão ainda totalmente esclarecidos. É sabido que muitos hormônios e autacóides podem também alterar a função intestinal através da ação sobre a expressão e/ou atividade de transportadores iônicos, principalmente no cólon, influenciando assim a absorção de fluidos (Binder & Sandle, 1994). A ação de hormônios clássicos envolvidos na regulação do VFEC, como a aldosterona, FAN e autacóides liberados localmente, tais como as prostaglandinas (PGs), são importantes para a manutenção da fisiologia normal do trato gastrointestinal (Field & Semrad, 1993). Em casos de doença, por exemplo, as toxinas bacterianas incluindo a toxina termoestável da *Escherichia coli* podem levar a aumento da secreção de Cl^- , HCO_3^- , Na^+ e água dentro do lúmen, instaurando a diarreia (Field & Semrad, 1993; Rolfe, 1999).

O importante papel do canal de cloreto *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) na secreção deste íon é destacado pelo fato de que a secreção intestinal de Cl^- está prejudicada em pacientes com fibrose cística (FC). A FC é caracterizada por anormalidades na secreção de fluidos principalmente nos aparelhos respiratório, digestivo e, outros tecidos tais como ducto biliar, epidídimo e glândulas secretoras. As manifestações desta doença são decorrentes, portanto, de alterações no transporte de eletrólitos e água com acumulação de muco nas vias aéreas e no lúmen intestinal (O'Loughlin & cols., 1991; McCray & cols., 1992). O papel fisiológico do CFTR no epitélio intestinal tem sido mais evidente em estudos realizados em camundongos *knockout* para o gene do CFTR. Estes animais quando em heterozigose para mutações do gene do CFTR, não respondem completamente

aos efeitos de secretagogos comparados com animais normais (Grubb & Boucher, 1999). E, de fato, muitos destes animais morrem de complicações intestinais, o que claramente indica o papel crucial do CFTR neste epitélio (Snouwaert & cols., 1992, Eckman & cols., 1995). Adicionalmente, destacamos também que o CFTR não só atua na secreção de cloreto, mas também regula outras condutâncias, através da interação deste canal com outros canais tais como o ENaC e o ORCC, mencionados anteriormente nesta tese. Em contraste a outros canais de cloreto, como o CLC-2, previamente estudado por nosso grupo (Ornellas & cols., 2002; Morales & cols., 2001), não existe informação disponível sobre a contribuição do CFTR na regulação do VFEC.

Durante a expansão de volume extracelular ocorrem mudanças na concentração plasmática de diferentes hormônios. Nesta situação, por exemplo, as concentrações plasmáticas de aldosterona e angiotensina II são diminuídas, e a concentração plasmática de FAN encontra-se aumentada. Como tem sido amplamente demonstrado, o trato GI é um órgão alvo destes hormônios (Gonzalez & cols., 1998; Sato & cols., 1999; Moreto & cols., 2005). Assim, realizamos então estudos preliminares em células intestinais tumorais humanas (CaCo-2), onde foi observado que o tratamento destas células com FAN aumenta a expressão do RNAm do canal de cloreto CFTR enquanto que, tanto a aldosterona quanto a HAD, não originaram mudanças nos níveis de RNAm deste canal (Anexo, figura 14).

Como é sabido, o FAN atua no rim aumentando a excreção renal de NaCl e água, inibindo também a secreção de renina. Por outro lado, o FAN inibe a secreção de aldosterona pelo córtex da glândula supra-renal. Estes efeitos combinados do FAN são essencialmente gerados para regular o VFEC e a pressão sangüínea (Ballermann & Zeidel, 1992). O FAN reduz também a absorção de Na⁺, água e

dextrose em intestino delgado de ratos (Martinez Seeber & cols., 1986). Em cachorros, Matsushita e colaboradores, em 1991 demonstraram que o FAN suprime a absorção não só de Na^+ e água, como também a de Cl^- no jejuno. Já no intestino grosso, o FAN causa aumento da diferença de potencial de membrana através do cólon proximal e distal (Argenzio & Armstrong, 1993; Moriarty & cols., 1990; Vaandrager & cols., 1992), sugerindo o envolvimento do FAN no transporte iônico neste tecido.

Atuando direta ou indiretamente é sugerido que, canais de cloreto hormônios-sensíveis localizados na membrana apical das células epiteliais, provem um mecanismo que controla a condutância epitelial no trato GI. Assim também, foram demonstrados anteriormente que os efeitos do FAN em cólon de rato são dependentes de cloreto e sensíveis a bloqueadores de canais deste íon. Assim este canal, o CFTR, é um dos prováveis alvos do FAN no cólon, (González Bosc & cols., 2000; Moriarty & cols., 1990). Além disso, poderíamos ainda especular que, o CFTR uma vez expresso no cólon, controle também outras condutâncias iônicas.

Neste trabalho, ratos submetidos a expansão do VFEC mostraram aumento de 60% na expressão do RNAm do CFTR em cólon proximal comparado com animais controles (Trabalho 2, figura 8A). Este aumento está provavelmente relacionado ao aumento da concentração plasmática de FAN como observada em estudos realizados por Kato e colaboradores, em 1986, onde ratos submetidos ao mesmo procedimento apresentaram níveis plasmáticos de FAN aumentados. Adicionalmente, ratos foram submetidos a infusão endovenosa de FAN sintético onde foi observado aumento de 50 % na expressão do RNAm do CFTR em cólon proximal de ratos, demonstrando o possível envolvimento deste hormônio na expressão do canal de cloreto CFTR (Trabalho 2, figura 8B).

In-vitro, utilizando células CaCo-2 como modelo, observamos que o FAN foi capaz de aumentar a expressão do RNAm do CFTR (74 %) com um estímulo máximo observado na concentração de 10^{-9} M, que corresponde a faixa de concentração plasmática de FAN em humanos normais (Ando & cols., 1990; Sagnella, 1998). Esta estimulação foi estatisticamente similar em células tratadas com FAN nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M (Trabalho 2, figuras 1 e 2). Mostrando o mesmo padrão observado quando esse mesmo hormônio modula outros genes como o da heme oxigenase-1 (HO-1) (Kiemer & cols., 2003).

Desta maneira, avaliamos se o aumento, observado na expressão do RNAm do CFTR em células CaCo-2 pelo FAN levava também a alterações nas quantidades da proteína CFTR nestas células. Observamos que, o FAN, na concentração de 10^{-9} M, produz aumento de aproximadamente 4-5 vezes da forma madura (proteína funcional) do CFTR comparada ao grupo não tratado (Trabalho 2, figuras 4 e 5), e aproximadamente de 4 vezes da forma imatura (proteína não funcional) do CFTR (Trabalho 2, figuras 4). A grande estimulação da expressão da proteína comparada com a do RNAm, além de indicar o envolvimento do FAN na modulação da expressão gênica do gene CFTR, poderia indicar também a mediação de um processo pós-transcricional na modulação do FAN sobre este canal.

É importante mencionar que a meia-vida do FAN é de 2 a 5 min, mas a sua ação leva a mudanças intracelulares (segundo mensageiros, expressão de fatores de transcrição, etc) que poderiam mudar a expressão tanto do RNAm quanto da proteína (Wolf & cols., 1995). Três diferentes receptores estão relacionados a diferentes peptídeos natriuréticos. O receptor de peptídeo natriurético tipo A (NPR-A) se une ao FAN com especificidade e grande afinidade. O NPR-B é relativamente mais seletivo para o peptídeo natriurético cerebral que para o FAN quando

comparado com o NPR-A (Takayanagi & cols., 1987). E finalmente, o NPR-C se une ao FAN com grande afinidade, sendo este receptor envolvido no seqüestro e/ou depuração metabólica dos peptídeos natriuréticos. Assim, foi sugerido que o NPR-C encontra-se acoplado à via de tradução de sinal da adenilatociclase com geração de AMPc (Anand-Srivestava & Trachte, 1993). Em nossos resultados, foram observados grandes níveis de expressão do RNAm do NPR-A e NPR-B em células CaCo-2 (Trabalho 2, figura 3), mas, o envolvimento de cada um destes receptores na modulação da expressão do CFTR deve ser ainda esclarecida no futuro. Por outro lado, como foi demonstrado por Waldman e colaboradores em 1984, a ligação do FAN ao NPR-A ou NPR-B produz o aumento do GMPc em vários tipos de tecidos, incluindo em células do cólon. O segundo mensageiro, GMPc, produz a fosforilação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), proteína que leva a estimulação ou inibição de diferentes processos, e que efetivamente regula a condutância do canal de cloreto CFTR (Gonzalez Bosc & cols., 2000; Lin & cols., 1992). Adicionalmente, foi demonstrado que o GMPc está envolvido no controle da expressão gênica atuando sobre diferentes promotores de genes ou também controlando a atividade de fatores de transcrição como AP-1, c-jun N-terminal quinase, etc. (Kiemer & cols., 2003; Pilz & Casteel, 2003).

Nossos experimentos realizados com GMPc demonstraram que esse segundo mensageiro modula a expressão gênica do canal de cloreto CFTR em células CaCo-2 de maneira similar ao observado com FAN sem a adição de GMPc (Trabalho 2, figura 6). Adicionalmente, o tratamento conjunto das células CaCo-2 com o FAN e GMPc mostrou não ter propriedade aditiva, indicando que tanto o FAN quanto o GMPc estariam modulando a expressão do CFTR pela mesma via. Observamos também que as modulações obtidas pelo FAN ou pelo GMPc foram totalmente

abolidas pela utilização de um inibidor de GMPc (Trabalho 2, figura 6). Assim, nós evidenciamos que o FAN via GMPc, é capaz de estimular a expressão gênica do canal de cloreto CFTR em células CaCo-2. Por outro lado, não poderíamos descartar a possibilidade de que o GMPc possa estar inibindo a ação de fosfodiesterasas permitindo um aumento do AMPc, segundo mensageiro também capaz de regular a condutância do canal de cloreto CFTR e a sua expressão (McDonald & cols., 1995), potencializando a ação do GMPc sobre a modulação gênica deste canal.

Além disto, um modelo *in-vitro* ajudou também a evidenciar se o processo envolvido no aumento do RNAm do CFTR nas células CaCo-2 tratadas com FAN era produto do estímulo da transcrição gênica. Ensaio utilizando o gene repórter luciferase ligado ao promotor do gene CFTR, demonstraram que o promotor do CFTR tem uma moderada resposta ao FAN, sugerindo que este hormônio possa modular o número de canais de cloreto CFTR na membrana celular por um efeito direto sobre a transcrição gênica (Trabalho 2, figura 7). Embora, efeitos regulatórios pós-transcricionais deste hormônio não possam ser descartados, a estabilização do RNAm do CFTR, segundo estudo de Montrose-Rafizadeh e colaboradores, em 1992, não tem grande importância na determinação da abundância do RNAm do CFTR em células do intestino.

A soma de todos esses dados provê evidências convincentes de que o FAN tenha uma importante participação na regulação gênica do CFTR em cólon proximal de ratos e em células intestinais tumorais humanas (CaCo-2), sendo o primeiro trabalho a evidenciar os efeitos do FAN sobre este canal no cólon. Assim, podemos sugerir que o fator atrial natriurético, atuando no transporte iônico no epitélio

intestinal, tenha uma importância fisiológica na regulação do volume do fluido extracelular.

Como foi demonstrado nestes trabalhos, é fato que existe a modulação da expressão gênica do canal de sódio CNG-A3 e do canal de cloreto CFTR em epitélio renal e intestinal, respectivamente, por hormônios envolvidos classicamente com a regulação do volume do fluido extracelular. Os resultados tomados em conjunto sugerem que o canal CNG-A3 possa estar incluído na família de transportadores modulados pela ação da aldosterona na porção cortical espessa ascendente da alça de Henle e duto coletor cortical do epitélio renal. Por outro lado, sugerimos também que o FAN agindo sobre o canal de cloreto CFTR expresso no cólon pode participar na regulação do volume do fluido extracelular.

