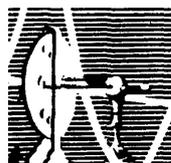


DIOGO VIVES DA COSTA

POSSÍVEL PAPEL DOS PEPTÍDEOS
NATRIURÉTICOS NA EXCREÇÃO RENAL DE
SÓDIO ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE DA Na⁺-ATPase.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho
2007



Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vives, Diogo

Possível papel dos peptídeos natriuréticos na excreção renal de sódio através da modulação da atividade da Na⁺-ATPase. / Diogo Vives – Rio de Janeiro : UFRJ / IBCCF, 2007.

x, 76 f. il. ; 29,7 cm

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Gil Lopes

Tese (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2007.

Referências bibliográficas: f. 66 – 76.

1. Na⁺-ATPase 2. Túbulo Proximal 3. Membrana Basolateral 4. Peptídeos Natriuréticos 5. ANP 6. Urodilatina 7. LLC-PK1 8. Via de Sinalização Celular – Tese I. Lopes, Aníbal Gil. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. IV. Título

**À Deus em primeiro lugar,
à minha noiva Flávia,
à minha mãe Conceição e minha avó Patrocínia,
ao meu pai Sérgio e tia Mirian,
à minha irmã querida Talita
por tudo o quanto vocês representam em minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar presente fortemente em minha vida e dar pessoas maravilhosas para trabalharem comigo.

Agradeço também a Ele por ter me colocado numa família que pode me dar um forte alicerce para que eu seja uma pessoa digna, batalhadora, persistente, zelosa e principalmente amiga. À minha amada noiva Flávia que esteve ao meu lado me dando forças para continuar.

À Prof^a Dra. Lucienne da Silva LARA Morcillo que foi o meu braço direito em muitos momentos desta jornada. Ao Prof. Dr. Aníbal Gil LOPES pela orientação e por mostrar a complexidade da repercussão de um achado na fisiologia como um todo. Ao Prof. Dr. Celso Caruso Neves pelos ensinamentos, tanto na pesquisa quanto na vida, que me deu. Ao Shan pelo convívio, trabalho e brincadeiras sempre bem vindas por todos. A todos os amigos que passaram pelo Laboratório C-34, como todos nós o chamamos, Laboratório de Fisiologia Renal, pois se eu fosse relacionar nomes, não caberiam nesta página.

Obrigado,

Diogo Vives

ABREVIACOES

ANP	peptídeo atrial natriurético
APS	persulfato de amnio
AC	adenilato ciclase
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
BNP	peptídeo natriurético tipo B
CNP	peptídeo natriurético tipo C
CTP	citidina trifosfato
db-GMPc	dibutiril GMPc
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbeco (<i>Dulbeco's Modified Eagle's Medium</i>)
EDTA	cido etileno diamino tetra acético
FBS	soro fetal bovino
GC	guanilato ciclase
GDP	guanosina difosfato
GMPc	guanosina 3', 5' monofosfato cíclico
GTP	guanosina trifosfato
HCl	cido clorídrico
HEPES	N-[2-hidroxi etil] piperazina-N'-[2-cido etano sulfônico]
ITP	inosina trifosfato
KT5823	inibidor de PKG
LLC-PK1	célula de túbulo proximal de rim de porco
LY83583	inibidor de guanilato ciclase
MBL	membrana basolateral
NPR-A	receptor de peptdo natriurético do tipo A
NPR-B	receptor de peptdo natriurético do tipo B
NPR-C	receptor de peptdo natriurético do tipo C
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorídrico
POPOP	1,4 bis 2 [5 feniloxazole]-benzeno
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase G
PVDF	difluoreto de polivinilideno
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese de gel de poliacrilamida com SDS
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
TBS	salina tamponada com TRIZMA base
TCA	cido tricloro acético
TRIZMA base	tris[hidroxi metil]amino etano
VEC	volume extracelular

RESUMO

“Possível papel dos Peptídeos Natriuréticos na excreção renal de sódio através da modulação da atividade da Na⁺-ATPase.”

Diogo Vives da Costa
Orientador: Dr. Aníbal Gil Lopes

Resumo de dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

O objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito dos peptídeos natriuréticos sobre a atividade Na⁺-ATPásica presente em fração enriquecida de membranas basolaterais de rim de porco (MBL) e em células da linhagem LLC-PK1 oriundas de túbulo proximal de rim de porco. Foi verificado que o peptídeo atrial natriurético (ANP) e a urodilatina inibem a atividade Na⁺-ATPásica em ambas as preparações, possivelmente através da interação com o receptor NPR-A, que possui uma sub-unidade guanilato ciclase, o que leva à produção de GMPc. No presente trabalho este receptor foi detectado pela técnica de Western-blot em ambas as preparações. Com a finalidade de avaliar se a ligação dos peptídeos com o receptor levaria ao aumento dos níveis de segundo mensageiro, foi medida a produção de GMPc através de radioimunoensaio. Os resultados obtidos mostraram que ambos os peptídeos aumentam os níveis de GMPc. Esta hipótese foi confirmada através do uso de um inibidor de guanilato ciclase (LY83583), que reverteu o efeito de ambos os peptídeos na atividade Na⁺-ATPásica, confirmando que ANP e urodilatina inibem a atividade Na⁺-ATPásica via produção de GMPc. Por outro lado, foi possível demonstrar através da medida da produção de fosfoenzima, que os peptídeos estudados e o GMPc ativam uma PKG que, por sua vez, inibe a atividade da Na⁺-ATPase presente na MBL, enquanto que o peptídeo natriurético do tipo B (BNP) não a altera. Nas duas preparações os peptídeos natriuréticos não modificaram a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase. Os dados apresentados nesta dissertação permitem concluir que, nos modelos experimentais utilizados, o ANP e a urodilatina inibem a Na⁺-ATPase seletivamente através da ativação da via de sinalização NPR-A/GMPc. Além disso, em membrana basolateral, foi verificado que esta produção de GMPc ativa uma PKG.

Palavras-chave: *Peptídeo natriurético atrial, Urodilatina, Na⁺-ATPase, GMPc, PKG.*

ABSTRACT

“Possible role of Natriuretics Peptides on renal sodium excretion through Na⁺-ATPase activity modulation.”

Diogo Vives da Costa
Orientador: Dr. Aníbal Gil Lopes

Resumo de dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

The aim of the present work was to investigate the molecular mechanisms involved in the effects of natriuretic peptides effects on the Na⁺-ATPase activity present in enriched fractions of pig kidney basolateral membranes (MBL) and in LLC-PK1 cells derivative from proximal tubule of porcine kidney. It was verified that Atrial Natriuretic Peptide (ANP) and urodilatin inhibit the Na⁺-ATPase activity in both preparations, possibly through the interaction with the NPR-A receptor that possesses a guanylyl ciclase subunit, which leads to the production of cGMP. In the present work this receptor was detected by the Western-blot technique in both preparations. In order to evaluate if the binding of the peptides with the receptor would increase second messenger levels, we measured the production of cGMP through radioimmunoassay. The data obtained showed that both peptides increased the levels of cGMP. This result was confirmed through the use of a guanylyl ciclase inhibitor (LY83583) that reverted the effect of both peptides, confirming that ANP and urodilatin inhibit the Na⁺-ATPase activity via the production of cGMP. On the other hand, measurement of the the amount of phosphoenzyme production showed that the peptides and cGMP activate a PKG that, in turn, inhibits the activity of Na⁺-ATPase present in MBL, while BNP has no effect. In both preparations, the natriuretic peptides did not modify the (Na⁺+K⁺)ATPase activity. The data presented in this dissertation allows us to conclude that, in the experimental models used, ANP and urodilatin selectively inhibit the Na⁺-ATPase through the activation of the NPR-A/cGMP pathway. Moreover, it was verified that cGMP production activates a PKG in basolateral membrane.

Key words: Atrial Natriuretic Peptide, Urodilatin, Na⁺-ATPase, cGMP, PKG.

ÍNDICE

I INTRODUÇÃO	1
I.1 ESTRUTURA RENAL	3
I.2 FUNÇÃO DO RIM NA REGULAÇÃO DO VOLUME EXTRACELULAR	5
I.3 (Na ⁺ +K ⁺)ATPASE	8
I.4 Na ⁺ -ATPASE	9
I.5 REGULAÇÃO HORMONAL DA (Na ⁺ +K ⁺)ATPASE E DA Na ⁺ -ATPASE.....	13
I.6 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO VOLUME EXTRACELULAR.....	14
I.7 PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS.....	15
<i>I.7.1 Peptídeo Atrial Natriurético (ANP)</i>	<i>16</i>
<i>I.7.2 Peptídeo Natriurético do tipo B (BNP)</i>	<i>20</i>
<i>I.7.3 Receptores para peptídeos natriuréticos</i>	<i>22</i>
<i>I.7.4 Receptor natriurético A</i>	<i>24</i>
<i>I.7.5 Efeitos do GMP cíclico.....</i>	<i>26</i>
<i>I.7.6 Efeitos de ANP e urodilatina em natriurese e diurese</i>	<i>28</i>
II OBJETIVOS.....	30
III MATERIAIS E MÉTODOS	31
III.1 PREPARAÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE MEMBRANA BASOLATERAL DE TÚBULO PROXIMAL DE RIM DE PORCO.....	31
III.2 MEDIDA DA ATIVIDADE ATPÁSICA	33
III.3 MEDIDA DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS CINASE G.....	34
III.4 ANÁLISE ELETROFORÉTICA.....	34
III.5 WESTERN BLOT.....	35
III.6 MEDIDA DE PRODUÇÃO DE GMPC.....	36
III.7 CULTURA DE CÉLULAS	36
III.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
IV RESULTADOS	39
IV.1 ESTUDO DA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na ⁺ -ATPASE E DA (Na ⁺ +K ⁺)-ATPASE POR ANP, BNP E URODILATINA EM MEMBRANA BASOLATERAL DE RIM DE PORCO.	39
IV.2 ENVOLVIMENTO DA GUANILATO CICLASE/GMPC NA INIBIÇÃO DA Na ⁺ -ATPASE POR ANP E URODILATINA.	43
IV.3 IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR ENVOLVIDO NA INIBIÇÃO DA Na ⁺ -ATPASE POR ANP E URODILATINA.	48
IV.4 ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNA CINASE G (PKG).	49

IV.5 EFEITO DO ANP E URODILATINA EM CÉLULAS LLC-PK1.....	53
IV.6 EFEITO DO GMPC EM CÉLULAS LLC-PK1	55
V DISCUSSÃO.....	58
VI CONCLUSÕES FINAIS.....	63
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	66

Índice de figuras

Tabela 1: Composição dos meios extracelular e intracelular	2
Figura 1: Esquema da anatomia do néfron cortical (alça curta) e justamedular (alça longa).	3
Figura 2: Aparelho justaglomerular	5
Figura 3: Porcentagem de reabsorção da carga filtrada de NaCl ao longo do néfron em condição de euvolemia.....	6
Figura 4: Mecanismos de transporte através das células epiteliais de túbulos proximais de mamíferos.	7
Figura 5: Modelo estrutural e ciclo catalítico da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$	8
Tabela 2: Caracterização das atividades Na^+ e $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ em córtex de rim de rato	10
Figura 6: Ciclo catalítico proposto da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$	11
Figura 7: Representação esquemática da estrutura consenso e eventos de tradução dos genes dos peptídeos natriuréticos - ANP, BNP e CNP. (Adaptado de YAN <i>et al.</i> , 2000).	16
Figura 8: Estrutura esquemática de ANP e urodilatina.....	17
Figura 9: Esquema que ilustra a expressão do ANP, do BNP e do CNP	19
Tabela 3: Localização do gene, concentração plasmática e meia vida dos peptídeos natriuréticos humano.	20
Figura 10: Estrutura dos principais receptores para peptídeos natriuréticos. NPR-C (receptor para peptídeos natriuréticos do tipo C); NPR-A (receptor para peptídeos natriuréticos do tipo A); NPR-B (receptor para peptídeos natriuréticos do tipo B). Adaptado de YAN <i>et al.</i> , 2000.	23
Figura 11: Ciclo de ativação dos receptores NPR-A ou NPR-B.	24
Tabela 4: Expressão dos receptores dos peptídeos natriuréticos em linhagens celulares e tecidos.....	25
Figura 12: Possíveis vias de sinalização descritas para os receptores de peptídeos natriuréticos.....	27
Figura 13: Efeitos do ANP no rim.....	29
Figura 14: Esquema da preparação de homogenato de células LLC-PK1.....	37

Figura 16: Efeito do ANP, do BNP e da urodilatina na atividade da bomba Na^+ -ATPase.	41
Figura 17: Curva de NaCl , com a adição de ANP 10^{-11}M e urodilatina 10^{-11}M na presença de 1mM de ouabaína, sobre a atividade da Na^+ -ATPase.....	42
Tabela 5: Parâmetros cinéticos da Na^+ -ATPase.	43
Figura 18: Efeito da adição de db-GMPc em concentrações crescentes (de 1 a 10 nM) sobre a atividade Na^+ -ATPásica.	44
Figura 19: Medida da produção de GMPc estimulada por ANP 10^{-11}M e urodilatina 10^{-11}M em membrana basolateral pela técnica de radioimunoensaio.	45
Figura 20: Efeito de db-GMPc 10nM sobre a modulação da atividade Na^+ -ATPásica promovida por ANP 10^{-11}M ou urodilatina 10^{-11}M	46
Figura 21: Efeito de LY83583 10^{-6}M sobre a modulação da atividade Na^+ -ATPásica promovida por ANP 10^{-11}M ou urodilatina 10^{-11}M	47
Figura 22: Identificação da presença de NPR-A presente na fração enriquecida de MBL de rim de porco..	49
Figura 23: Identificação da presença de PKG presente na fração enriquecida de MBL de rim de porco..	50
Figura 24: Efeito de LY83583 10^{-6}M , GMPc 10^{-10}M , ANP 10^{-11}M e urodilatina 10^{-11}M sobre a atividade da proteína cinase dependente de GMPc (PKG).....	51
Figura 25: Efeito de KT5823 10^{-6}M sobre a modulação da atividade Na^+ -ATPásica promovida por GMPc 10^{-10}M , ANP 10^{-11}M ou urodilatina 10^{-11}M	52
Figura 26: Efeito do ANP e urodilatina na atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ em homogenato de células LLC-PK1.....	54
Figura 27: Efeito do ANP e urodilatina na atividade da Na^+ -ATPase em homogenato de células LLC-PK1.....	55
Figura 28: Efeito da adição de db-GMPc em concentrações crescentes (de 10^{-11} a 10^{-7}M) sobre a atividade Na^+ -ATPásica em homogenato de células LLC-PK1.	56
Figura 29: Efeito de LY83583 sobre a modulação da atividade Na^+ -ATPásica promovida por ANP 10^{-11}M ou urodilatina 10^{-11}M em homogenato de células LLC-PK1.	57
Figura 30: Esquema da conclusão final dos achados em MBL.....	64
Figura 31: Esquema da conclusão final dos achados em LLC-PK1.....	65

I INTRODUÇÃO

Os rins desempenham diferentes e importantes funções no organismo relacionadas com a manutenção da homeostase do meio interno, fundamental para a integridade funcional dos diferentes tecidos, órgãos e sistemas. Os rins, através dos mecanismos de filtração glomerular e reabsorção e secreção tubulares, não só excretam produtos metabólicos como mantêm a composição do meio interno dentro de uma estreita faixa de variação e realizam o ajuste do equilíbrio ácido-básico, da tonicidade e do volume do fluido extracelular (MOE *et al.*, 2004; KHANNA & KURTZMAN, 2006; MOE & HUANG, 2006).

Deste modo, os rins participam da regulação da pressão arterial, pois um de seus determinantes é o volume intravascular, intimamente dependente dos mecanismos renais de regulação do volume extracelular. Este, por sua vez, corresponde ao fluido do organismo que se encontra fora das células e, portanto, delimitado pelas membranas celulares, estando distribuído nos espaços intersticial, intravascular e transcelular (MOE *et al.*, 2004).

Graças aos mecanismos de transporte iônico presentes nas membranas celulares, os meios intra e extracelulares, ainda que estejam em equilíbrio osmótico, apresentam composições diferentes, sendo o fluido intracelular caracterizado por alta concentração de K^+ e o fluido extracelular rico em Na^+ . Esta condição, mostrada na Tabela 1, se mantém graças à baixa permeabilidade das membranas celulares ao Na^+ e pela atividade da $(Na^+ + K^+)ATPase$ presente na membrana celular (MOE *et al.*, 2004).

Sendo o Na^+ o mais abundante osmólito do meio extracelular, a regulação do volume extracelular depende basicamente do balanço entre a ingestão e a excreção desse íon. Deve ser notado que os mecanismos renais de transporte de Na^+ são finamente regulados.

Tabela 1: Composição dos meios extracelular e intracelular.

Constituintes		Meio Extracelular (mEq/L)	Meio Intracelular (mEq/L)
Cátions	Na ⁺	142	10
	K ⁺	4	160
	Ca ⁺⁺	2,5	0,0001
	Mg ⁺⁺	1	18,5
	Outros	3,5	
<i>Total de cátions</i>		<i>153</i>	<i>188,5</i>
Ânions	Cl ⁻	103,5	2
	HCO ₃ ⁻	24	8
	PO ₄ ³⁻	2	37,5
	Proteína	16	55
	Outros	7,5	86
<i>Total de ânions</i>		<i>153</i>	<i>188,5</i>

Retirado de SELDIN & GIEBISCH, 1992.

I.1 Estrutura renal

O néfron é a unidade funcional do rim. Ele é formado pelo corpúsculo renal, onde ocorre a filtração do plasma, e pelo túbulo renal, onde ocorrem os processos de reabsorção e/ou secreção de água e osmólitos (Figura 1).

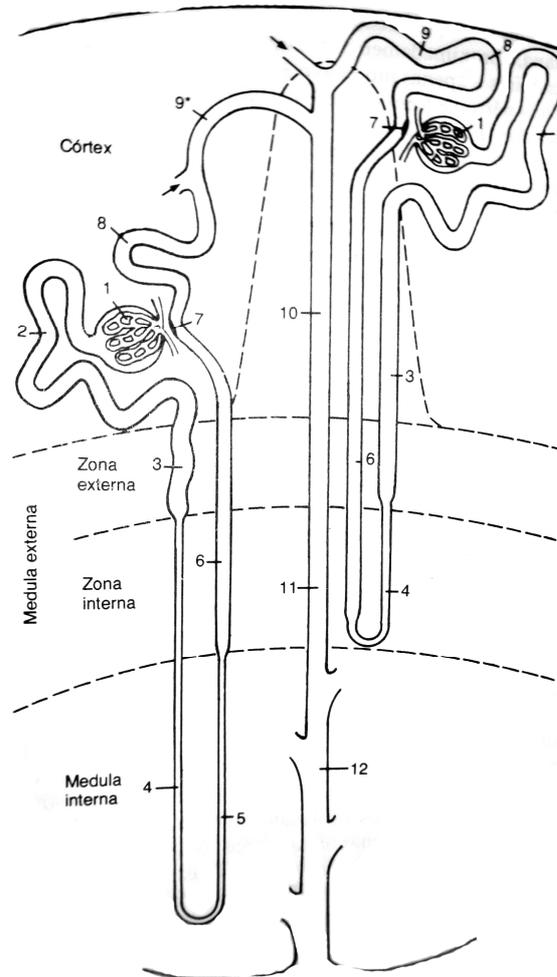


Figura 1: Esquema da anatomia do néfron cortical (alça curta) e justamedular (alça longa).

No interior do córtex está indicado um raio medular por meio de uma linha interrompida. 1) Glomérulo; 2) túbulo proximal convoluto; 3) túbulo proximal reto; 4) ramo fino descendente da alça de Henle; 5) ramo fino ascendente da alça de Henle; 6) túbulo distal reto; 7) mácula densa; 8) túbulo distal convoluto; 9) túbulo de conexão; 9*) túbulo de conexão do néfron justamedular formando uma arcada; 10) túbulo coletor cortical; 11) ducto coletor medular externo; 12) ducto coletor medular interno. (DWORKIN & BRENNER, 2004).

O corpúsculo renal é constituído pelo glomérulo e pela cápsula de Bowman. O glomérulo é formado a partir da arteríola aferente, que se subdivide em diversas alças capilares, constituindo um enovelado capilar, que logo em seguida se fundem formando a arteríola eferente do glomérulo. Estes capilares são sustentados pelas células mesangiais, providas de elementos contráteis e capazes de fagocitar agregados moleculares presos à parede do capilar devido à filtração glomerular. Estas células possuem receptores para vários hormônios que atuam na regulação da hemodinâmica renal (DWORKIN & BRENNER, 2004; MADSEN & TISHER, 2004).

A cápsula de Bowman é uma estrutura epitelial em forma de cálice que envolve o glomérulo. Essa estrutura é formada por dois folhetos: o interno, em contato com o glomérulo, e o externo, que reveste o corpúsculo renal e está conectado ao epitélio tubular. O espaço delimitado por eles, denominado espaço de Bowman, é onde se acumula o ultrafiltrado glomerular (DWORKIN & BRENNER, 2004; MADSEN & TISHER, 2004).

A estrutura tubular do néfron é dividida em quatro porções, localizadas seqüencialmente de acordo com suas características histológicas: túbulo proximal, túbulo intermediário, túbulo distal e ducto coletor. O túbulo proximal é formado por um segmento convoluto e outro reto. O túbulo intermediário começa no fim da parte reta do túbulo proximal e possui um ramo fino descendente e outro ascendente (porções finas da alça de Henle). Essa estrutura é seguida por uma porção ascendente espessa, denominada túbulo distal reto (ou ramo ascendente espesso da alça de Henle). A estrutura em forma de alça tem importante função na gênese do interstício medular concentrado da medula renal (DWORKIN & BRENNER, 2004; MADSEN & TISHER, 2004).

O túbulo distal é subdividido em duas regiões: a reta, que é contínua com a alça fina ascendente de Henle e a convoluta. Entre essas regiões, ocorre a modificação das células do epitélio distal, formando a mácula densa. Em contato com a mácula densa estão as células granulares da parede da arteríola aferente. As células modificadas da arteríola aferente, denominadas células justaglomerulares, contêm o citoplasma rico em grânulos de renina (MADSEN & TISHER, 2004). Este sistema forma o aparelho justaglomerular (Figura 2), de fundamental importância na regulação do volume extracelular, como será discutido posteriormente.

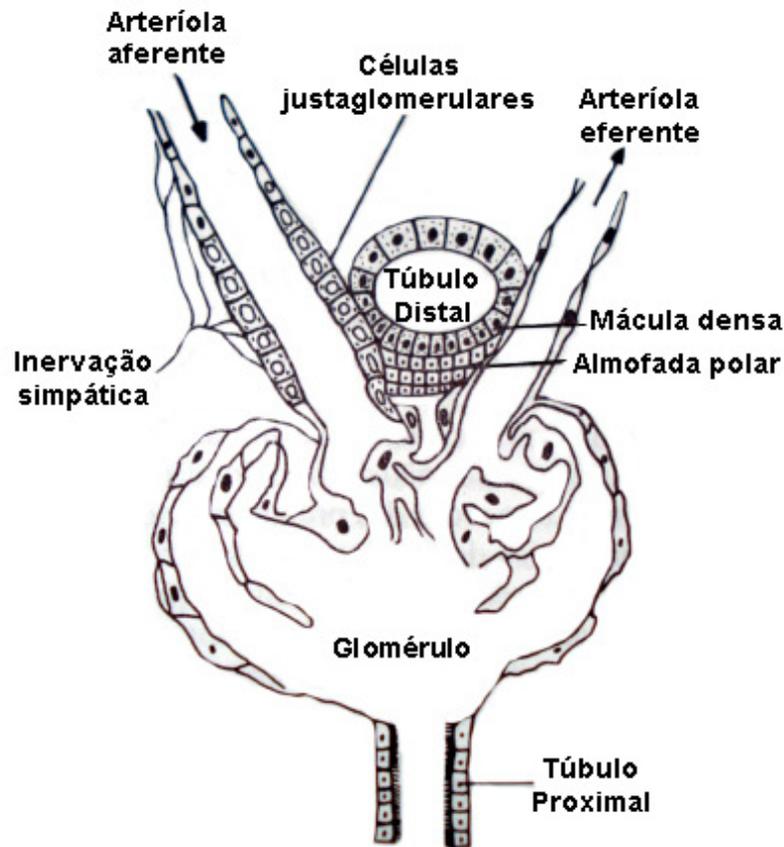


Figura 2: Aparelho justaglomerular. Adaptado de DWORKIN & BRENNER, 2004.