Pela primeira vez na literatura, portanto, foi evidenciada a participação desses dois canais na regulação do volume do fluido extracelular, destacando suas importâncias fisiológicas.

- Abraham EH, Okunieff P, Scala S, Vos P, Oosterveld MJS, Chen AY & Shrivastav B (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and adenosine triphosphate. *Science*, **275**:1324-1325.
- Agarwal MK & Mirshahi M (1999) General overview of mineralocorticoid hormone action. *Pharmacol Ther*, **84**:273-326.
- Ahmad I, Redmond LJ & Barnstable CJ (1990) Developmental and tissue-specific expression of the rod photoreceptor cGMP-gated ion channel gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **173**:463-470.
- Aires MM (1999a) Mecanismos de transporte no túbulo proximal. Em: *Fisiologia*, 2ª edição (Aires MM, ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p 601-608.
- Aires MM (1999b) Mecanismos de transporte no néfron distal. Em: *Fisiologia*, 2ª edição (Aires MM, ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p 609-612.
- Anand-Srivastava MB & Trachte GJ (1993) Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev*, **45**:455-497.
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE & Welsh MJ (1991a) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alterations of its anion selectivity. *Science*, **253**:202-205.
- Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE & Welsh MJ (1991b) Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*, **67**:775-784.
- Ando K, Hirata Y, Emori T, Shichiri M, Kurosawa T, Sato K & Marumo FJ (1990) Circulating forms of human atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*, **70**:1603-1607.
- Argenzio RA & Armstrong M (1993) ANP inhibits NaCl absorption and elicits Cl secretion in porcine colon: evidence for cGMP and Ca⁺⁺ mediation. *Am J Physiol*, **265**:R57-65.
- Aronson PS (1996) Role of ion exchangers in mediating NaCl transport in the proximal tubule. *Kidney Int*, **49**:1665-1670.

- Aronson PS & Giebisch G (1997) Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol*, **273**:F179-192.
- Arreola J, Melvin JE, Begenisich T (1995) Volume-activated chloride channels in rat parotid acinar cells. *J Physiol (Lond)*, **184**:677-687.
- Ballermann BJ & Zeidel ML (1992) Atrial natriuretic hormone. Em: The kidney: Physiology and pathophysiology, 2^a edição (Seidin, DW & Giebisch G, eds) Raven Press Ltd, New York, USA, p 1843-1874.
- Bankir L, Bouby N & Trinh-Trang-Tan MM (1989) The role of the kidney in the maintenance of water balance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **3**:249-311.
- Barbry P & Hofman P (1997) Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am J Physiol*, **273**:G571-G585.
- Baukowitz T, Hwang TC, Nairn AC & Gadsby DC (1994) Coupling of CFTR Cl⁻ channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron*, **12**:473-482.
- Becq F, Jensen TJ, Chang X-B, Savoia A, Rommens JM, Tsui, L-C, Buchwald M, Riordan JR & Hanrahan JW (1994) Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**:9160-9164.
- Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, Mulligan RC, Smith AE & Welsh MJ (1991) Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J Clin Invest*, **88**:1422-1431.
- Berger HA, Travis SM & Welsh MJ (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem*, **268**:2037-2047.
- Biel M, Zong X, Disther M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockevzi V & Hofmann F (1994) Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney and heart. *Proc Natl Acad Sci*, **91**:3505-3509.
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sawtter A & Hofmann F (1996) Molecular cloning and expression of a modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel. *J Biol Chem*, **271**:6349-6355.

- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A & Hofmann F (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**:151-171.
- Binder HJ & Sandle GI (1994) Electrolyte transport in the mammalian colon. Em: Physiology of the gastrointestinal tract, 3^a edição (Johnson LR, ed.) Raven Press, New York, USA, p 2133-2172.
- Booth RE, Johnson JP & Stockand JD (2002) Aldosterone. *Adv Physiol Educ*, **26**:8-20.
- Bormann J, Hammil OP & Sakmann B (1987) Mechanisms of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons. *J Physiol (Lond)*, **385**: 243-286.
- Bradley J, Reiser J & Frings S. (2005) Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol*, **15**:343-349.
- Breyer MD & Ando Y (1994) Hormonal signaling and regulation of salt and water transport in the collecting duct. *Annu Rev Physiol*, **56**:711-739.
- Briel M, Greger R & Kunzelman K (1998) Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (EnaCs) in *Xenopus oocytes* coexpressing CFTR and ENaC. *J Physiol*, **508**:825-836.
- Brochner-Mortensen J (1982) The extracellular fluid volume in normal man determined as the distribution volume of [51Cr] EDTA. *Scand J Clin Lab Invest*, **42**:261-264.
- Brown MJ & Haydock S (2000) Pathoetiology, epidemiology and diagnosis of hypertension. *Drugs*, **59**:39-40.
- Burg MB, Grantham J, Abramow M, Orloff J & Schafer JA (1997) Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons, *J Am Soc Nephrol*, **8**:675– 683.
- Carson MR & Welsh MJ (1995) Structural and functional similarities between the nucleotide-binding domains of CFTR and GTP-binding proteins. *Biophys J*, **69**:2443-2448.

- Carson MR, Travis SM & Welsh MJ (1995) The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem*, **270**:1711–1717.
- Chang EB (1996) Intestinal water and electrolyte absorption and secretion. *Transplant Proc*, **28**:2679-2682.
- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ & Smith AE (1991) Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, **66**:1027-1036.
- Chow V & Cheung AP (2006) Male infertility. *J Reprod Med*, **51**:149-156.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C & Anderson JM (2002) Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**:C142-147.
- Cowley AW Jr & Roman RJ (1996) The role of the kidney in hypertension. *JAMA*, **275**:1581-1589.
- Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL & Smith CE (1992) Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**:947-951.
- Dantzler WH (2003) Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **136**:453-478.
- Dzau VJ, Burt DW & Pratt RE (1988) Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol*, **255**:F563-573.
- Eckman EA, Cotton CU, Kube DM & Davis PB (1995) Dietary changes improve survival of CFTR S489X homozygous mutant mouse. *Am J Physiol*, **269**:L625-L630.
- Ellison DH, Velazquez H & Wright FS (1989) Adaptation of the distal convoluted tubule of the rat: structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J Clin Invest*, **83**:113-126.

- Farman N & Bonvalet JP (1983) Aldosterone binding in isolated tubules. III. Autoradiography along the rat nephron. *Am J Physiol*, **245**:F606-614.
- Feraille E, Mordasini D, Gonin S, Deschenes G, Vinciguerra M, Doucet A, Vandewalle A, Summa V, Verrey F & Martin PY (2003) Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Ann N Y Acad Sci*, **986**:570-578.
- Field M & Semrad CE (1993) Toxicogenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu Rev Physiol*, **55**:631-655.
- Gadsby DC & Nairn AC (1994) Regulation of the CFTR channel gating. *Trends Biochem Sci*, **19**:513-518.
- Gadsby DC & Nairn AC (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev*, **79**:S77-S107.
- Garty H & Palmer LG (1997) Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev*, **77**:2359-2396.
- Geibel JP (2005) Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu Rev Physiol*, **67**:471-490.
- Gilman AG (1987) G proteins transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, **56**:615-649.
- Gonzalez Bosc LV, Vidal NA, Prieto R & Tur JA (1998) Effect of atrial natriuretic peptide on alpha-methyl-D-glucoside intestinal active uptake in rats. *Peptides*, **19**:1249-1253.
- Gonzalez Bosc LV, Majowicz MP & Vidal NA (2000) Effects of atrial natriuretic peptide in the gut. *Peptides*, **21**:875-887.
- Gower WR Jr, Dietz JR, Vesely DL & Finley CL (1994) Atrial natriuretic peptide gene expression in the rat gastrointestinal tract. *Biochem Biophys Res Commun*, **202**:562-570.
- Greger R (1985) Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev*, **65**:760-797.

- Greger R, Mall M, Bleich M, Ecke D, Warth R, Riedemann N & Kunzelmann K (1996) Regulation of epithelial ion channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Mol Med*, **74**(9):527-534.
- Greger R (2000) Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol*, **62**:467-491.
- Grubb BR & Boucher RC (1999) Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev*, **79**:S193–S214.
- Grygorczyk R, Tabcharani JA & Hanrahan JW (1996) CFTR channels expressed in CHO cells do not have detectable ATP conductance. *J Membr Biol*, **151**:139-148.
- Gunderson KL & Kopito RR (1994) Effects of pyrophosphate and nucleotide analogs suggest a role for ATP hydrolysis in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gating. *J Biol Chem*, **269**:19349-19353.
- Guthrie D & Yucha C (2004) Urinary concentration and dilution. *Nephrol Nurs J*, **31**:297-301.
- Haas M (1989) Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu Rev Physiol*, **51**:443-457.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D & Taugner R (1990) Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*, **70**:1067-1116.
- Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag MC, Lingappa V & Verkman AS (1992) A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science*, **258**:1477-1479.
- Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N & Mulvany MJ (1993) Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*, **21**:391-397. Review.
- Hebert SC (1999) Molecular mechanisms. *Semin Nephrol*, **19**:504-523.
- Helman SI, Liu X, Baldwin K, Blazer-Yost BL & Els WJ (1998) Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive ENaCs in A6 epithelia. *Am J Physiol*, **274**:C947-957.

- Hervieu G, Volant K, Grishina O, Descroix-Vagne M & Nahon JL (1996) Similarities in cellular expression and functions of melanin-concentrating hormone and atrial natriuretic factor in the rat digestive tract. *Endocrinology*, **137**:561-571.
- Higgins CF (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res Microbiol*, **152**:205-210.
- Hirano T, Yamamura Y, Nakamura S, Onogawa T & Mori T (2000) Effects of the V(2)-receptor antagonist OPC-41061 and the loop diuretic furosemide alone and in combination in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **292**:288-294.
- Holliday MA (1999) Extracellular fluid and its proteins: dehydration, shock, and recovery. *Pediatr Nephrol*, **13**:989-995.
- Hwang TC, Horie M & Gadsby DC (1993) Functionally distinct phospho-forms underlie incremental activation of protein kinase-regulated Cl⁻ conductance in mammalian heart. *J Gen Physiol*, **101**:629-650.
- Ismailov II, Wayda A, Jovov MS, Beadie BK, Fuller CM, Didman JR, Koetzel M & Benos DJ (1996) Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **271**:4725-4732.
- Ismailov II, Berdiev BK, Shlyonsky VG, Fuller CM, Prat AG, Jovov B, Cantiello HF, Ausiello DA & Benos DJ (1997) Role of actin in regulation of epithelial sodium channels by CFTR. *Am J Physiol*. **272**:C1077-1086.
- Jia Y, Mathews CJ & Hanrahan JW (1997) Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem*, **272**:4978-4984.
- Johnson LR (1997) Fluid and electrolyte absorption. Em: Gastrointestinal physiology, 5^a edição (Johnson LR & Gerwin TA, eds) Mosby-Yearbook, Philadelphia, USA, p 135-145.
- Johnston CI, Fabris B & Jandeleit K (1993) Intrarenal renin-angiotensin system in renal physiology and pathophysiology. *Kidney Int Suppl*, **42**:S59-S63.

- Kaissling B (1982) Structural aspects of adaptive changes in renal electrolyte excretion. *Am J Physiol*, **243**:F211-F226.
- Kaplan MR, Mount DB & Delpire E (1996) Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu Rev Physiol*, **58**:649-668.
- Karlson KH, Ciampolillo-Bates F, McCoy DE, Kizer NL & Stanton BA (1995) Cloning of a cGMP-gated cation channel from mouse kidney inner medullary collecting duct. *Biochim Biophys Acta*, **1236**:197-200.
- Kaupp UB & Koch KW (1992) Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu Rev Physiol*, **54**:153-175.
- Kaupp UB & Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, **82**:769-824.
- Kemendy AE, Kleyman TR & Eaton DC (1992) Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. *Am J Physiol*, **263**:C825-837.
- Kiemer AK, Bildner N, Weber NC & Vollmar AM (2003) Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells. *Endocrinology*, **144**:802-812.
- Kizer NL, Lewis B & Stanton BA (1995) Electrogenic sodium absorption and chloride secretion by an inner medullary collecting duct cell line (mIMCD-K2). *Am J Physiol*, **268**:F347-355.
- Knepper MA & Brooks HL (2001) Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **10**:655-659.
- Ko YH & Pedersen PL (1995) The first nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator can function as an active ATPase. *J Biol Chem*, **270**:22093-22096.
- Kunzelmann K, Kiser GL, Schreiber R & Riordan JR (1997) Inhibition of epithelial sodium currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Letters*, **400**:341-344.

- Kunzelmann K (1997) Regulation and amiloride-binding site of epithelial Na⁺ channels. *Kidney Blood Press Res*, **20**:151-153.
- Kunzelmann K & Mall M (2002) Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, **82**:245-289.
- Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, Rommens JM, Galley K & Bear CE (1996) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **271**: 28463-28468.
- Lin M, Nairn AC & Guggino SE (1992) cGMP-dependent protein kinase regulation of a chloride channel in T84 cells. *Am J Physiol*, **262**:C1304-C1312.
- Linsdell P, Tabcharani JA & Hanrahan JW (1997a) Multi-ion mechanism for ion permeation and block in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Gen Physiol*, **110**:365-377.
- Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou X-Y, Chang X-B, Tsui L-C, Riordan JR & Hanrahan JW (1997b) Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol*, **110**:355-364.
- Linsdell P (2006) Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol*, **91**:123-129.
- Ma J, Zhao J, Drumm ML, Xie J & Davis PB (1997) Function of the R domain in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Biol Chem*, **272**:28133-28141.
- Macknight AD & Leaf A (1977) Regulation of cellular volume. *Physiol Rev*, **57**:510-573.
- Mall M, Hipper A, Greger R & Kunzelmann K (1996) Wild type but not delta F508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus oocytes*. *FEBS Letters*, **381**:47-52.
- Mall M, Bleich M, Kuehr J, Brandis M, Greger R & Kunzelmann K (1999) CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol*, **277**:G709-716.

- Manavalan P, Bearborn DG, Mc Pherson JM & Smith AE (1995) Sequence homologies between nucleotide binding regions of CFTR and G-proteins suggest structural and functional similarities. *FEBS Lett*, **366**:87-91.
- Martinez Seeber A, Vidal NA, Carchio SM & Karara AL (1986) Inhibition of water-sodium intestinal absorption by an atrial extract. *Can J Physiol Pharmacol*, **64**:244-247.
- Matosin-Matekalo M, Mesonero JE, Delezay O, Poiree JC, Ilundains AA & Brot-Laroche E (1998) Thyroid hormone regulation of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 in CaCo-2 cells. *Biochem J*, **334**:633-640.
- Matsushita K, Nishida Y, Hosomi H & Tanaka S (1991) Effects of atrial natriuretic peptide on water and NaCl absorption across the intestine. *Am J Physiol*, **260** R6-12.
- McCoy DE, Guggino SE & Stanton BA (1995) The renal cGMP-gated cation channel: its molecular structure and physiological role. *Kidney Int*, **48**:1125-1133.
- McCray Jr PB, Reenstra WW, Louie E, Johnson J, Bettencourt JD & Bastacky J (1992) Expression of CFTR and presence of α AMP mediated fluid secretion in human fetal lung. *Am J Physiol*, **262**:L472-481.
- McDonald RA, Matthews RP, Idzerda RL & McKnight GS (1995) Basal expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is dependent on protein kinase A activity. *PNAS*, **92**:7560-7564.
- Misaka T, Kusakabe Y, Emori Y, Gono T, Arai S & Abe K (1997) Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *J Biol Chem*, **272**:22623-22629.
- Montrose-Rafizadeh C, Blackmon DL, Hamosh A, Oliva MM, Hawkins AL, Curristin SM, Griffin CA, Yang VW, Guggino WB, Cutting GR & Montrose MH (1992) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcription and alternative RNA splicing in a model of developing intestinal epithelium. *J Biol Chem*, **267**:19299-19305.
- Morales MM, Brucoli HCP, Malnic G & Lopes AG (1996) Role of thyroid hormones in renal tubule acidification. *Mol Cell Biochem*, **154**:17-21.

- Morales MM, Capella MAM & Lopes AG (1999) Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz J Med Biol Res*, **32**:1021-1028.
- Morales MM, Nascimento DS, Capella MA, Lopes AG & Guggino WB (2001) Arginine vasopressin regulates CFTR and CIC-2 mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *Pflugers Arch*, **443**:202-211.
- Moreno G, Merino A, Mercado A, Herrera JP, Gonzalez-Salazar J, Correa-Rotter R, Hebert SC & Gambá G (1998) Electroneutral Na-coupled cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism. *Hypertension*, **31**:1002-1006.
- Moreto M, Cristia E, Perez-Bosque A, Afzal-Ahmed I, Amat C & Naftalin RJ (2005) Aldosterone reduces crypt colon permeability during low-sodium adaptation. *J Membr Biol*, **206**:43-51.
- Moriarty KJ, Higgs NB, Lees M, Tonge A, Wardle TD & Warhurst G (1990) Influence of atrial natriuretic peptide on mammalian large intestine. *Gastroenterology*, **98**:647-653.
- Muller F, Bonigk W, Sesti F & Frings S (1998) Phosphorylation of mammalian olfactory cyclic nucleotide-gated channels increases ligand sensitivity. *J Neurosci*, **18**:164-173.
- Nilius B & Droogmans G (2003) Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand*, **177**:119-147.
- O'Loughlin EV, Hunt DM, Gaskin KJ, Stiel D, Bruzuscak IM, Martin HC, Bambach C & Smith R (1991) Abnormal epithelial transport in cystic fibrosis jejunum. *Am J Physiol*, **260**:G758-763.
- Ornellas DS, Nascimento DS, Christoph DH, Guggino WB & Morales MM (2002) Aldosterone and high-NaCl diet modulate CIC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Archiv*, **444**:193-201.
- Pasyk EA & Foskett JK (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes. *J Biol Chem*, **272**:7746-7751.

- Peivandi AA, Huhn A, Lehr HA, Jin S, Troost J, Salha S, Weismuller T & Loffelholz KJ (2005) Upregulation of phospholipase d expression and activation in ventricular pressure-overload hypertrophy. *Pharmacol Sci*, **98**:244-254.
- Peng C, Rich ED & Varnum MD (2004) Subunit configuration of heteromeric cone cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, **42**:401-410.
- Piccioletto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P & Nairn AC (1992) Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **267**:12742-12752.
- Pilz RB & Casteel DE (2003) Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res*, **93**:1034-1046.
- Qiu W, Lee B, Lancaster M, Xu W, Leung S & Guggino SE (2000) Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium and calcium influx in rat colon. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**:C336-C343.
- Reddy MM, Quinton PM, Haws C, Wine JJ, Grygorczyk C, Wine JJ, Grygorczyk R, Tabcharani JA, Hanrahan JW, Gunderson KL & Kopito RR (1996) Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science*, **271**:1876-1879.
- Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ & Ausiello DA (1994) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem*, **269**:20584-20591.
- Repke KRH, Megges R, Weiland J & Schön R (1995) Location and properties of the digitalis receptor site in Na⁺/K⁺-ATPase. *FEBS Lett*, **359**:107-109. Review.
- Rich DP, Berger HA, Cheng SH, Travis SM, Saxena M, Smith AE & Welsh MJ (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem*, **268**:20259-20267.
- Richards MJ & Gordon SE (2000) Cooperativity and cooperation in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Biochemistry*, **39**:14003-14011.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N & Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**:1066-1073.

- Rolfe V (1999) Colonic fluid and electrolyte transport in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **29**:577-588.
- Rossier BC & Palmer LG (1992) Mechanisms of aldosterone action on sodium and potassium transport. Em: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology* (Seldin DW & Giebisei G, eds) Raven, New York, USA, p.1373-1409.
- Sagnella GA (1998) Measurement and significance of circulating natriuretic peptides in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*, **95**:519–529.
- Sanioto SML (1999) Absorção intestinal. Em: *Fisiologia*, 2ª edição (Aires MM, ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p 689-738.
- Sato Y, Hanai H, Nogaki A, Hirasawa K, Kaneko E, Hayashi H & Suzuki Y (1999) Role of the vasopressin V(1) receptor in regulating the epithelial functions of the guinea pig distal colon. *Am J Physiol*, **277**:G819-828.
- Schwiebert EM, Egan ME, Hwang T-H & Guggino WB (1995) CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell*, **223**:134-141.
- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME & Guggino WB (1998) Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:2674-2679.
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ & Guggino WB (1999) CFTR is a Conductance Regulator as well as a Chloride Channel. *Physiol Rev*, **79**:S145-166.
- Sheppard DN & Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*, **79**:S23-45.
- Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ & Hunt JF (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, **10**:139-149.

- Snouwaert J, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O & Koller BH (1992) An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science*, **257**:1083-1088.
- Spring KR (2002) Focus on "Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**:C29-30.
- Stanton BA & Kaissling B (1988) Adaptation of distal tubule and collecting duct to increased Na⁺ delivery, II: Na⁺ and K⁺ transport. *Am J Physiol*, **255**:F1269-1275.
- Stanton BA (1991) Molecular mechanisms of ANP inhibition of renal sodium transport. *Can J Physiol Pharmacol*, **69**:1546-1552.
- Stanton BA (1997) Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and renal function. *Wien Klin Wochenscher*, **109**:457-464.
- Stanton BA & Koeppen BM (2004) Transporte de solutos e água ao longo do nefro: Função tubular. Em: Fisiologia, 5ª edição (Berne RM, Levy MN, Koeppen BM & Stanton BA, eds.) Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil, p 683-699.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC & Boucher RC (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, **269**:847-850.
- Sugita M, Yue Y & Foskett JK (1998) CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J*, **17**:898-908.
- Tabcharani JA, Low W, Elie D & Hanrahan JW (1990) Low-conductance chloride channel activated by cAMP in the epithelial cell line T84. *FEBS LETT*, **270**:157-164.
- Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR & Hanrahan JW (1991) Phosphorylation regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature*, **352**:628-631.
- Takayanagi R, Snajdar RM, Imada T, Tamura M, Pandey KN, Misono KS & Inagami T (1987) Purification and characterization of two types of atrial natriuretic factor receptors from bovine adrenal cortex: guanylate cyclase-linked and cyclase-free receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, **144**:244-250.

- Tien XY, Brasitus TA, Kaetzel MA, Dedman JR & Nelson DJ (1994) Activation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by cGMP in the Human Colonic Cancer Cell Line, CaCo-2. *J Biol Chem*, **269**:51-54.
- Tilly BC, Winter MC, Ostergaard LS, Riordan C, Smith AE & Welsh MJ (1992) Cyclic AMP-dependent protein kinase activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in planar lipid bilayers. *J Biol Chem*, **267**:9470-9473.
- Vaandrager AB, Bot AG, De Vente J & De Jonge HR (1992) Atriopeptins and *Escherichia coli* enterotoxin STa have different sites of action in mammalian intestine. *Gastroenterology*, **102**:1161-1169.
- Vaandrager AB, Smolenski A, Lohmann SM & De Jonge HR (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for CFTR Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:1466-1471.
- Vandewalle A, Farman N, Bencsath P & Bonvalet JP (1981) Aldosterone binding along the rabbit nephron: an autoradiographic study on isolated tubules. *Am J Physiol*, **240**:F172-179.
- Vandorpe DH, Ciampolillo F, Green RB & Stanton BA (1997) Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium absorption by IMCD (mIMCD-K2) cells. *Am J Physiol*, **272**:C901-910.
- Venglarik CJ, Schultz BD, Frizzell RA & Bridges RJ (1994) ATP alters current fluctuations of CFTR: evidence for a three state activation mechanism. *J Gen Physiol*, **104**:123-146.
- Waldman SA, Rapoport RM & Murad F (1984) Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem*, **259**:14332-14334.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ & Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, **1**:945-951.
- Wang L & Freedman SD (2002) Laboratory tests for the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Clin Pathol*, **117**:S109-115.

- Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF & Beaudet AL (1995) *Em: The metabolic and molecular basis of inherited disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS & Valle D, eds). McGraw – Hill, New York, USA, p 3799-3876.
- Winter MC, Sheppard DN, Carson MR & Welsh MJ (1994) Effect of ATP concentration on CFTR Cl⁻ channels: a kinetic analysis of channel regulation. *Biophys J*, **66**:1398-1403.
- Winter MC & Welsh MJ (1997) Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature*, **389**: 294-296.
- Wolf G, Ziyadeh FN & Stahl RA (1995) Atrial natriuretic peptide stimulates the expression of transforming growth factor-beta in cultured murine mesangial cells: relationship to suppression of proliferation. *J Am Soc Nephrol*, **6**:224-233.
- Yucha C & Keen M (1996) Renal regulation of extracellular fluid volume and osmolality. *ANNA J*, **23**:487-497.
- Yucha C (2004) Renal regulation of acid-base balance. *Nephrol Nurs J*, **31**:201-206.
- Zeidel ML (1993) Hormonal regulation of inner medullary collecting duct sodium transport. *Am J Physiol*, **265**:F159-173.

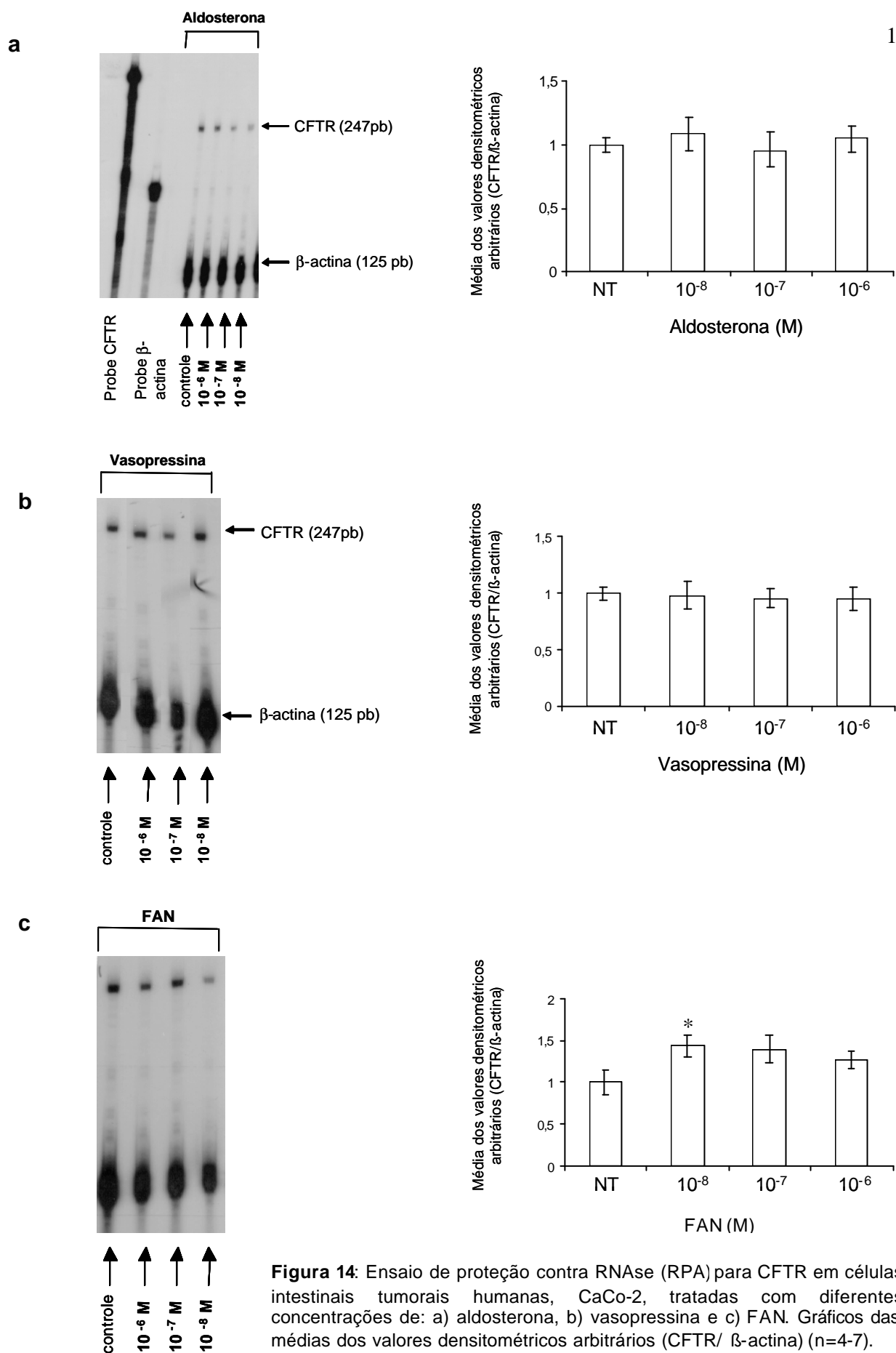


Figura 14: Ensaio de proteção contra RNase (RPA) para CFTR em células intestinais tumorais humanas, CaCo-2, tratadas com diferentes concentrações de: a) aldosterona, b) vasopressina e c) FAN. Gráficos das médias dos valores densitométricos arbitrários (CFTR/ β -actina) (n=4-7).

Modulation of renal CNG-A3 sodium channel in rats subjected to low- and high-sodium diets

Horacio J. Novaira^a, Bruno F. Botelho^a, Regina C. Goldenberg^a,
Sandra E. Guggino^b, Marcelo M. Morales^{a,*}

^a*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS-Bloco G, CEP 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

^b*Department of Medicine-Gastroenterology of the Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA*

Received 5 March 2004; received in revised form 29 June 2004; accepted 29 June 2004

Available online 21 July 2004

Abstract

In this work, we studied the mRNA distribution of CNG-A3, an amiloride-sensitive sodium channel that belongs to the cyclic nucleotide-gated (CNG) family of channels, along the rat nephron. The possible involvement of aldosterone in this process was also studied. We also evaluated its expression in rats subjected to diets with different concentrations of sodium or to alterations in aldosterone plasma levels. Total RNA isolated from whole kidney and/or dissected nephron segments of Wistar rats subjected to low- and high-sodium diets, furosemide treatment, adrenalectomy, and adrenalectomy with replacement by aldosterone were analyzed by the use of Western blot, ribonuclease protection assay (RPA) and/or reverse transcription followed by semi-quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). CNG-A3 sodium channel mRNA and protein expression, in whole kidneys of rats subjected to high- Na^+ diet, were lower than those in animals given a low-salt diet. Renal CNG-A3 mRNA expression was also decreased in adrenalectomized rats, and was normalized by aldosterone replacement. Moreover, a CNG-A3 mRNA expression study in different nephron segments revealed that aldosterone modulation is present in the cortical thick ascending loop (cTAL) and cortical collecting duct (CCD). This result suggests that CNG-A3 is responsive to the same hormone signaling as the amiloride sensitive sodium channel ENaC and suggests the CNG-A3 may have a physiological role in sodium reabsorption. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Aldosterone; CNG-A3; Sodium channel; Nephron; Sodium reabsorption; Kidney; mRNA; RPA; RT-PCR

1. Introduction

The extracellular fluid volume (ECFV) regulation is determined by the balance between ingestion and excretion of sodium, the most abundant ion in the extracellular compartment. Renal sodium excretion control is essential for sodium ion balance. Most of the sodium filtered in the glomeruli is reabsorbed along the nephron. In the proximal tubule, Henle's loop and distal tubule, sodium reabsorption is proportional to the filtered load [1]. On the other hand, in the renal collecting tubule, composed of the cortical, outer medullary and inner medullary segments, sodium reabsorp-

tion is highly regulated, in order to maintain body sodium and total ECFV [1]. The main sites of aldosterone action in the kidney are the thick ascending limb (TAL), the distal tubule (DT) and the collecting ducts (CD) [2], where aldosterone acts to increase sodium reabsorption. This hormone, released by the adrenal cortex, is dependent on the renin-angiotensin system that modulates the function and expression of different renal transporters [3–6] including the amiloride-sensitive channel ENaC [7,8].

The cyclic nucleotide-gated channel isoform A-three (CNG-A3) is a channel that is amiloride and L-*cis*-diltiazem sensitive that was originally cloned from bovine kidney [9]. This channel is a member of the cyclic nucleotide-gated (CNG) channel family that has a heteromultimer structure consisting of “principal” and “modulatory” subunits [10–12]. The principal subunits form functional channels when

* Corresponding author. Fax: +55 21 2290 9193.

E-mail address: mmorales@biof.ufrj.br (M.M. Morales).

expressed alone in heterologous expression systems, whereas the modulatory subunits do not give rise to a cGMP activated current per se, but when coexpressed with principal subunits, they confer channel properties characteristic of native CNG channels such as increased sensitivity to cyclic nucleotides and channel blockers [13]. Although it is not clear if the CNG-A3 channel is also co-assembled with a modulatory subunit in the kidney, the cloning of A-three variants of CNG channel subunits in the kidney suggest that the functional properties of the CNG-A3 channel could be modulated by other CNG subunits in vivo [14]. It has been suggested that CNG-B1 forms functional hetero-oligomeric channels with CNG-A3 in vitro and may also do so in intact tissues [14].

CNG channels are expressed in several tissues. cDNA encoding the CNG-A3 cation channel have been cloned from retina cone cells, testis, colon, pineal gland, adrenal, heart, sperm, brain, and in renal epithelia [10,11,13]. Electrophysiological and biochemical approaches have demonstrated that CNG channels play a key role in sensory signal transduction including vision and smell [15–17]. When cDNA were isolated from several other tissues, it became evident what CNG channels may be involved in a variety of functions in addition to sensory signal transduction [13]. Functional transport assays suggest that these channels mediate transepithelial transport of calcium and sodium across the proximal and distal colon [18].

In the kidney, CNG-A3 channels share many biophysical and molecular properties of the retinal rod CNG-gated channel. However, unlike the retinal rod channel, one clone of the CNG channel in the kidney is inhibited by cyclic GMP and stimulated by increased calcium levels [13]. In different species, the CNG-gated channels have been identified in all nephron segments using electrophysiological methods [13]. Specifically in the inner medullary collecting duct, an amiloride-sensitive cation channel was shown to be involved in electrogenic sodium transport, which is inhibited by the atrial natriuretic peptide (ANP) via cyclic GMP [19]. These experimental results suggested that CNG-A3 might have an important physiological role in the renal function and regulation of ECVF, through the adjustment of sodium reabsorption along the nephron.

The aim of our work was to study the distribution of CNG mRNA along the nephron, focusing on the CNG-A3 principal subunit with particular attention to the expression in rats subjected to low- and high-sodium diets. We also wished to know whether this channel was regulated by aldosterone in a similar manner to ENaC.

2. Materials and methods

2.1. Animal preparation

The Ethics Committee from The Biophysics Institute, Federal University of Rio de Janeiro, previously approved

all procedures and protocols using animals mentioned in this manuscript.