Ao final do ramo ascendente espesso, já na região cortical, inicia-se o túbulo distal convoluto. Os segmentos distais de diferentes néfrons desembocam no, assim chamado, ducto coletor. Dentro da medula interna os ductos coletores se fundem sucessivamente, resultando na pélvis renal (MADSEN & TISHER, 2004).

1.2 Função do rim na regulação do volume extracelular

A primeira etapa da formação da urina é a ultrafiltração do plasma, que ocorre no glomérulo. Diariamente, cerca de 150 a 180 litros de ultrafiltrado são formados, apresentando constituição semelhante à do plasma, exceto pelas proteínas plasmáticas (MOE *et al.*, 2004). Uma grande massa de NaCl e água são reabsorvidas enquanto o ultrafiltrado percorre os túbulos renais. Cerca de 1,6 Kg de Na⁺ são ultrafiltrados por dia, dos quais, em condições usuais de ingestão de NaCl, somente cerca de 1% é excretado na urina. Nesse processo são consumidos em torno de 2.000 g de ATP (FÉRAILLE *et al.*, 2003).

A reabsorção tubular de Na^+ depende diretamente da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, havendo uma correlação direta entre sua distribuição e abundância e a capacidade de reabsorção de Na^+ nos diferentes segmentos do néfron, sendo no túbulo proximal onde ocorre a maior parte deste processo (60 a 70% da reabsorção total de Na^+), o que é ilustrado na Figura 3 (FÉRAILLE & DOUCET, 2001). Nas células tubulares renais a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ está localizada na membrana basolateral (MADSEN & TISHER, 2004), gerando um gradiente eletroquímico de Na^+ favorável à sua entrada pela membrana luminal. Esse gradiente é utilizado para o transporte de outros solutos (tais como glicose, aminoácidos, H^+ e solutos orgânicos) através de diferentes transportadores ativos secundários (MOE *et al.*, 2004) (Figura 4).

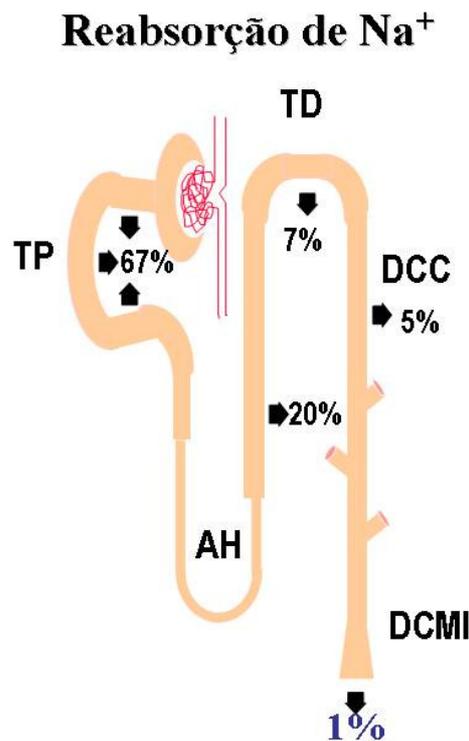


Figura 3: Porcentagem de reabsorção da carga filtrada de NaCl ao longo do néfron em condição de euvolemia. TP, túbulo proximal; AH, Alça de Henle; TD, túbulo distal; DCC, duto coletor cortical; DCMI, duto coletor medular interno.

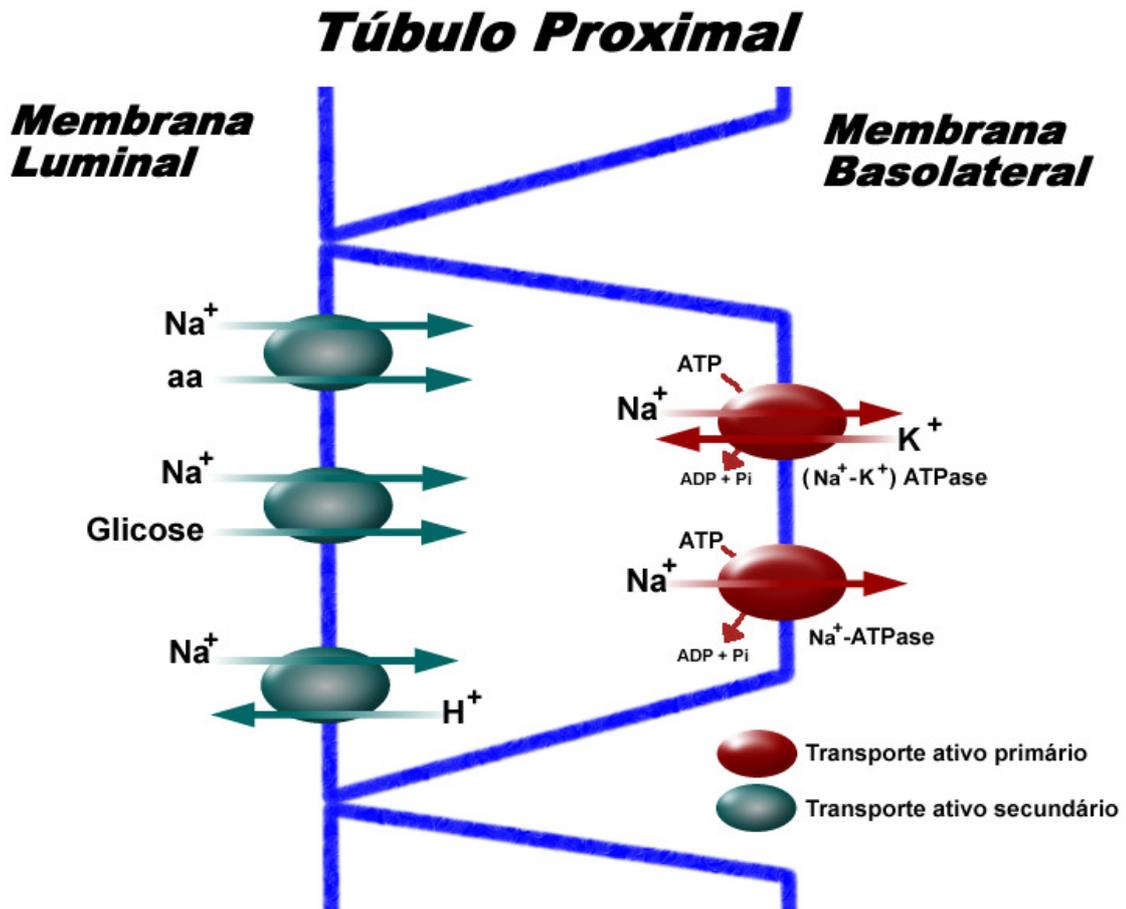


Figura 4: Mecanismos de transporte através das células epiteliais de túbulos proximais de mamíferos. Adaptado de MOE *et al.*, 2004.

Além da (Na⁺+K⁺)ATPase, foi demonstrada a presença de uma segunda bomba de Na⁺, insensível à ouabaína e sensível a furosemida, chamada de Na⁺-ATPase (MARÍN *et al.*, 1990). A Na⁺-ATPase apresenta localização paralela à da (Na⁺+K⁺)ATPase e tem atividade cerca de 10 vezes menor. Um grande conjunto de dados obtidos anteriormente em nosso laboratório indica que a Na⁺-ATPase possa ser responsável pelo ajuste fino da reabsorção de Na⁺ no túbulo proximal (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; 2000a; 2000b; 2001; 2003a; 2003b; RANGEL *et al.*, 1999; 2001; 2002; LARA *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2004, LOPES *et al.*, 2004). A regulação desses mecanismos de transporte de Na⁺ seriam, portanto, de fundamental importância na manutenção do volume extracelular e, em última instância, da pressão arterial.

1.3 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase

Identificada por Skou em 1920 como uma ATPase dependente de Na^+ e de K^+ , a ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase utiliza a energia livre liberada pela hidrólise de ATP para transportar Na^+ e K^+ contra seus gradientes de concentração (SKOU, 1988). Esta enzima pertence à classe das ATPases do tipo P (P-ATPases), capazes de formar intermediário fosforilado durante seu ciclo catalítico (Figura 5) (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

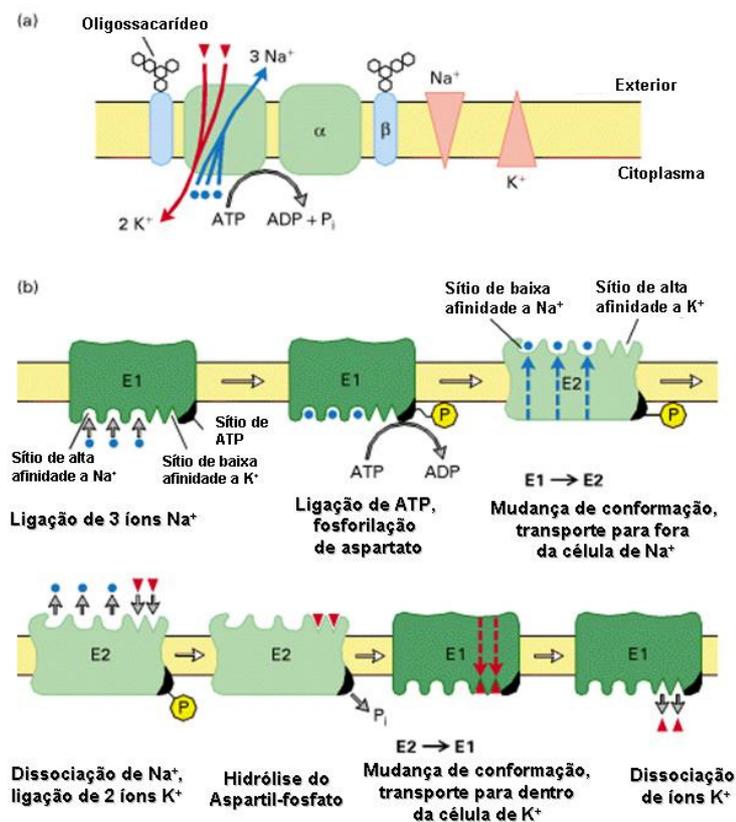


Figura 5: Modelo estrutural e ciclo catalítico da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase. (a) Esta bomba, que é do tipo P, apresenta duas cópias das sub-unidades α e β glicosiladas. A hidrólise de uma molécula de ATP dando origem a ADP e P_i é acoplada à extrusão de 3 Na^+ (círculos azuis) e captação de 2 K^+ (triângulos vermelhos) contra gradientes de concentração (triângulos grandes). (b) O transporte de íons pela ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase envolve um intermediário acil-fosfato de alta energia ($\text{E1} \sim \text{P}$). Neste caso, a hidrólise do intermediário $\text{E2} \sim \text{P}$ proporciona energia para o transporte de K^+ para dentro da célula. Adaptado de FÉRAILLE & DOUCET, 2001.

A ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase é composta de duas cadeias polipeptídicas principais, as sub-unidades α e β , associadas em uma razão molar de 1:1. A sub-unidade α é responsável pelas propriedades de catálise e de transporte da enzima, contendo

sítios de ligação para cátions, ATP e ouabaína, seu inibidor, além de sítios de fosforilação por diferentes proteínas cinase (FÉRAILLE & DOUCET, 2001; ARYSTARKHOVA *et al.*, 2002).