2.1.1. Rats given a high- or low- Na^+ diet

Wistar male rats with 150–250 g body weight were divided into three groups. The first group (control) was maintained on a normal diet of 3 g/kg NaCl; the second group received a low-sodium diet of 0.02 g/kg NaCl and normal drinking water for 14 days (low- Na^+); the third group were fed a high-sodium diet containing 8 g/kg NaCl and drinking water with 9 g/l NaCl for 5 days (high- Na^+) [20–22]. To monitor the electrolyte balance and glomerular filtration rate (GFR), blood and urine samples were taken prior to sacrifice and, urine and serum concentrations of K^+ , Na^+ , Cl^- and creatinine were measured to allow the calculation of electrolytes fractional excretion (FE) and GFR in each experimental group as described before [23]. The urine was collected during the 24 h preceding the decapitation to determine the urinary flow. The electrolytes FE and the GFR were obtained from: $\text{FE} (\%) = [(U_x \times V) / (GFR \times P_x)] \times 100$ and, $\text{GFR} = (U_{\text{cr}} \times V) / P_{\text{cr}}$ relative to kg weight; where U_x : electrolyte urinary concentration (mg/ml), P_x : electrolyte plasma concentration (mg/ml), U_{cr} : creatinine urinary concentration (mg/ml), P_{cr} : creatinine plasma concentration (mg/ml) and, V : urine flow ($\text{ml} \times \text{min}^{-1}$).

2.1.2. Rats subjected to adrenalectomy

Male Wistar rats, weighing 150–250 g, were divided into three groups of four rats each for the aldosterone-induced mRNA expression studies. In group 1 (control) the animal were sham-operated. The rats of group 2 were adrenalectomized bilaterally (ADX), allowed to drink only 9 g/l NaCl solution and kept in this condition for 48 h. The rats of group 3 were bilaterally adrenalectomized and osmotic mini-pumps (Alzet 2001, Alza, Palo Alto, CA) delivering aldosterone (Sigma, St Louis, MO, USA) at 5 mg/100 g of body weight per day for 48 h were implanted (ADX+ALDO). Rats were anesthetized with pentobarbital sodium (5 mg/100 g body weight) for all procedures involving surgery. The replacement dose was chosen because it resembled the daily secretory rate in rats and results in plasma levels of aldosterone similar to those measured in awake, unstressed rats [24].

2.1.3. Rats given furosemide treatment

To study the effect of blocking transepithelial transport on the CNG-A3 mRNA expression in cortical thick ascending limbs (cTAL) we used male Wistar weighing 150–250 g given increasing doses of furosemide using the same protocol employed before [25]. The animals were divided into three groups of three rats each. The control group of animals (control) received 300 ml of 0.9% NaCl solution orally via a stomach tube. Two other groups of rats received two different concentrations of furosemide solution 10 mg/kg (F10) and 100 mg/kg (F100) orally (300 ml) via a

stomach tube. Furosemide orally at 100 mg/kg solution, but not at 10 mg/kg, is known to increase both plasma renin activity and aldosterone concentration in rats [25]. The animals were sacrificed 15 h after furosemide treatment and the kidneys were used for renal tubule dissection.

2.2. Isolation of total RNA

The kidneys were perfused with a Ringer's solution and then excised and kept at 0 °C. Thin slices of kidney were made, then the renal cortex and medulla were dissected apart. Isolation of the various rat nephron segments (3 mm each) was performed by the use of collagenase, as previously described [26,27]. These experiments were performed at least seven times for each segment dissected from different rats. The animals were prepared for surgery using pentobarbital anesthesia.

Total RNA was extracted from whole kidney and from the dissected renal cortex and medulla by the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method [28]. The isolated RNAs were treated with ribonuclease (RNase)-free deoxyribonuclease DNase I (1 U/ml) for 1 h to eliminate contamination with genomic DNA. The purified RNA was extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI, 25/24/1 v/v) and then precipitated with 100% ethanol.

2.3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

To prepare first-strand deoxyribonucleic acid (cDNA), total RNA was primed with oligodeoxythymidilic (oligo dT) primer and then reverse-transcribed with SuperScript (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) at 37 °C for 60 min. The cDNA was extracted with PCI alcohol and precipitation with ethanol terminated the procedure. The PCR was used to amplify the synthesized cDNA (made from 3 mm of each dissected nephron segment or five glomeruli) and the following solution was employed: 0.2 µmol/l of the primers, 0.2 µmol/l of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) and 50 mmol/l of KCl, 10 mmol/l of Tris–Cl (pH 8.3) and 1.5 mmol/l of MgCl₂ plus 2.5 U of Amplitaq (Perkin Elmer, New Jersey, USA). One pair of oligonucleotides was synthesized for CNG-A3 (sense: 5'-GCTAACAGGAAGACGGTGGAT-GAAAA-3' and antisense: 5'-TCCGGGTACTCCGT-GAGGGTCTCCAT-3') corresponding, respectively, to nucleotides 1112–1137 and 1528–1553 of rat CNG-A3 cDNA sequence [15]. PCR was performed with 36 cycles of denaturation (94 °C, 1 min), annealing (58 °C, 1 min) and extension (72 °C, 1 min). PCR conditions were the same as described above. For the semi-quantitative RT-PCR rat β-actin primers, predicted to amplify the 215-bp PCR product (sense: 5'-TAGGCCAACACAGTGTCTGTGG-3' and antisense: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'), corresponding to nucleotides 2762–2784 and 2965–2987 of rat β-actin gene, were added into the same RT-PCR reaction tubes and their products were used as internal control.

Semi-quantitative RT-PCR was used to compare the expression of CNG-A3 in five different glomeruli or 3 mm segments of proximal convoluted or proximal straight tubules (PCT and PST, respectively), thin limbs of Henle's loop (HL), cortical and medullary thick ascending limbs (cTAL and mTAL, respectively), cortical collecting ducts (CCD), outer and inner medullary collecting ducts (OMCD and IMCD, respectively) dissected from low-Na⁺ diet and high-Na⁺-treated rats. CCD and cTAL were also used to compare the expression of CNG-A3 in control, ADX and ADX+ALDO-treated rats.

The semi-quantitative method of RT-PCR was validated in preliminary experiments. First, the optimal PCR conditions that yielded a single band on agarose gel electrophoresis were determined for each gene (CNG-A3 and β-actin) originated from the RT-PCR reaction made in the same reaction tube for both genes. Second, to determine whether the method was semi-quantitative, serial dissected CCD segments length (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, and 6.0 mm) were used for RT-PCR amplification for both genes in the same reaction tube. CCD was chosen because it has a high expression of CNG-A3 mRNA and saturation of RT-PCR reaction in this segment would also represent maximal saturation in other segments compared to other segments that had lesser amounts of CNG-A3 mRNA. Third, experiments were performed to determine the optimal number of PCR cycles that yielded PCR products in the linear range of amplification. All reactions included a negative control (cDNA replaced with double-distilled water). The identity of the amplification was confirmed by determination of the molecular size on agarose gel electrophoresis (1.5% agarose in buffer containing 40 mmol/l of Tris-acetate plus 1 mmol/l of ethylenediaminetetraacetic acid—EDTA) and visualized by ethidium bromide staining (0.5 µg/ml) under ultraviolet light. The computer software Sigma Gel v1.1 was used (Jandel Scientific, USA) for densitometric analysis of the bands. The CNG-A3 and β-actin bands from the same sample were analyzed by densitometry and normalized by dividing the CNG-A3 values by the corresponding β-actin values.

2.4. RNase protection assay (RPA)

To make the probe DNA, the PCR product corresponding to CNG-A3 nucleotide sequences 1112 through 1553 was subcloned into pCR-Script SK (+) and used to transform Epicurian Coli XL1-blue supercompetent cells (Stratagene). It was determined that the nucleotide sequence matched previously cloned sequences using Sequenase version 2.0 (US Biochemicals, Ohio, USA). Then a probe for CNG-A3 was prepared by linearization of 1 µg template DNA by enzyme digestion with *Hind*III (Gibco BRL). The pTRI-Rat-β-actin (125 bp) (Ambion, Texas, USA) was used as a template to make an actin probes. Following the Maxscript Kit protocol (Ambion), both probes cDNA templates were transcribed *in vitro* in the presence of [(α-³²P) UTP NEN, 3000 Ci/mmol, Amersham) with RNA polymerase T7

generating radiolabeled antisense RNA probes. All probes were evaluated with 10 mg of yeast transfer RNA (tRNA) in the presence and absence of RNase A and T1 following the RPAII kit protocol (Ambion). Total RNA (30 mg) from rat renal tissue was mixed with a radiolabeled antisense probe to CNG-A3 (1×10^5 cpm/sample) along with a β -actin radiolabeled antisense probe to actin (internal control) (1×10^5 cpm/sample) and hybridized at 45 °C for 18 h. Both RNase A and T1 (RPAII kit, Ambion) were used to treat the samples at 37 °C for 30 min. The protected fragments were separated electrophoretically on 8 mol/l urea gels containing 50 g/l polyacrylamide. The samples were transferred to chromatography papers and exposed to X-ray films with an intensifying screen at -70 °C. After the films had been revealed, the density of the bands corresponding to the expected sizes of the probes was analyzed by computer software (Sigma Gel v1.1, Jandel Scientific). The undigested CNG-A3 and β -actin probes were 442 and 215 nucleotides larger than the digested probes, respectively.

2.5. Western blot analysis

Expression of CNG-A3 protein in whole kidneys of rats fed a high- or low-sodium diets were assessed and compared by Western blot, using rabbit polyclonal antibody generated against the cytoplasmic domain of COOH-terminal region of CNG-A3, which specifically recognizes CNG-A3 protein (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA) and a mouse monoclonal antibody generated against N-terminal domain of β -actin (Novus Biologicals, Littleton, CO 80160, USA). Kidneys were homogenized in a solution containing 250 mmol/l sucrose, 1 mmol/l EDTA, 20 mmol/l imidazole, pH 7.2, and the following protease inhibitors: 1 mmol/l 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, 1 mmol/l benzamide, 10 mg/l leupeptin, 1 mg/l pepstatin A, 1 mg/l aprotinin, and 1 mg/l chymostatin. Homogenization was carried out at 0 °C using a Potter apparatus. The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The supernatant was saved, then the pellet was suspended in three volumes of the same medium, and the centrifugation was repeated. Both supernatants were mixed and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min to separate mitochondria. The ensuing supernatant was centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h, the pellet from this centrifugation contained cell membranes that were suspended in ice-cold homogenization buffer. The protein concentration was quantified by the Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as the standard [29]. All the extracts were solubilized by heating at 95 °C for 2 min in buffer solution (15 g/l SDS, 10 mmol/l Tris-Cl pH 6.8, 6 g/l DTT, and 60 ml/l glycerol). The membrane proteins (100 μ g/lane) were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Bio-Rad, Hercules, CA). By using molecular weight markers, the membranes were cut in half to electrophoretically separate β -actin and CNG-A3 bands from the same blot. The two blots were then blocked

with 5% nonfat milk in a Tris-buffered saline with Tween 20 (T-TBS 0.05%). Then, the corresponding halves of the membrane were incubated with the polyclonal antibody against the CNG-A3 (1:500 dilution) or the monoclonal antibody against β -actin protein (1:3000 dilution) in a blocking solution at room temperature for 1 h. The CNG-A3 antibody was detected using a secondary goat-anti rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (1:500) (Sigma Immuno-Chemicals) and the β -actin antibody was detected using a goat-anti mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (1:3000) (from Sigma Immuno-Chemicals). The binding was visualized by color development reaction using nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Gibco). The obtained CNG-A3 and β -actin bands from a same sample were analyzed by densitometry and normalized by dividing the CNG-A3 values in each lane by the corresponding β -actin values in the same lane.