A sub-unidade β é essencial para a atividade normal da enzima e parece estar envolvida na oclusão do K^+ e na modulação da afinidade da enzima pelo Na^+ e pelo K^+ (GEERING, 2001). Além destas sub-unidades, foi identificada uma terceira, denominada γ , um pequeno polipeptídeo hidrofóbico (contém 53 aminoácidos). O RNAm dessa sub-unidade é altamente expresso no rim, mas apresenta-se em baixos níveis em outros epitélios e está ausente em outros tecidos. Portanto, ao contrário das sub-unidades α e β , a sub-unidade γ não é um requerimento absoluto para a atividade da $(Na^+K^+)ATPase$ (FÉRAILLE & DOUCET, 2001). Quando expresso em conjunto com as sub-unidades α e β , a sub-unidade γ parece estar envolvida na estabilidade da conformação E_1 (FÉRAILLE & DOUCET, 2001; ARYSTARKHOVA *et al.*, 2002; DEMPSKI *et al.*, 2005).

1.4 Na^+ -ATPase

Em 1969, Whittembury & Fishman observaram, em fatias de rim de rato, um mecanismo de transporte de Na^+ concomitante com Cl^- e água, na ausência de K^+ e na presença de ouabaína (WHITTEMBURY & FISHMAN, 1969). Em seguida, WHITTEMBURY & PROVERBIO (1970) verificaram, em homogenato de córtex renal de rato, a inibição deste transporte alternativo de Na^+ por ácido etacrínico (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970). Posteriormente encontraram, na fração microsomal de córtex de rim de rato, uma atividade ATPásica estimulada por Na^+ e insensível à ouabaína 10 mM (PROVERBIO *et al.*, 1975; PROVERBIO & DEL CASTILLO, 1981). Em 1985 MARÍN e colaboradores observaram em vesículas “inside-out” de membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ratos que essa bomba transportava Na^+ contra gradiente de concentração (MARÍN *et al.*, 1985). Depois, foi determinado que esse transporte era: (1) estimulado por Na^+ ; (2) inibido por ácido etacrínico, furosemida e triflocina; (3) insensível ao K^+ ; e (4) insensível à ouabaína (DEL CASTILLO *et al.*, 1982; MARÍN *et al.*, 1985; PROVERBIO *et al.*, 1988). Na ausência de KCl e presença de 7 mM de ouabaína este transporte corresponde a cerca de 10% do transporte de Na^+ mediado pela $(Na^+K^+)ATPase$ (PROVERBIO *et al.*, 1986; 1991). A partir do conjunto destes dados foi postulada a

presença de duas bombas de Na^+ no túbulo proximal: a clássica $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ insensível à ouabaína. As várias diferenças cinéticas encontradas entre a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Caracterização das atividades Na^+ e $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ em córtex de rim de rato

Característica	$\text{Na}^+\text{-ATPase}$	$(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$
Requerimento de Mg^{+2}	Sim	Sim
K_m^{MgATP} (mM:mM)	1,2:0,48	0,5:0,5
K_m^{Na} (mM)	8,0	16,0
Requerimento de K^+	Não	Sim
Estimulação por cátion	$\text{Na}^+ > \text{Li}^+$	$\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+$
Estimulação por ânion	Não	Não
Substrato	ATP	ATP >>> GTP, ITP, ADP, CTP
Temperatura ótima °C	47	52
pH ótimo	6,9	7,2
Sensibilidade à ouabaína (7mM)	0%	100%
Sensibilidade ao furosemide (2mM)	95%	5%
Sensibilidade ao ácido etacrínico (2mM)	100%	60%

ATP – adenosina trifosfato, GTP – guanosina trifosfato, ITP – inosina trifosfato, ADP – adenosina difosfato, CTP – citidina trifosfato. Adaptado de PROVERBIO *et al.*, 1989 e CARUSO-NEVES *et al.* 2002.

Mais recentemente, foi demonstrado que a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ forma um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico inibido pela furosemida e insensível ao K^+ . O peso molecular estimado para esta enzima é de 100 KDa (DE SOUZA, *et al.*, 2007; MARÍN, R. *et al.*, 1985). Em nosso laboratório, a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foi caracterizada como sendo uma ATPase do tipo P, apresentando duas conformações diferentes no seu mecanismo de catálise: E_1 e E_2 (DE SOUZA *et al.*, 2007). Inicialmente ocorre a ligação do Na^+ e, posteriormente, a ligação do ATP, formando um intermediário de alta energia ($E_i\text{-P}$). Este sofre uma mudança conformacional, originando um intermediário de baixa energia e pouca afinidade por Na^+ ($E_2\text{-P}$), o que acarreta na liberação do mesmo para o meio extracelular. Subseqüentemente,

se completa a hidrólise do intermediário e a liberação do Pi. A forma E₂ sofre então uma alteração conformacional retornando ao estado E₁ (DE SOUZA *et al.*, 2007). Esse ciclo catalítico é esquematizado na Figura 6.

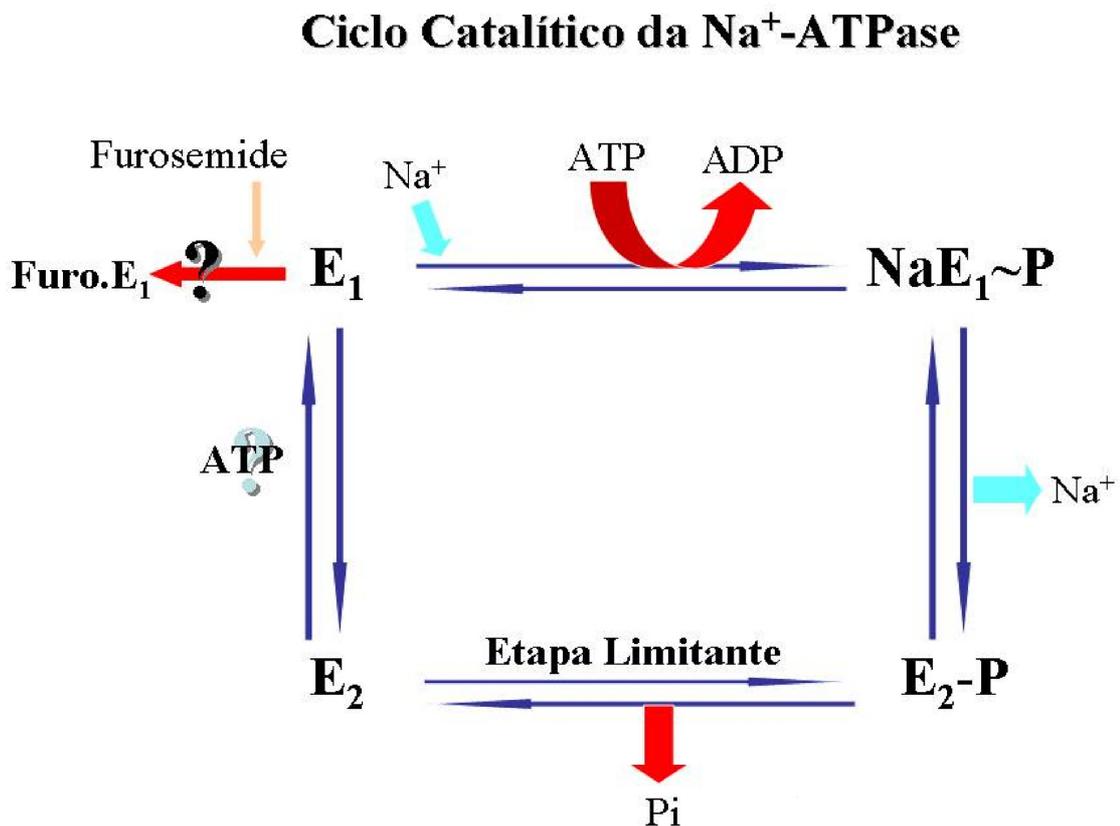


Figura 6: Ciclo catalítico proposto da Na⁺-ATPase. O ciclo inicial proposto por De Souza e colaboradores (2007) para a Na⁺-ATPase consiste das etapas: 1) Ligação do Na⁺, fosforilação por ATP formando um intermediário de alta energia (NaE₁~P), 2) interconversão para um intermediário de baixa energia e pouca afinidade por Na⁺ (E₂-P), 3) liberação do mesmo para o meio extracelular; 4) hidrólise do intermediário; 5) liberação de Pi; 6) nova mudança conformacional retornando ao estado E₁. O Furosemida inibe a formação do intermediário fosforilado.

A Na⁺-ATPase está presente em diferentes espécies de animais e protozoários (PROVERBIO *et al.*, 1975; BORGATTI *et al.*, 1985; PAGLIARANI *et al.*, 1988; VENTRELLA *et al.*, 1990; MORETTI *et al.*, 1991; CARUSO-NEVES *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; 2000a; 2000b; 2001; 2002; RANGEL *et al.*, 2001; 2002; LARA *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2004). Por estar presente em organismos inferiores, nos quais a (Na⁺+K⁺)ATPase se encontra ausente, acredita-se que esta enzima possa ter antecedido a (Na⁺+K⁺)ATPase na escala evolutiva (BENITO *et al.*, 1997). Foi sugerido por Borgatti e colaboradores (1985) que a Na⁺-

ATPase, em mamíferos, teria distribuição paralela à da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, o que justificaria a dificuldade de isolar essa enzima. Foi observado em nosso laboratório que a imunoprecipitação com anticorpo consenso contra todas as isoformas de subunidades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ abole quase que completamente sua atividade, ficando mantida cerca de 90% da atividade Na^+ -ATPásica, indicando que estas enzimas são entidades protéicas distintas (dados não publicados).

Apesar dos muitos trabalhos já publicados sobre a Na^+ -ATPase, seu papel fisiológico ainda não foi definitivamente estabelecido. A partir da observação, em células do córtex renal de rato, de que a Na^+ -ATPase é estimulada por choque hiposmótico, foi formulada a hipótese de que ela estaria relacionada com a regulação do volume intracelular (PROVERBIO *et al.*, 1988a; 1988b). Além disso, foi visto, em vesículas *inside-out* derivadas da membrana basolateral do intestino delgado de rato, que o acúmulo de Na^+ correlato à Na^+ -ATPase era estimulado pela diminuição da osmolalidade do meio (MARÍN *et al.*, 1986).

Por outro lado, a participação dessa enzima na reabsorção de Na^+ no túbulo proximal é compatível com os dados de diferentes estudos que mostraram que: (a) a reabsorção de Na^+ em túbulos proximais é inibida por furosemida, inibidor da Na^+ -ATPase, como mostram experimentos realizados através de técnicas de micropunção de néfrons corticais (MALNIC *et al.*, 1969); (b) ratos alimentados com dieta rica em NaCl durante um período de quatro meses apresentam um aumento de 70% no acúmulo de Na^+ medido em vesículas de membrana basolateral de túbulo proximal de rim, enquanto a atividade $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPásica}$ permanece inalterada (MARÍN *et al.*, 1986); (c) compostos natriuréticos inibem a atividade Na^+ -ATPásica de túbulo proximal e compostos antinatriuréticos a estimulam (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; 2000a; 2000b; 2001; 2003a; 2003b; DE SOUZA *et al.*, 2004, LARA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2004; RANGEL *et al.*, 1999; 2001; 2002).

Considerando essas evidências, nosso grupo vem propondo que a Na^+ -ATPase participe da regulação do volume extracelular por meio do ajuste fino da excreção renal de Na^+ . Desta forma, esta enzima seria um dos alvos da regulação rápida da excreção renal de Na^+ durante variações do volume extracelular.

1.5 Regulação hormonal da (Na⁺+K⁺)ATPase e da Na⁺-ATPase

Diferentes hormônios, como aldosterona, ANP, urodilatina, hormônio paratireoideano, angiotensina II, insulina e glicocorticóides, e neurotransmissores, como dopamina, adrenalina, noradrenalina, regulam a reabsorção de Na⁺ ao longo dos túbulos renais (FÉRAILLE & DOUCET, 2001). Os transportadores ativos primários são alvos de ação destas substâncias e, desta forma, o estudo da modulação hormonal desses transportadores é fundamental para a compreensão dos mecanismos reguladores do volume extracelular. Esta regulação pode se dar através da ativação de vias de sinalização rápidas ou lentas (CANDIDO *et al.*, 2004). O aumento imediato das atividades estimuladas por Na⁺ promovido por hormônios pode envolver: (1) o aumento da velocidade de transporte da bomba; (2) mudança da afinidade da enzima por seus substratos; e (3) modificação do número de unidades enzimáticas nas membranas celulares, através da translocação de unidades armazenadas em compartimentos intracelulares (CANDIDO *et al.*, 2004). Nesse contexto, no presente trabalho será dado um enfoque maior aos processos de regulação rápida.

Um importante mecanismo de regulação da atividade Na⁺-ATPásica é a fosforilação por proteínas cinase. Em nosso laboratório foi anteriormente mostrado que a atividade dessa enzima é modulada por PKA, PKC e PKG (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000; 2003a; RANGEL *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2004). Quando ativadas isoladamente, PKA e PKC promovem o aumento da atividade Na⁺-ATPásica, como mostram as seguintes observações: (1) a toxina da cólera estimula a atividade Na⁺-ATPásica de maneira dose dependente, efeito semelhante ao observado com AMPc; (2) forskolina, um ativador de adenilato ciclase, aumenta a atividade da enzima; (3) o inibidor de PKA reverte o efeito de AMPc e de PKA; (4) ésteres de forbol estimulam a atividade Na⁺-ATPásica, sendo este efeito revertido por inibidor de PKC; (5) a subunidade catalítica da PKC promove o estímulo da atividade da enzima (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000a; RANGEL *et al.*, 2001; 2002; LOPES *et al.*, 2004).

Caruso-Neves e colaboradores (1997) mostraram que adenosina, um autacóide envolvido na regulação da hemodinâmica renal, modula a atividade Na⁺-ATPásica de maneira bifásica. Baixas concentrações de adenosina (10⁻¹⁰M a 10⁻⁶M) inibem a enzima, enquanto que altas concentrações (até 10⁻³M) revertem a atividade

para os níveis controle. Nestas condições, foi observado que o receptor A está envolvido na via inibitória através da ativação de uma proteína G_i que promove a inibição da adenilato ciclase diminuindo os níveis de AMP e a atividade da PKA (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997), enquanto o receptor A_2 está envolvido na fase estimulatória, ativando uma proteína G_s , que ativa a adenilato ciclase e, conseqüentemente, a PKA (CARUSO-NEVES *et al.*, 2003a).

Investigações análogas foram realizadas com substâncias natriuréticas, tais como bradicinina (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999b) e com substâncias antinatriuréticas, tais como angiotensina II (Ang II) (RANGEL *et al.*, 1999). Foi observado que substâncias natriuréticas inibem a atividade da enzima, enquanto que substâncias antinatriuréticas a estimulam, sendo que estes efeitos envolvem a ativação de diversas vias de sinalização. Essas observações estão de acordo com o fato de que a enzima é alvo da modulação de diferentes hormônios e autacóides envolvidos na regulação do volume extracelular (CANDIDO *et al.*, 2004).

Bradicinina, através da interação com o receptor B_2 , inibe a atividade da enzima através da ativação da via da proteína G / fosfolipase C (PLC) / PKC que estimula a PLA_2 , formando prostaglandina E_2 (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999b; 2003a; 2003b). Além disso, ANP e urodilatina inibem o transporte de sódio através da ativação de guanilato-ciclase, aumentando os níveis de $GMPc$ e, conseqüentemente, ativando a PKG (BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002).

1.6 Mecanismos de regulação do volume extracelular

A variação do volume do fluido extracelular (VEC) é detectada por sensores apropriados que, uma vez ativados, deflagram uma série de respostas que modulam a excreção renal de Na^+ . Alterações no ritmo de filtração glomerular (RFG) e/ou na reabsorção de Na^+ ao longo dos diferentes segmentos do néfron podem modificar a excreção renal de Na^+ (MADDOX & BRENNER, 2004). Assim sendo, uma diminuição da excreção de Na^+ pode ser conseqüência do aumento da reabsorção de Na^+ e/ou da diminuição do RFG.

Diferentes tipos de sensores estão envolvidos na regulação do volume extracelular e podem ser classificados em renais e extra-renais. Esse último grupo comporta dois subgrupos:

- Sensores localizados no território de alta pressão (sistema arterial): alterações na pressão arterial ou na amplitude da pressão arterial (diferença entre a pressão sistólica e a diastólica) são percebidas pelos barorreceptores arteriais localizados no arco aórtico e nos seios carotídeos (MADDOX & BRENNER, 2004).

- Sensores localizados no território de baixa-pressão da circulação (sistema venoso), particularmente na região intratorácica, onde a tensão da parede vascular está diretamente relacionada ao volume do retomo sangüíneo. Essas modificações são detectadas por terminações nervosas especializadas, localizadas nas grandes veias intratorácicas, nos átrios e nos ventrículos cardíacos (ABASSI *et al.*, 2004).

Os sensores renais estão localizados no aparelho justaglomerular. Esta estrutura está localizada no pólo vascular do glomérulo, onde células do músculo liso vascular e células tubulares da mácula densa estão próximas. As duas alterações dependentes de volume que ocorrem nessa região são as mudanças de pressão nas arteríolas aferentes e as alterações no transporte tubular de NaCl nas células da mácula densa (ABASSI *et al.*, 2004; DWORKIN & BRENNER, 2004; MADDOX & BRENNER, 2004; FORD *et al.*, 2005).

Através desses sensores é desencadeada uma série de respostas que levam à ativação ou à inibição dos sistemas natriuréticos e antinatriuréticos. Os principais sistemas envolvidos são o da renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o sistema de peptídeos natriuréticos. Uma diminuição do VEC ativa o SRAA, o que leva, entre outras respostas, à diminuição da excreção renal de Na⁺. Por outro lado, o aumento do VEC irá levar à ativação da síntese de peptídeos natriuréticos que aumentam a excreção renal de Na⁺. Portanto, a regulação do volume extracelular se dá pelo balanço entre os sistemas natriuréticos e antinatriuréticos. Deve ser lembrado que, além desses, o sistema caliceína-cininas e as prostaglandinas estão envolvidos na regulação do volume extracelular. Contudo, esses últimos possuem ações parácrinas ou até mesmo autócrinas, sendo principalmente moduladores dos sistemas SRAA e do peptídeo atrial natriurético - ANP (CANDIDO *et al.*, 2004; MADDOX & BRENNER, 2004; MOE *et al.*, 2004).

1.7 Peptídeos Natriuréticos

Em mamíferos foram primeiramente descritos quatro peptídeos natriuréticos: ANP, BNP, urodilatina e CNP, embora na utilização deste último não tenham sido

observados efeitos natriuréticos e diuréticos até o presente momento, nas concentrações fisiológicas, somente efeitos vasodilatadores. Sendo assim iremos enfatizar os estudos nos três primeiros peptídeos citados.

1.7.1 Peptídeo Atrial Natriurético (ANP)

Os peptídeos natriuréticos são sintetizados como preprohormônios (Figura 7), sendo que o preproANP humano possui 151 aminoácidos. A clivagem da porção amino-terminal resulta numa sucessão de sinais e clivagens que terão como resultado final o ¹²⁶proANP, que é a forma predominante armazenada em grânulos atriais. ProANP é rapidamente clivado quando é secretado pela membrana por uma serina protease cardíaca chamada *Corin*, formando o peptídeo biologicamente ativo de 28 aminoácidos (YAN *et al.*, 2000). Ratos *corin*-deficientes não têm níveis detectáveis da forma madura de ANP no coração além de desenvolverem hipertensão (CHAN *et al.*, 2005).

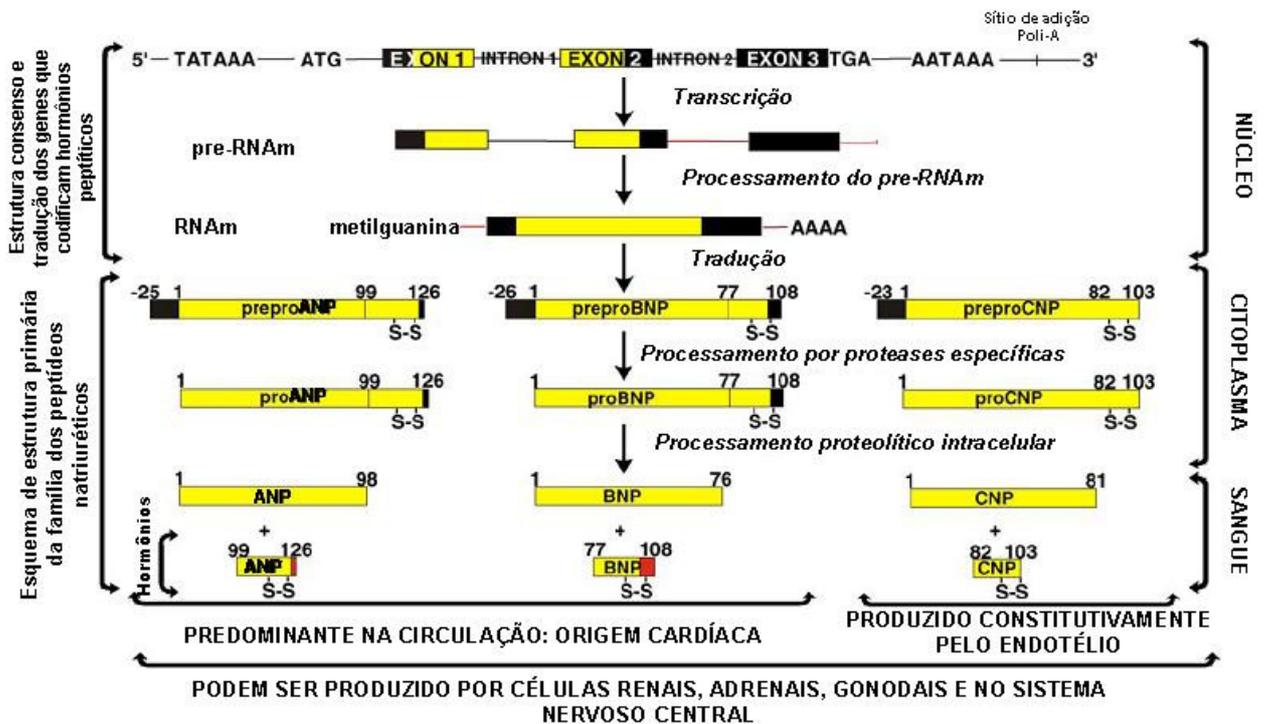


Figura 7: Representação esquemática da estrutura consenso e eventos de tradução dos genes dos peptídeos natriuréticos - ANP, BNP e CNP. (Adaptado de YAN *et al.*, 2000).

Os efeitos renais do ANP têm sido associados a um outro peptídeo semelhante, possivelmente originado de um processamento alternativo do pró-ANP por uma protease desconhecida no rim, o que gera um peptídeo de 32 aa (4 aminoácidos a mais na posição amino terminal) chamado urodilatina (BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002) (Figura 8). McKenzie e colaboradores (1985) sugeriram que a urodilatina possa ser produzida em células do epitélio renal quando, utilizando anticorpos para o ANP, detectaram quantidades significativas de peptídeos semelhantes ao ANP em grânulos das células intercalares de túbulos coletores de ratos. Embora têm sido observado efeitos de ANP em modelos renais, ainda não foi comprovado algum indício de sua produção em tecido renal (SILVER, 2006). Com isso, Silver (2006) sugeriu que os efeitos renais dos peptídeos natriuréticos ocorreriam pela produção e liberação de urodilatina e não através do ANP.