2.6. Statistical analysis

We used an unpaired Student's *t*-test to compare the expression levels of mRNA and/or protein between the groups of high- and low- Na^+ diet. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test was used to compare changes in the expression levels of CNG-A3 mRNA between groups of animals (ADX, ADX with aldosterone replacement, high and low- Na^+ diet, and furosemide treatment regimens). The ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test was also used to compare the blood and urine parameters in rats subjected to different treatments. Results are presented as mean \pm S.E. Differences were assumed to be significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Electrolytes and fractional excretion

After the fifth day of treatment, the FE of K^+ in the group receiving low- Na^+ diet was significantly elevated compared to control and, in the high- Na^+ , ADX and ADX-ALDO groups no significant differences were found compared to the control. The FE of Na^+ and Cl^- and the urinary volume in the high- Na^+ and ADX groups showed a remarkable increase when compared to control values. The sham-operated group urinary parameters were not significantly different from control groups (data not shown). On the other hand, the FE of Na^+ and Cl^- and the urinary volume were significantly decreased in the low- Na^+ group, compared with the control group. In the ADX-ALDO group, modifications were not found in the analyzed parameters. The GFR in the high- Na^+ diet group increased, compared to controls. The GFR in the low- Na^+ diet group and in the ADX+ALDO group did not differ from the control group and, in the ADX group decreased when compared to control levels (Table 1).

3.2. CNG-A3 mRNA distribution along the nephron in animals subjected to normal diets

RT-PCR was performed to detect the CNG-A3 mRNA expression along the nephron of normal rats. CNG-A3 mRNA was expressed in the following nephron dissected segments: proximal convoluted tubules (S1/S2), proximal straight tubules (S3), cTAL segments, the mTAL, the CCD, the IMCD and OMCD. CNG-A3 was also found in the glomerulus. However, using the same experimental procedures, no CNG-A3 mRNA expression was detected in the thin segment of Henle's loop (HL) (Fig. 2).

3.3. Modulation of CNG-A3 mRNA expression in whole rat kidney by high- and low-salt diet

CNG-A3 gene mRNA expression in whole rat kidney was detected by RPA. The RNase action degraded the probes when hybridized with 30 μ g of yeast total RNA, used as RNase digestion control sample.

The 442-bp protected fragments corresponding to CNG-A3 gene were detected in the different groups (Fig. 1A). Protected fragment of 215 bp, corresponded to β -actin expression (Fig. 1B). The ratio of the densitometric values of CNG-A3 and β -actin was obtained for low- and high- Na^+ diet groups. There was a 64% decrease of the CNG-A3 sodium channel mRNA of whole rat kidneys subjected to high- Na^+ diet compared to the CNG mRNA in kidneys with low- Na^+ diet ($n=3$, $P<0.01$, Fig. 1C).

3.4. Modulation of CNG-A3 mRNA expression along the nephron of rats subjected to high- and low-salt diets

RT-PCR experiments showed that when the amount of CNG-A3 mRNA in each cTAL or CCD segment, was divided by the amount of mRNA of the β -actin gene in the same segment, the CNG-A3 mRNA expression decreased by 49% ($n=7$, $P<0.05$) and 37% ($n=7$, $P<0.01$), respectively, in animals on high- Na^+ diet compared to animals fed a low-sodium diet (Fig. 2f and i). On the other hand, there was no significant variation in the other dissected segments (glomeruli, PCT, PST, HL, mTAL, OMCD, IMCD) of animals subjected to the same treatment (Fig. 2). RT-PCR experiments showed that high- or low-salt diet did not alter

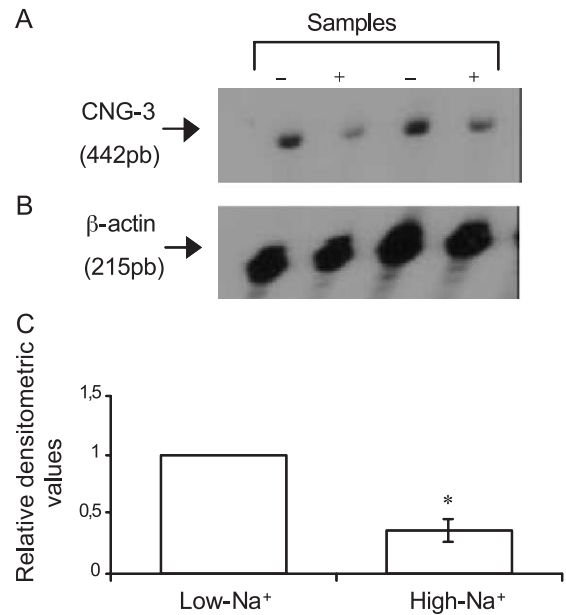


Fig. 1. RPA: (A) Bands obtained with hybridization of CNG-A3 probes and 30 mg of total RNA extracted from whole rats kidney treated with low- (–) and high- (+) Na^+ diets; (B) β -actin bands obtained in the same hybridization described in panel A; (C) representation of the means of the ratio between densitometric values of CNG-A3 and β -actin ($n=3$, $P<0.01$).

the distribution of the CNG-A3 mRNA. No CNG-A3 mRNA was found in the thin limbs of Henle's loop of rats on high- or low-salt diet (Fig. 2d).

3.5. Protein expression variation of the CNG-A3 channel

The Western blot showed a decrease of 49% in renal CNG-A3 protein expression in rats subjected to high- Na^+ diet compared to the rats subjected to a low- Na^+ diet (Fig. 3, $n=3$, $P<0.05$).

3.6. Evaluation of the possible participation of aldosterone

Other experiments were performed in order to verify if the decrease in CNG-A3 mRNA found in cTAL and CCD segments occurred through the action of aldosterone, using control, high- and low- Na^+ , adrenalectomized bilaterally with and without aldosterone replacement. When compared

Table 1

Urinary parameters: summary data of the urinary flow, GFR, body weight, FE of K^+ , Na^+ , and Cl^- comparing control rats, adrenalectomized rats with (ADX+ALDO) or without (ADX) aldosterone replacement, rats fed a high- Na^+ diet for 5 days and rats fed a low- Na^+ diet

	Control	High- Na^+	Low- Na^+	ADX	ADX+ALDO
K^+ FE (%)	48.47 \pm 0.85 ^a	46.13 \pm 3.12 ^a	56.23 \pm 2.69 ^b	45.76 \pm 3.02 ^a	47.87 \pm 0.63 ^a
Na^+ FE (%)	1.17 \pm 0.35 ^a	3.60 \pm 0.20 ^b	0.59 \pm 0.02 ^c	2.1 \pm 0.18 ^d	1.02 \pm 0.26 ^a
Cl^- FE (%)	2.40 \pm 0.36 ^a	6.20 \pm 2.34 ^b	1.82 \pm 0.09 ^c	3.8 \pm 0.22 ^d	2.07 \pm 0.56 ^a
Urinary flow (ml/day)	9.5 \pm 0.5 ^a	15 \pm 1.0 ^b	8.5 \pm 0.11 ^c	16.7 \pm 0.6 ^b	10.6 \pm 0.7 ^a
GFR (ml/kg/min)	5.84 \pm 0.45 ^a	9.16 \pm 1.29 ^b	4.98 \pm 0.52 ^a	3.7 \pm 0.56 ^c	4.97 \pm 0.35 ^a
Body weight (g)	205.4 \pm 15 ^a	201.3 \pm 5 ^a	202.7 \pm 2.73 ^a	198.7 \pm 9 ^a	207.1 \pm 9 ^a

Data represent mean \pm S.E. There is no statistical difference between groups with the same letters.

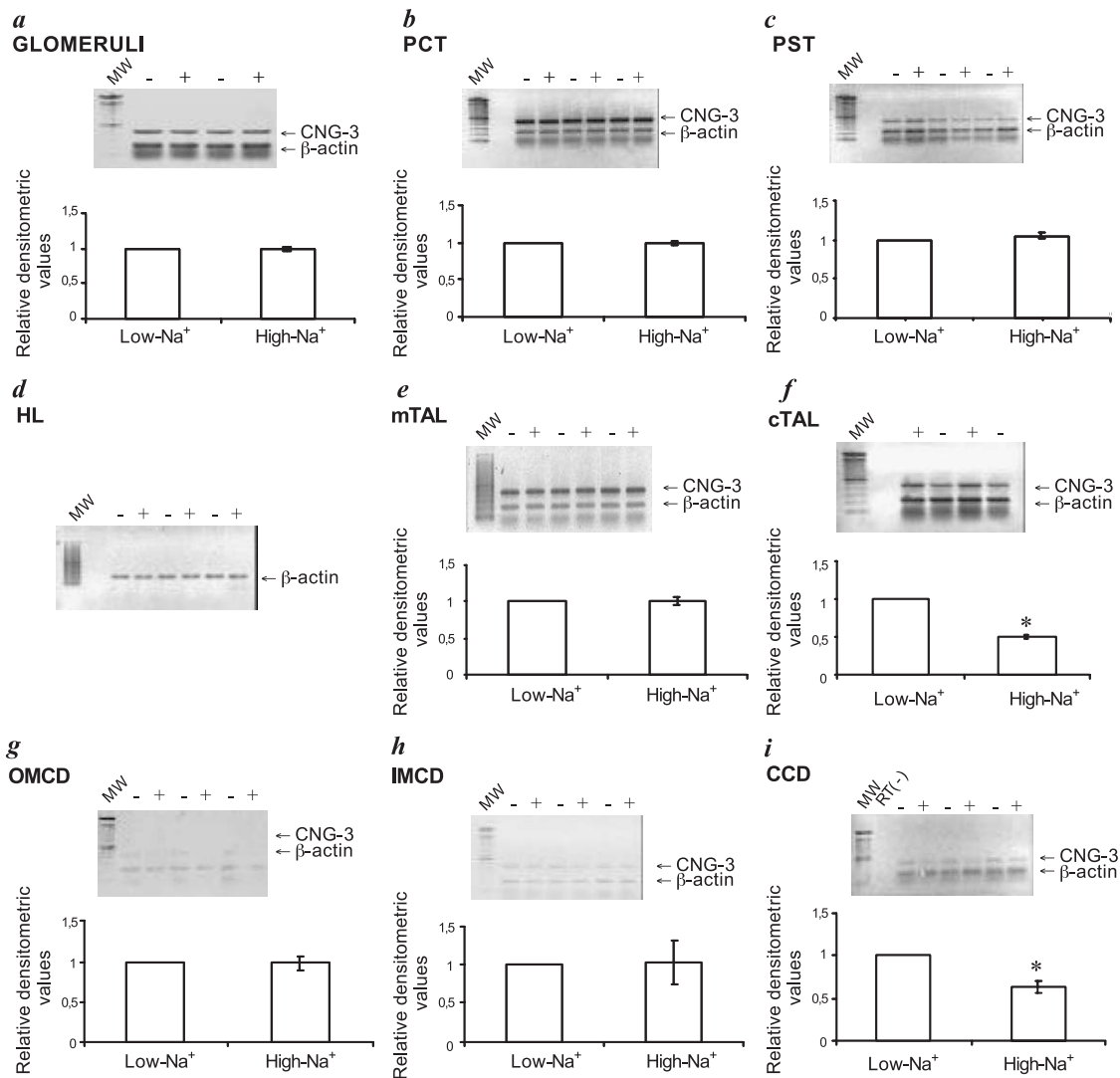


Fig. 2. Representative 1.5% agarose gels of CNG-A3 (442 bp) and β -actin (215 bp) genes semi-quantitative RT-PCR. Low- Na^+ diet represented by (-) and high- Na^+ diet represented by (+). In the first lane of each picture, the 100 bp ladder molecular weight (MW) is shown. Graphics present the reason between densitometric values of CNG-A3 and β -actin in the following segments: (a) glomerulus ($n=10$), (b) segments S1/S2 (PCT) of proximal tubule ($n=9$), (c) segment S3 (PST) of proximal tubule ($n=7$), (e) segments of the mTAL ($n=4$), (g) outer medullary collecting duct (OMCD, $n=3$), (h) IMCD ($n=3$), where no significant difference between low- and high- Na^+ diet groups were found ($P>0.05$). (d) The thin segment of Henle's loop (HL) does not express the channel mRNA, in any of the conditions presented here. In the cortical thick segment of Henle's loop (cTAL, $n=7$) (f) and CCD ($n=10$) (i), the mRNA expression decreases in high- Na^+ diet condition than in low- Na^+ diet ($P<0.05$).

to low- Na^+ animals, rats subjected to high- Na^+ diet have a 49% diminished CNG-A3 expression in the cTAL segment ($n=7$, $P<0.001$, Fig. 4a), and a 37% decrease in CCD ($n=7$, $P<0.01$, Fig. 4b). In animals on a low- Na^+ diet, there was no significant variation of the CNG-A3 sodium channel expression in the same segments compared to control group. In the cTAL, adrenalectomy leads to a decrease of 25% ($n=5$, $P<0.05$, Fig. 4a) in the CNG-A3 mRNA expression and a 58% decrease in CCD ($n=5$, $P<0.001$, Fig. 4b), when compared to control values. Rats adrenalectomized and receiving aldosterone showed no difference from controls in their CNG-A3 expression. CNG-A3 mRNA expression, evaluated by semi-quantitative PCR,

was not different comparing control animals and sham-operated animals (data not shown).

3.7. Evaluation of the possible role of transepithelial transport

When animals were treated with 10 mg/kg of furosemide (a dose that blocks the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ co-transporter but does not lead to an increase of plasma aldosterone concentration in rats) [25], we found no change in CNG-A3 mRNA expression in cTAL compared to animals not treated with furosemide. However, the treatment with a higher dose of 100 mg/kg of furosemide, enough to block the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$

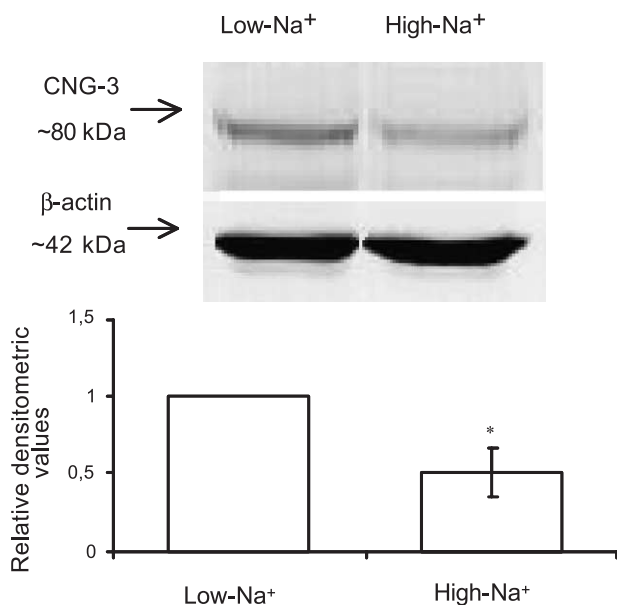


Fig. 3. Detection of CNG-A3 protein by Western blot analysis in the whole kidney of rats fed a high- and low- Na^+ diet. Mean \pm S.E. ($n=3$) values for the densitometric analysis of CNG-A3 and β -actin proteins bands obtained in the Western blot experiments. The β -actin band served as internal control for all samples and its densitometric values were used to normalize the corresponding CNG-A3 values. * $P<0.05$ vs. low- Na^+ group. Insert: a representative immunoblot for CNG-A3 and β -actin in membrane extracts prepared from rat kidneys; rat fed a low- Na^+ diet (lane 1) and rat fed a high- Na^+ diet (lane 2); 100 μg protein loaded per lane.

co-transporter and increase both plasma rennin activity and aldosterone concentration in rats, caused a 44% increase in the CNG-A3 expression in cTAL ($n=3$, $P<0.001$, Fig. 5).

4. Discussion

Most sodium filtered through the glomeruli is reabsorbed along different nephron segments, where the transport of this ion is highly regulated. However, the regulation of sodium reabsorption occurs mainly in the cortical, outer medullary and inner medullary segments. Sodium is well-known to be important for the maintenance of extracellular volume [1] and this ion balance depends on several hormones, which act in the kidney. One of the most important hormones, aldosterone, leads to an increase in renal sodium reabsorption. This transepithelial sodium transport is a result of the function of several membrane proteins, which have altered function and/or expression regulated by hormones, including aldosterone. Sodium transport modulated by aldosterone through amiloride-sensitive sodium channel (ENaC) in renal epithelia was demonstrated before and those findings emphasize the importance of sodium channels in the renal regulation of ECFV and blood pressure [7,8]. It is well-known that aldosterone increases the accessory subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) in the kidney. The alpha, beta and gamma rabbit ENaC subunits (rbENaC) mRNA levels were

found to be increased twofold in primary cultures of immunodissected rabbit kidney connecting tubule and CCD cells after aldosterone treatment [30] (Fig. 6). In addition, several other sodium channels are abundant in renal cells, including CNG-A3, and they could be also modulated in conditions of extracellular volume variation. The expression of CNG cation channels have been demonstrated in all nephron segments using electrophysiological methods [13] and, specifically in the IMCD cells, it was demonstrated that CNG channels are localized at the

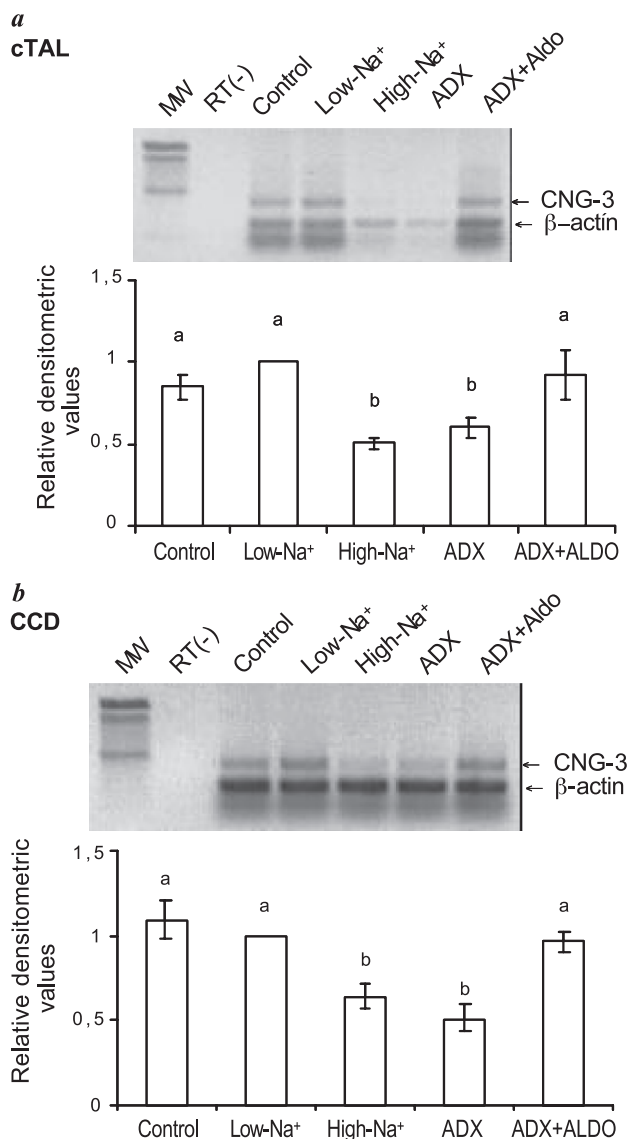


Fig. 4. Representative 1.5% agarose gels of CNG-A3 (442 bp) and β -actin (215 bp) genes semi-quantitative RT-PCR. The results above correspond to: (a) analysis of CNG-A3 expression modulation in the cTAL of Henle's loop (a different from b, $n=5-7$, $P<0.01$) and (b) analysis of CNG-A3 expression modulation in the CCD (a different from b, $n=5-7$, $P<0.001$) in control group, low- Na^+ diet group, high- Na^+ diet group and adrenalectomized with and without aldosterone replacement groups. In the first lane of each picture, the 100 bp ladder molecular weight is shown. Graphics present the ratio between densitometric values of CNG-A3 and β -actin, obtained from the agarose gel.

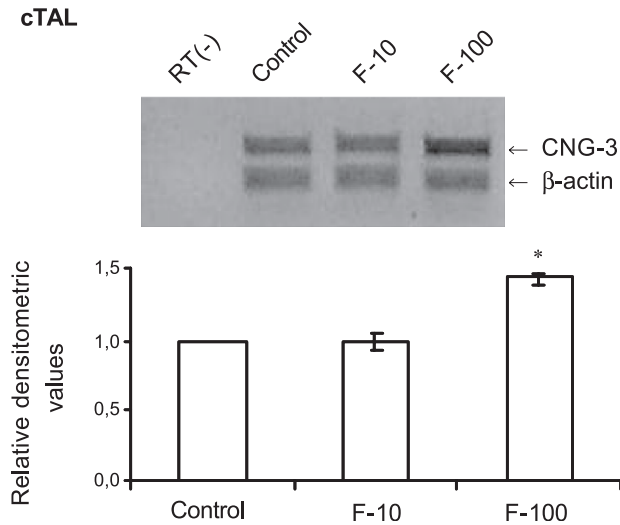


Fig. 5. Representative 1.5% agarose gel of CNG-A3 (442 bp) and β -actin (215 bp) genes semi-quantitative RT-PCR. The results correspond to analysis of CNG-A3 expression modulation in the cTAL of Henle's loop in control rats and treated with 10 mg/kg (F10) and 100 mg/kg (F100) of furosemide ($n=3$, $P<0.001$). Graphics present the ratio between densitometric values of CNG-A3 and β -actin, obtained from the agarose gel.

apical membrane [36]. It was suggested that, in the kidney, those channels can be inhibited by the ANP [19], a very well-known hormone involved in the extracellular volume regulation.

As we demonstrated in this manuscript, CNG-A3 channel mRNA is present in all dissected renal tubules except in the thin limbs of Henle's loop (Fig. 2). In addition, the wide distribution of CNG-A3 in the nephron seems to indicate that this channel could be poised for transepithelial transport.

Besides the majority of sodium channels that were found mostly in the distal nephron, we also found a relatively high mRNA expression level of CNG-A3 in the proximal tubules, which could suggest a role of CNG-A3 in the renal proximal transport of sodium once about 60% of sodium filtered in the glomeruli is reabsorbed along the proximal tubules.

The role of CNG-A3 channels has not yet been established in renal tissue. Our results showed an increased CNG-A3 mRNA (Fig. 1) and protein (Fig. 3) expression in the kidney of rats treated with a low-sodium diet compared to animals treated with a high-sodium diet. These changes were a result of modulation of CNG-A3 mRNA expression in cTAL and CCD nephron segments (Fig. 2). The cTAL and CCD are known to be sites of action of hormones involved in the extracellular volume regulation such as angiotensin-II, ANP, vasopressin and aldosterone [1,8].