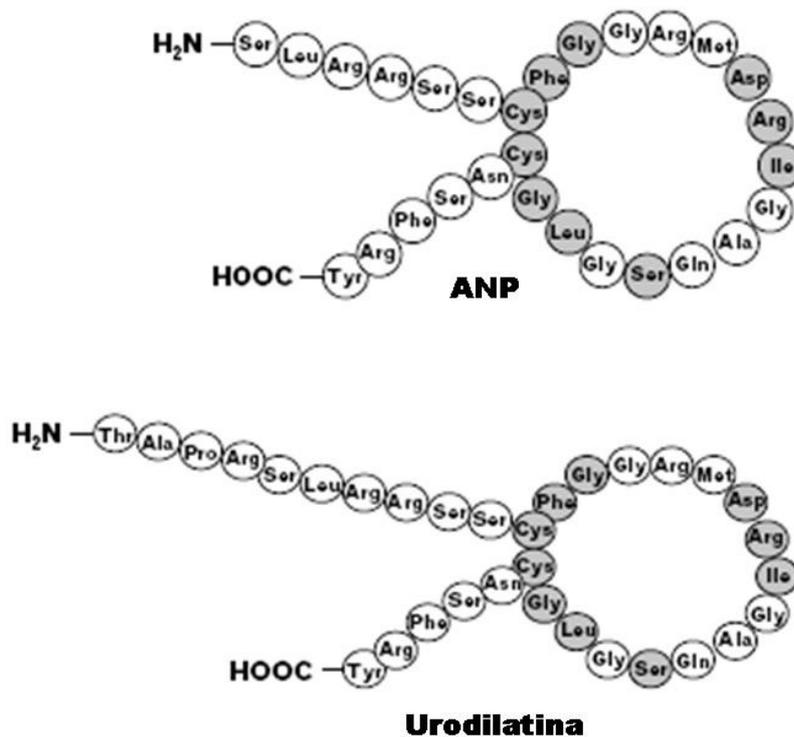


Figura 8: Estrutura esquemática de ANP e urodilatina (adaptado de BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002).

O ANP é expresso e armazenado principalmente em grânulos atriais, embora esteja presente em mais baixas concentrações em outros tecidos como os ventrículos, o que é ilustrado pelo esquema apresentado na Figura 9. No rim, ainda

que tenha sido detectado o RNAm do prépróANP, não foi detectado ANP em grânulos citoplasmáticos, como ocorre no coração (SILVER, 2006). No rim porém foi detectado o RNAm do pré e não o ANP em grânulos citoplasmáticos como encontrado no coração, contudo foi observado a liberação de urodilatina. O estímulo primário para a liberação de ANP é o estiramento da parede atrial causada pelo aumento do retorno venoso, decorrente do aumento do volume intravascular (DE BOLD *et al.*, 1986; EDWARDS *et al.*, 1988; OGAWA *et al.*, 1999; GARDNER, 2003). Uma vez secretado, o ANP liberado entra na circulação onde começa a atuar de maneira endócrina em vários órgãos (LEDSOME & KING, 1995; SILVER, 2006). Além disso, hormônios como endotelina, angiotensina e arginina-vasopressina (LACHANCE *et al.*, 1986; STASCH *et al.*, 1989; SOUALMIA *et al.*, 1997) estimulam a liberação do ANP (GARCIA *et al.*, 1986; LISY *et al.*, 2005). Como está mostrado na Tabela 3, a concentração deste peptídeo no plasma é aproximadamente 10 fmol/mL, podendo ser 10-30 vezes maior em pacientes com parada cardíaca congestiva (CODY *et al.*, 1986; MUKOYAMA *et al.*, 1991).

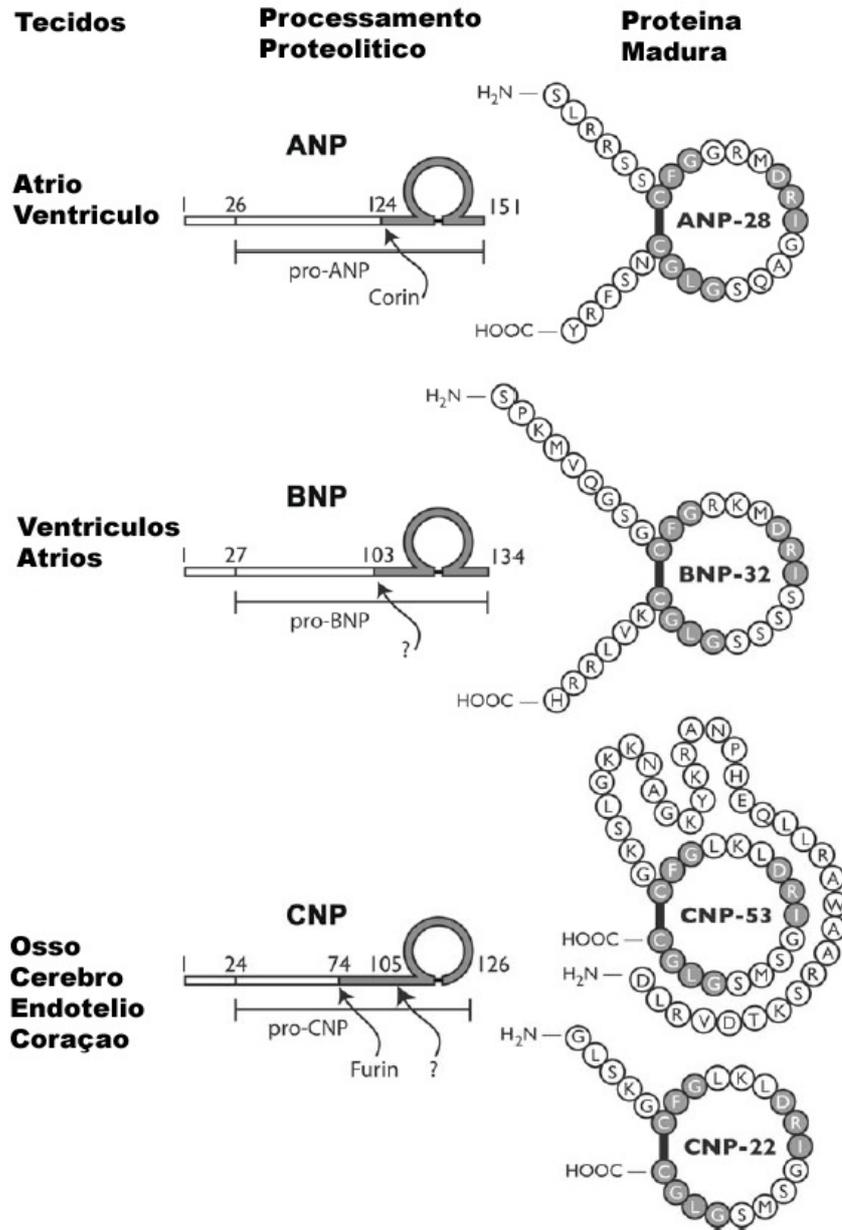


Figura 9: Esquema que ilustra a expressão do ANP, do BNP e do CNP (Adaptado de DE BOLD *et al.*, 1986)

Tabela 3: Localização do gene, concentração plasmática e meia vida dos peptídeos natriuréticos humano.

	ANP	BNP	CNP
Nome do gene	NPPA	NPPB	NPPC
Localização do gene	1p36.2	1p36.2	2q24-qter
Meia vida (min)	~2	~20	2,6
Concentração plasmática (pmol/L)			
Normal	6,4±0,9	0,9±0,007	1,4±0,6
Falência renal crônica	43±11	130±37,4	3,0±0,4

O gene de ANP humano está localizado no cromossomo 1p36.2, enquanto que no rato está no cromossomo 4 (YANG-FENG *et al.*, 1985). Os genes do ANP, BNP e CNP contêm três *exons*. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tem sido proposto que o gene do ANP (Nppa) possa ser um forte marcador da hipertensão neste modelo. Foi observado que a perda da função do gene do ANP (Nppa) é acompanhada de uma marcante hipertensão, corroborando com o que fora visto, como não sendo do tipo sal-sensível (JOHN *et al.*, 1995; YE & WEST, 2003; HOUWELING *et al.*, 2005). Posteriormente, porém, o mesmo laboratório verificou que em animais deficientes de ANP as pressões sanguíneas não são influenciadas pela alteração da ingesta de sal (JOHN *et al.*, 1995).

1.7.2 Peptídeo Natriurético do tipo B (BNP)

O BNP foi inicialmente purificado de extrato de cérebro de porco, sendo esta a razão pela qual este peptídeo foi então primeiramente denominado peptídeo natriurético de cérebro (BNP; (SUDOH *et al.*, 1988a; 1988b). Porém, foi posteriormente encontrado em concentrações mais altas em ventrículos cardíacos de pacientes ou animais que sofrem distensão cardíaca, como ocorre na parada cardíaca congestiva ou no infarto do miocárdio (TAMURA *et al.*, 2000; GARDNER, 2003; GOETZE *et al.*, 2003; LISY *et al.*, 2005; TSUTAMOTO *et al.*, 2006). Por isto,

atualmente é chamado de BNP ou peptídeo natriurético do tipo B. O BNP humano é sintetizado como um preprohormônio de 134 aa que é clivado em um prohormônio de 108 aminoácidos (Figura 7). Posteriormente, ocorre uma quebra por uma protease desconhecida que resulta em um fragmento inativo de 76 aa amino-terminal (não funcional) e um de 32 aa carboxi-terminal biologicamente ativo. O tamanho do BNP completamente processado varia de acordo com as espécies. Em seres humanos, porco e cachorro, possui 32 aminoácidos e, em rato, apresenta 45 aminoácidos (SEILHAMER *et al.*, 1989; OGAWA *et al.*, 1994).

Embora o BNP seja armazenado com ANP em grânulos atriais, ele não é armazenado em grânulos nos ventrículos. Ao invés disso, a produção de BNP ventricular é transcricionalmente regulada por distensão da parede cardíaca no átrio, o que é o resultado da sobrecarga de volume. O fator de transcrição nuclear GATA 4 exerce um papel dominante, regulando este processo (SEILHAMER *et al.*, 1989; OGAWA *et al.*, 1994; LUCHNER *et al.*, 2001; MCBRIDE & NEMER, 2001; GOETZE *et al.*, 2006; TSUTAMOTO *et al.*, 2006). Em indivíduos saudáveis, as concentrações plasmáticas de BNP são de aproximadamente 1 fmol/mL (3,5 pg/mL) ou aproximadamente 1/10 da de ANP (Tabela 3). Por outro lado, concentrações plasmáticas de BNP de pacientes com parada cardíaca congestiva são entre 200-300 vezes maiores que o valor normal. A enorme diferença de concentração de BNP entre indivíduos normais e doentes faz dele um indicador ideal de hipertensão arterial e pacientes que tiveram parada cardíaca a pouco tempo (SEILHAMER, *et al.*, 1989; OGAWA *et al.*, 1994; LUCHNER *et al.*, 2001; MCBRIDE & NEMER, 2001; GOETZE *et al.*, 2006; TSUTAMOTO *et al.*, 2006).

Como mostra a Tabela 3, o gene do BNP humano se localiza no cromossomo 4,8 kilobases acima do gene de ANP no cromossomo 1p36.2 e também em ratos. Os ratos que possuem disfunções gênicas em ambos alelos do gene do BNP (Nppb) são animais normotensos e desenvolvem fibrose ventricular sensível a pressão (TAMURA *et al.*, 2000). Estes dados indicam, que, pelo menos em ratos, o BNP não é um regulador endócrino da pressão sanguínea, mas um importante regulador parácrino dos processos de fibrose ventricular do coração, além de um grande marcador de falência cardíaca e hipertensão arterial (SULLIVAN *et al.*, 2005; VUOLTEENAHO *et al.*, 2005; GOETZE *et al.*, 2006).

1.7.3 Receptores para peptídeos natriuréticos

Há três receptores conhecidos que ligam peptídeos natriuréticos em mamíferos: NPR-A, NPR-B e NPR-C (Figura 10). Eles também são conhecidos como GC-A, GC-B e o receptor de *clearance* ou como NPR1, NPR2 e NPR3, respectivamente. NPR-A e NPR-B representam duas das cinco guanilato ciclases de membrana encontradas em humanos (POTTER, 2005) e possuem ciclo de ativação muito semelhante (Figura 11). Os outros receptores da família são o GC-C, receptor para os peptídeos intestinais guanilina e uroguanilina, e Ret-GC-1 e Ret-GC-2, enzimas de retina que regulam o fotoreceptor do ciclo claro-escuro. O terceiro receptor de peptídeo natriurético, o NPR-C, não possui nenhuma atividade enzimática intrínseca conhecida, visto que o seu domínio guanilato ciclásico é truncado, porém tem sido visto que pode estar envolvido com efeitos biológicos via ativação de proteínas Gi/Go e PLC/PKC (PAGANO & ANAND-SRIVASTAVA, 2001; HOBBS *et al.*, 2004; ANAND-SRIVASTAVA, 2005; ROLLIN *et al.*, 2005).