The decrease of renal CNG-A3 mRNA and protein expression in rats subject to a high- Na^+ diet could be due to the influence of different hormones related to the extracellular volume regulation or by the changes in renal tonicity secondary to this procedure [31]. The decrease in renal CNG-A3 mRNA expression in ADX rats, which is reversed by aldosterone replacement, in both cTAL and CCD segments, suggest that this hormone might be involved in CNG-A3 gene expression (Fig. 4), although there were no significant changes in the renal expression of CNG-A3 in cTAL or CCD of the animals in low- Na^+ diet (Fig. 4). We conclude that the absence of aldosterone promotes a decrease in the CNG-A3 sodium channel expression especially in cTAL and CCD segments where aldosterone receptors are present [32,33]. However, changes in ion

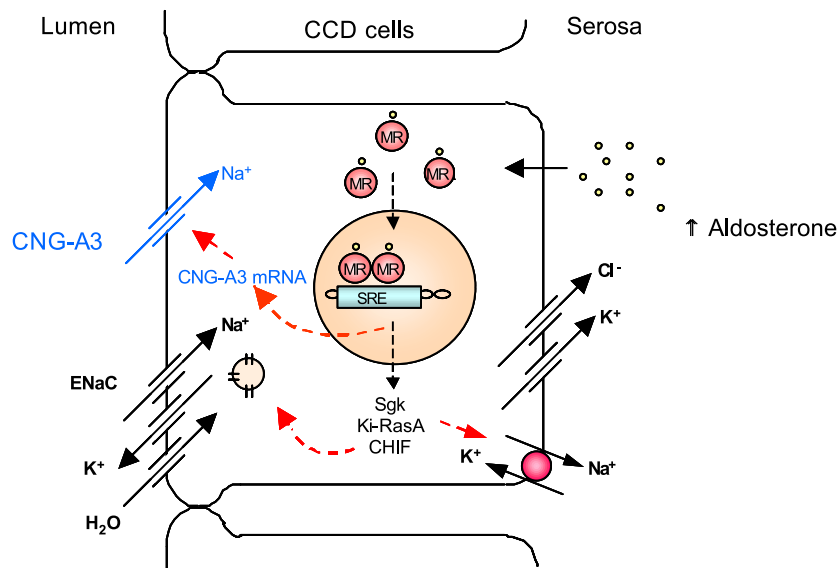


Fig. 6. Model of the genomic actions of aldosterone in renal epithelia. Final effectors of aldosterone are involved in Na^+ reabsorption and K^+ secretion. Aldosterone-induced proteins such as serum and glucocorticoid-inducible kinase (Sgk), corticosteroid hormone-induced factor (CHIF), and Kirsten Ras (Ki-Ras) increase the activity and/or number of these transport proteins during the early phase of action [37]. During the late phase of aldosterone action, expression levels of ion transporters proteins, including CNG-A3, increase. ENaC, epithelial sodium channel; MR, mineralocorticoid receptor; SRE, steroid response element (adapted from Booth et al. [37]).

transport of epithelial cells can lead to changes in mRNA expression of different genes [34,35]. In order to investigate if the modulation observed in CNG-A3 mRNA is not caused by altered transport through these epithelia, but by direct action of aldosterone, we used rats treated with furosemide [34]. The animals treated with this drug in amounts that are able to partially block the renal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ transporter without producing increased aldosterone plasma levels (10 mg/kg) [25] did not show changes in CNG-A3 mRNA expression in cTAL (Fig. 5). In contrast, treatment with a furosemide at 100 mg/kg, a concentration able to increase serum levels of aldosterone [25], generated an increase in CNG-A3 expression at cTAL, suggesting the direct action of aldosterone in this process (Fig. 5).

The transport model in CCD is well-known and it is dependent on the Na^+/K^+ ATPase present at the basolateral membrane, which establishes the electrochemical driving forces necessary for luminal entry and exit of Na^+ and K^+ , respectively. Aldosterone also increases Na^+/K^+ ATPase activity to increase the epithelial transport capacity [40]. However, the apical channel activity is limiting for trans-cellular ion movement and aldosterone can enhance this transport in an early and in a late phase. In the early phase, aldosterone could increase the open probability of apical ion channels and/or promote channel insertion to increase the number of functional channels [38,39]. In the late phase, aldosterone could stimulate ion transporter gene expression [38,39]. Our results, as proposed in the adapted model represented in Fig. 6, suggest that CNG-A3 would be included in the family of transporters stimulated by aldosterone in the kidney and it might have an important role in renal function.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Doris Rosenthal for helping with text correction. The present work was supported by grants from Fundação José Bonifácio (FUJB), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

We declare that there is no conflict of interest for the publication of this manuscript.

References

- [1] C. Yucha, M. Keen, Renal regulation of extracellular fluid volume and osmolality, *ANNA J.* 23 (1996) 487–497.
- [2] J.D. Horisberger, B.C. Rossier, Aldosterone regulation of gene transcription leading to control of ion transport, *Hypertension* 19 (1992) 221–227.
- [3] J.R. Stockigt, Mineralocorticoid hormones, *Adv. Steroid Biochem. Pharmacol.* 5 (1976) 334–335.
- [4] P.J. Mulrow, Angiotensin II and aldosterone regulation, *Regul. Pept.* 80 (1999) 27–32.
- [5] M.M. Morales, M.A.M. Capella, M.V. Sanches, A.G. Lopes, W.B. Guggino, Modulation of the *mdr-1b* gene in the kidney of rats subjected to dehydration or a high-salt diet, *Pflugers Arch.* 439 (2000) 356–362.
- [6] D.S. Ornellas, D.S. Nascimento, D.H. Christoph, W.B. Guggino, M.M. Morales, Aldosterone and high-NaCl diet modulate *ClC-2* chloride channel gene expression in rat kidney, *Pflugers Arch.* 444 (2002) 193–201.
- [7] A.W. Cowley Jr., R.J. Roman, The role of the kidney in hypertension, *JAMA* 275 (1996) 1581–1589.
- [8] H. Garty, L.G. Palmer, Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 2359–2396.
- [9] M. Biel, X. Zong, M. Disther, E. Bosse, N. Klugbauer, M. Murakami, V. Flockevzi, F. Hofmann, Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney and heart, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 3505–3509.
- [10] J.T. Finn, M.E. Grunwald, K.W. Yau, Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions, *Annu. Rev. Physiol.* 58 (1996) 395–426.
- [11] M. Biel, X. Zong, A. Ludwig, A. Sautter, F. Hofmann, Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels, *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.* 135 (1999) 151–171.
- [12] M.J. Richards, S.E. Gordon, Cooperativity and cooperation in cyclic nucleotide-gated ion channels, *Biochemistry* 39 (2000) 14003–14011.
- [13] D.E. McCoy, S.E. Guggino, B.A. Stanton, The renal cGMP-gated cation channel: its molecular structure and physiological role, *Kidney Int.* 48 (1995) 1125–1133.
- [14] M. Biel, X. Zong, A. Ludwig, A. Sautter, F. Hofmann, Molecular cloning and expression of the modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6349–6355.
- [15] T. Misaka, Y. Kusakabe, Y. Emori, T. Gono, S. Arai, K. Abe, Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, *CNG gust*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 22623–22629.
- [16] R.S. Dhallan, K.W. Yau, K.A. Schrader, R.R. Reed, Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons, *Nature* 347 (1990) 184–187.
- [17] R.S. Dhallan, J.P. Macke, R.L. Eddy, T.B. Shows, R.R. Reed, K.W. Yau, J. Nathans, Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression, *J. Neurosci.* 12 (1992) 3248–3256.
- [18] W. Qiu, B. Lee, M. Lancaster, W. Xu, S. Leung, S.E. Guggino, Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium and calcium influx in rat colon, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278 (2000) C336–C343.
- [19] B.A. Stanton, Molecular mechanisms of ANP inhibition of renal sodium transport, *Can. J. Physiol. Pharm.* 69 (1991) 1546–1552.
- [20] S.R. Reddy, T.A. Kotchen, Hemodynamic effects of high dietary intakes of Na^+ or chloride in the Dahl salt-sensitive rat, *J. Lab. Clin. Med.* 120 (1992) 476–482.
- [21] N.A. Sharif, J.L. Nunes, R.P. Rosenkranz, R.L. Whiting, R.M. Eglén, Quantitative autoradiography demonstrates selective modulation of rat brain regional dopamine (D1 and D2) receptor subtypes after chronic manipulation of dietary salt, *Neurochem. Res.* 20 (1995) 121–128.
- [22] C.P. Aloamaka, M. Ezimokhai, N.A. Osman, J. Morrison, The mechanism of relaxation in response to magnesium by the aorta of pregnant rats with salt-induced hypertension, *Exp. Physiol.* 80 (1995) 79–87.
- [23] Z. Zhong, G.E. Arteel, H.D. Connor, M. Yin, M.V. Frankenberg, R.F. Stachlewitz, J.A. Raleigh, R.P. Mason, R.G. Thurman, Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) F595–F604.
- [24] B. Stanton, G. Giebisch, G. Klein-Robbenhaar, J. Wade, R.A. DeFronzo, Effects of adrenalectomy and chronic adrenal corticosteroid replacement on potassium transport in rat kidney, *J. Clin. Invest.* 75 (1985) 1317–1326.

- [25] T. Hirano, Y. Yamamura, S. Nakamura, T. Onogawa, T. Mori, Effects of the V(2)-receptor antagonist OPC-41061 and the loop diuretic furosemide alone and in combination in rats, *J. Pharmacol. Exp.* 292 (2000) 288–294.
- [26] T. Moriyama, H.R. Murphy, B.M. Martin, A. Garcia-Perez, Detection of specific mRNAs in nephron segments by use of the polymerase chain reaction, *Am. J. Physiol.* 258 (1990) 1470–1474.
- [27] M.M. Morales, T.P. Carroll, T. Morita, E.M. Schwiebert, O. Devuyt, P.D. Wilson, A.G. Lopes, B.A. Stanton, H.C. Dietz, G.R. Cutting, W.B. Guggino, Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) 1038–1048.
- [28] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [29] L.W. Bradford, Problems of ethics and behavior in the forensic sciences, *J. Forensic Sci.* 21 (1976) 763–768.
- [30] L. Dijkink, A. Hartog, P.M. Deen, C.H. van Os, R.J. Bindels, Time-dependent regulation by aldosterone of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in rabbit kidney, *Pflugers Arch.* 438 (1999) 354–360.
- [31] M.B. Burg, J. Grantham, M. Abramow, J. Orloff, J.A. Schafer, Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons, *J. Am. Soc. Nephrol.* 8 (1997) 675–683.
- [32] N. Farman, J.P. Bonvalet, Aldosterone binding in isolated tubules: III. Autoradiography along the rat nephron, *Am. J. Physiol.* 245 (1983) F606–F614.
- [33] A. Vandewalle, N. Farman, P. Bencsath, J.P. Bonvalet, Aldosterone binding along the rabbit nephron: an autoradiographic study on isolated tubules, *Am. J. Physiol.* 240 (1981) F172–F179.
- [34] G. Moreno, A. Merino, A. Mercado, J.P. Herrera, J. Gonzalez-Salazar, R. Correa-Rotter, S.C. Hebert, G. Gambá, Electroneutral Na-coupled cotransporter expression in the kidney during variations of NaCl and water metabolism, *Hypertension* 31 (1998) 1002–1006.
- [35] P.S. Aronson, G. Giebisch, Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) 179–192.
- [36] D.H. Vandorpe, F. Ciampolillo, R.B. Green, B.A. Stanton, Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium absorption by IMCD (mIMCD-K2) cells, *Am. J. Physiol.* 272 (1997) C901–C910.
- [37] R.E. Booth, J.P. Johnson, J.D. Stockand, Aldosterone, *Adv. Physiol. Educ.* 26 (2002) 8–20.
- [38] S.I. Helman, X. Liu, K. Baldwin, B.L. Blazer-Yost, W.J. Els, Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive ENaCs in A6 epithelia, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) C947–C957.
- [39] A.E. Kemendy, T.R. Kleyman, D.C. Eaton, Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia, *Am. J. Physiol.* 263 (1992) C825–C837.
- [40] E. Feraille, D. Mordasini, S. Gonin, G. Deschenes, M. Vinciguerra, A. Doucet, A. Vandewalle, V. Summa, F. Verrey, P.Y. Martin, Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986 (2003) 570–578.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)