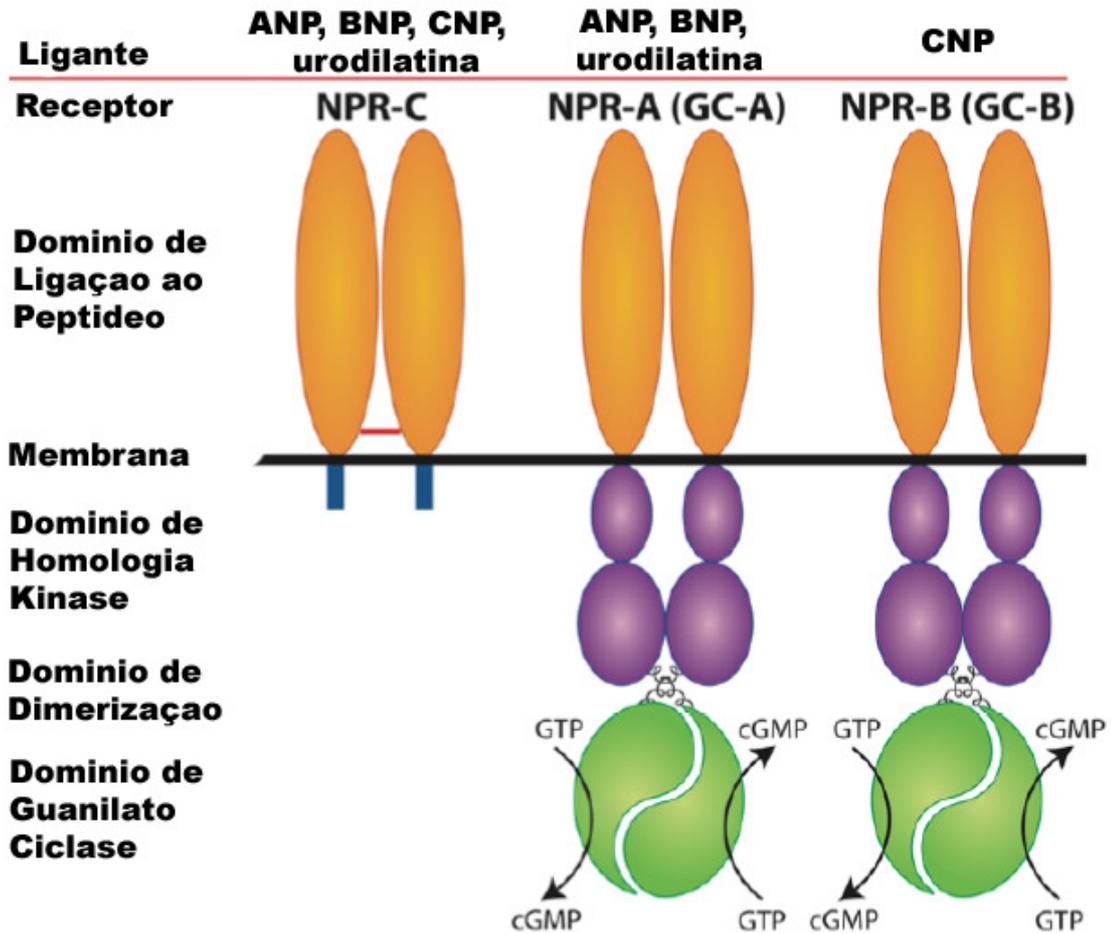


Figura 10: Estrutura dos principais receptores para peptídeos natriuréticos. NPR-C (receptor para peptídeos natriuréticos do tipo C); NPR-A (receptor para peptídeos natriuréticos do tipo A); NPR-B (receptor para peptídeos natriuréticos do tipo B). Adaptado de YAN *et al.*, 2000.

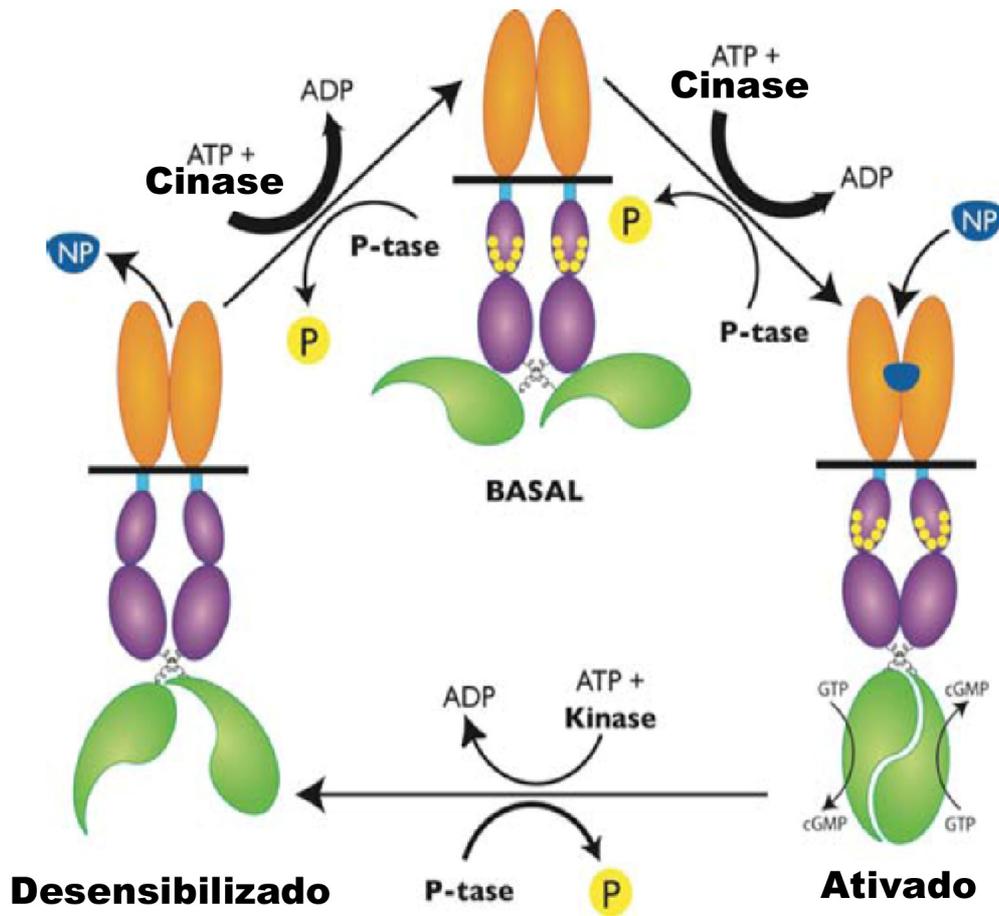


Figura 11: Ciclo de ativação dos receptores NPR-A ou NPR-B. NP – peptídeo natriurético; P-tase – fosfatase. Adaptado de YAN *et al.*, 2000.

1.7.4 Receptor natriurético A

O RNAm do NPR-A, tanto em seres humanos como no rato, é altamente expresso no rim, íleo, adrenal, tecidos gordurosos, aórticos e pulmonares (Tabela 4) (LOWE *et al.*, 1989; NAGASE *et al.*, 1997; OLIVER *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 2003). Análises de hibridação *in situ*, de tecidos de macacos resus, indicam que o RNAm do NPR-A é predominantemente detectado no rim, zona glomerulosa e medula adrenal, glândula pituitária, cerebelo e células endoteliais endocárdicas (WILCOX *et al.*, 1991). Análise de *Western Blot* mostrou alta quantidade da proteína NPR-A em pulmão, rim, adrenal, testículos e tecido de fígado de roedores (Tabela 4) (GOY *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2004). Em cultura de células o NPR-A foi encontrado em músculo liso vascular e células mesangiais renais. Sua expressão diminui dramaticamente com o aumento das passagens (KISHIMOTO *et al.*, 1991; SUGA *et al.*, 1992a). Na realidade, não há relatos de que células imortalizadas expressem

níveis altos deste receptor, embora baixa expressão seja observada em algumas linhagens celulares, como a embrionária de rim humano 293 e de feocromocitoma PC-12 (Tabela 4) (POTTER & HUNTER, 1998; POTTER, 2005).

Tabela 4: Expressão dos receptores dos peptídeos natriuréticos em linhagens celulares e tecidos.

Receptor	Expressão tecidual	Expressão em linhagem celular
NPR-A	Adrenal, Músculo liso vascular Cérebro, Pulmão, Rim, Adipócito, Coração.	Cultura primária de células de músculo liso vascular, Cultura primária de células mesangiais renais, PC-12, LLC-PK1
NPR-B	Condrócitos, Cérebro, Pulmão, Músculo liso vascular, Útero.	Cultura primária de células de músculo liso vascular, Músculo liso (A10, A7R5), Fibroblasto (NIH3T3, Balb3T3), Condrócitos (ATDC5)
NPR-C	Maioria dos tecidos.	Cultura primária de células de músculo liso vascular, Músculo liso (A10), Fibroblasto 3T3

O receptor de peptídeos natriuréticos ligado à guanilato ciclase apresenta uma semelhança com os receptores de fatores de crescimento, visto que sua estrutura possui: um domínio de ligação extracelular de aproximadamente 450 aa, uma única porção transmembrana hidrofóbica de 20-25 aa e um domínio intracelular de aproximadamente 570 aa (Figura 10). Neste último, possui um domínio de homologia quinase de 250 aa, uma porção helicoidal de dimerização de 40 aa e um domínio carboxi-terminal catalítico de 250 aa (Guanilato Ciclase). A ordem de afinidade deste receptor pelos peptídeos natriuréticos é ANP > BNP >> CNP (POTTER, 2005).

1.7.5 Efeitos do GMP cíclico

As respostas fisiológicas dos peptídeos natriuréticos ocorrem via síntese de GMPc, um segundo mensageiro intracelular clássico que foi identificado originalmente em urina de rato em 1963 (ASHMAN *et al.*, 1963). Há três proteínas conhecidas que ligam GMPc: proteínas quinases GMPc-dependentes (PKG), fosfodiesterases que ligam GMPc e canal iônico que liga nucleotídeo cíclico (Figura 12). Os efeitos sinalizatórios do GMPc classicamente descritos acontecem por PKGs, serina e treonina quinases que são ativadas por este mensageiro secundário (LOHMANN *et al.*, 1997; FEIL *et al.*, 2005; SCHLOSSMANN *et al.*, 2005). Há dois genes de PKG. O gene de PKGI possui um *splice* alternativo para produzir as isoformas alfa e beta que diferem entre si pela porção amino-terminal. Ambas as isoenzimas de PKGI são principalmente citosólicas e altamente expressas em plaquetas, músculo liso, cardiomiócitos e cérebro (FEIL *et al.*, 2005; SCHLOSSMANN *et al.*, 2005).

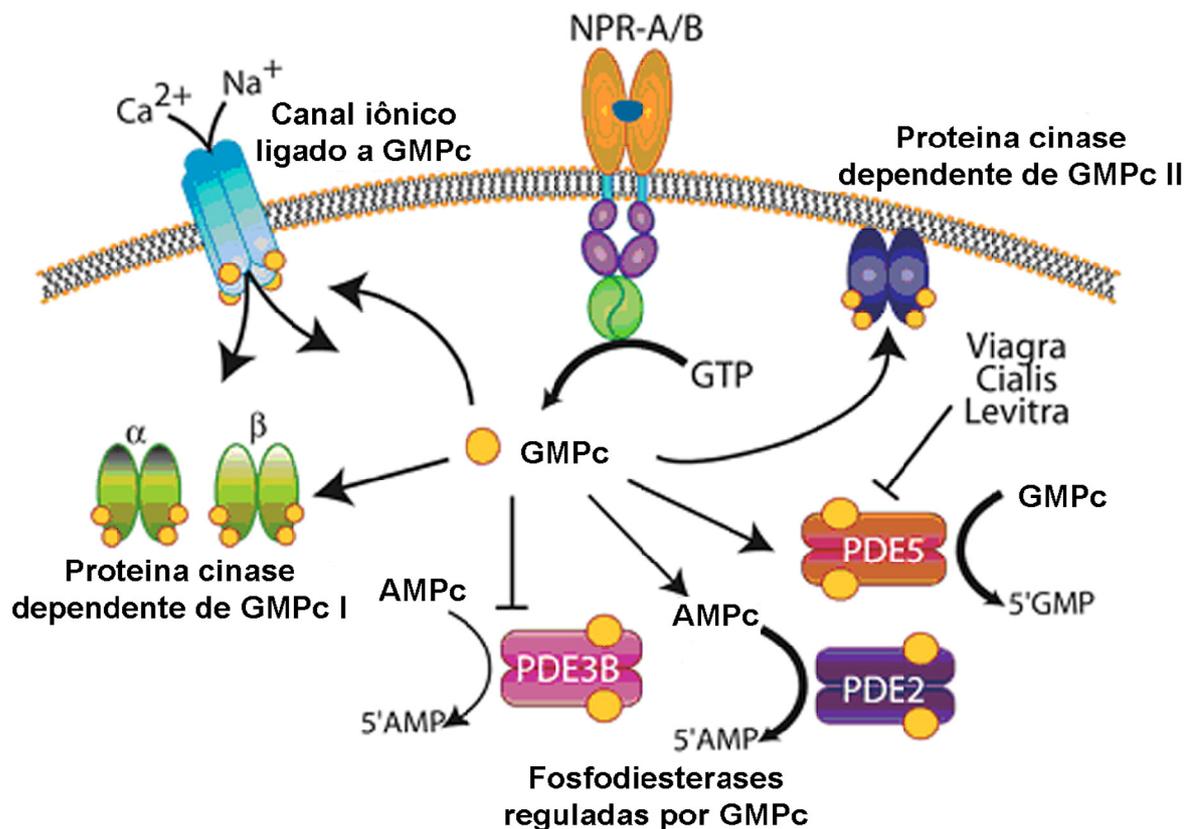


Figura 12: Possíveis vias de sinalização descritas para os receptores de peptídeos natriuréticos. (Adaptado de YAN *et al.*, 2000).

A deleção do PKGI funcional, por recombinação homóloga, em ratos resulta na perda do relaxamento de músculo vascular liso cGMP dependente e hipertensão em animais jovens (Pfeifer, Klatt *et al.*, 1998), mas não em adultos (SCHLOSSMANN *et al.*, 2005). PKGII é miristoilado na glicina-2, conferindo a possibilidade de ancoramento na membrana plasmática. Esta proteína é encontrada em concentrações altas no intestino, rim, cérebro, condrócitos e osso (Smolenski, Burkhardt *et al.*, 1998; FEIL *et al.*, 2005).

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) degradam os nucleotídeos cíclicos em nucleotídeo 5'-fosfato inativo, sendo reguladoras cruciais nessa via de sinalização. Conseqüentemente, PDEs regulam as concentrações dos segundos mensageiros intracelulares. Em mamíferos há onze famílias de PDEs, com pelo menos 25 proteínas diferentes (BEAVO, 1995; RYBALKIN *et al.*, 2003). As famílias são organizadas de acordo com a especificidade pelo substrato (se elas degradam AMPc, GMPc ou ambos) e como elas são ativadas ou inibidas. Podemos exemplificar, PDE1, 2, 3, 10 e 11 degradam GMPc e AMPc; PDE4, 7, e 8

especificamente hidrolizam o AMPc; e PDE5, 6, e 9 só degradam GMPc (MAURICE *et al.*, 2003). Algumas PDEs são reguladas alostericamente através de GMPc. Por exemplo, GMPc que liga a PDE5 aumenta a atividade desta enzima que irá, conseqüentemente, degradá-lo em um mecanismo de retro alimentação (Figura 12). Alternativamente, ativação alostérica pode facilitar o *cross-talk* entre o GMPc e o AMPc. Por exemplo, o GMPc, dependendo do tipo de PDE que ele ativar, poderá levar a uma diminuição dos níveis de AMPc intracelular, via ativação de uma PDE2; ou a um aumento dos níveis de AMPc, via inibição de PDE3. (RUTH, 1999; MAURICE *et al.*, 2003; RYBALKIN *et al.*, 2003).

1.7.6 Efeitos de ANP e urodilatina em natriurese e diurese

No rim, o ANP e a urodilatina, que possuem efeitos semelhantes, aumentam a taxa de filtração glomerular, inibem a reabsorção de sódio e de água e reduzem a secreção de renina (Figura 13). Diurese e natriurese dependente destes peptídeos são mediadas exclusivamente por NPR-A em ratos, uma vez que estes efeitos estão completamente perdidos em animais nocaute para NPR-A (KISHIMOTO *et al.*, 1996; POTTER & HUNTER, 1998; ELLMERS *et al.*, 2002). Estes peptídeos aumentam o ritmo de filtração glomerular por elevar a pressão nos capilares glomerulares, coordenando dilatação da arteríola aferente e constrição da eferente (SILVER, 2006). Além destes efeitos hidráulicos, o ANP e a urodilatina inibem a reabsorção de sódio e água ao longo do néfron. No túbulo proximal, inibem o efeito da angiotensina II na reabsorção de sódio e transporte de água (HARRIS *et al.*, 1987). Nos ductos coletores reduzem a absorção de sódio pela inibição de um canal de cátion sensível ao amiloride (LIGHT *et al.*, 1990; ZEIDEL, 1990). Os efeitos do ANP e da urodilatina em ambos os processos de transporte é dependente de GMPc (NAKAMURA *et al.*, 2002).

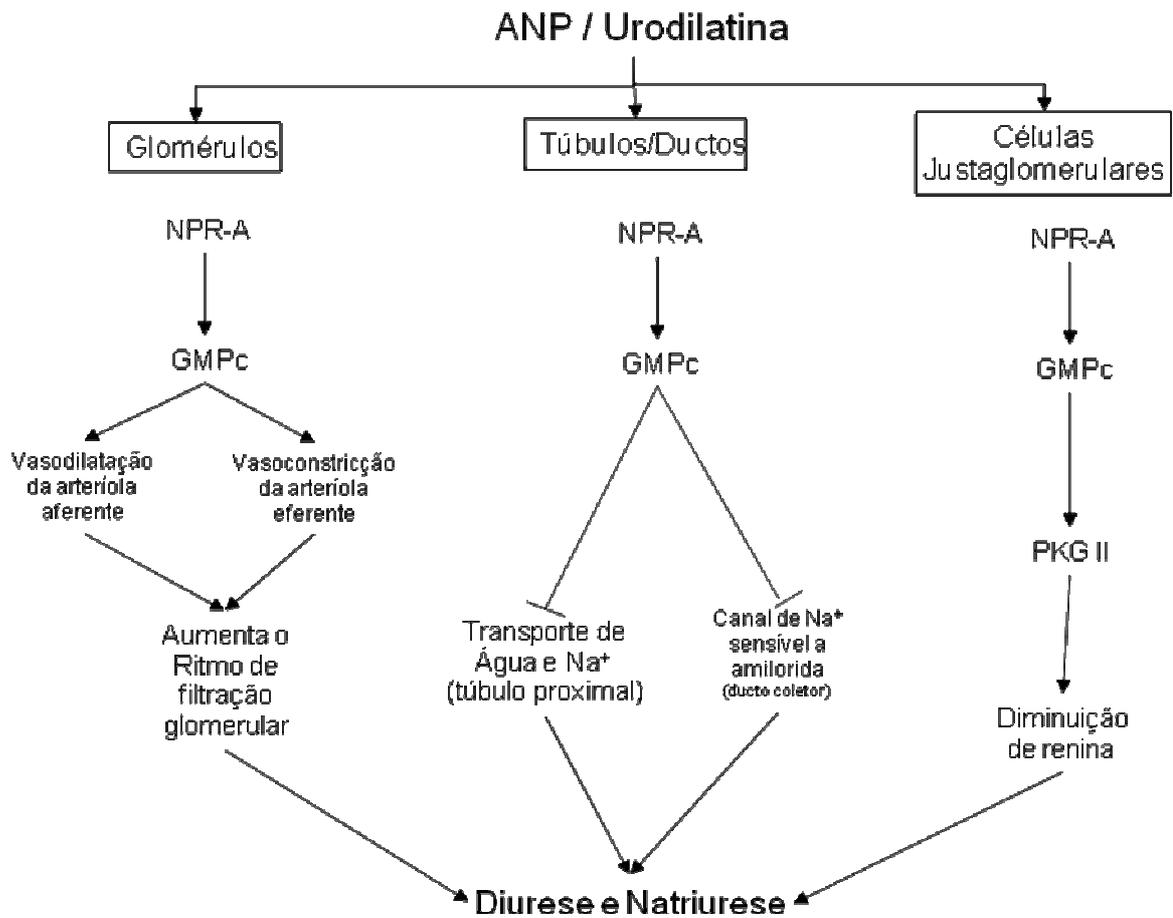


Figura 13: Efeitos do ANP no rim (NAKAMURA *et al.*, 2002).

II OBJETIVOS

➤ Identificar o papel dos peptídeos natriuréticos sobre a atividade das bombas $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$, em fração enriquecida de membrana basolateral de córtex de rim de porco;

➤ Identificar os diferentes mecanismos moleculares envolvidos neste processo presente neste modelo;

➤ Identificar o papel dos peptídeos natriuréticos sobre a atividade das bombas $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$, em células da linhagem LLC-PK1, originárias de túbulo proximal de porco;

➤ Identificar os diferentes mecanismos moleculares envolvidos neste processo presente neste modelo.

III MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos sobre a modulação da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ pelo ANP, pelo BNP e pela urodilatina foram realizados em rim de porco, visto que apresenta semelhanças funcionais em relação ao humano. Para tanto foi utilizado homogenato purificado de córtex e/ou fração enriquecida de membrana basolateral de túbulos proximais e em células LLC-PK1, conforme especificado abaixo.

III.1 Preparação de fração enriquecida de membrana basolateral de túbulo proximal de rim de porco.

A fração enriquecida de membrana basolateral de túbulos proximais de rins de porco foi obtida segundo o método originalmente descrito por SCALERA e colaboradores (1980) e posteriormente modificado (SACKTOR *et al.*, 1981; BOUMENDIL-PODEVIN & PODEVIN, 1983). Os rins de porcos foram retirados no momento do abate, em matadouro comercial (Matadouro Anchieta, Rio de Janeiro, RJ), e mantidos em solução I, resfriada a 4°C, durante o transporte para o laboratório, por período que não excedeu 2 horas. A solução I contém: sacarose 250mM, HEPES (N-[2-hidroxi etil]piperazina-N'-[2-ácido etano sulfônico]) 10mM, EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) 2mM, PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonila) 1mM. O pH foi ajustado para 7,6 com TRIZMA base (tris[hidroximetil] aminoetano) 2mM.

Para a obtenção dessas preparações foram utilizados 12 pares de rins, dos quais a porção mais externa do córtex (*cortex-cortecis*), composta principalmente por túbulos proximais, foi dissecada sobre uma superfície de vidro e homogeneizada em solução I, a 4°C, na proporção de 4,0 mL de solução por grama de tecido (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970). O homogeneizador utilizado foi do tipo POTTER, com pistilo de teflon, sendo empregados 20 movimentos completos para totalizar o procedimento. Para a eliminação de organelas e restos celulares e obtenção da fração enriquecida de membrana basolateral, o homogenato foi submetido a centrifugações sucessivas.

Inicialmente, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 1.500g, em centrífuga Hitachi – Himac, modelo SCR 20B (Tóquio, Japão), utilizando rotor

RPR12-2 Beckman (Califórnia, USA). Parte do sobrenadante purificado de córtex de rim de porco foi reservada, alíquotada e armazenada a 4°C. Em seguida, a parte restante desse sobrenadante foi centrifugada por 44 minutos a 13.000g em centrífuga Hitachi - Himac, modelo CP70 (Tóquio, Japão), utilizando rotor 35 Beckman (Califórnia, USA). O sobrenadante obtido nesta fase foi desprezado, sendo mantido o sedimento constituído por três camadas. A camada mais externa deste sedimento triplo, com cor esbranquiçada e textura macia (camada “fluffy”, foi ressuspendida, através de movimentos manuais circulares, em 4,0 mL de solução II a 4°C. A solução II contém: sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, PMSF 1 mM, com o pH ajustado a 7,6 com TRIZMA base 2mM. À suspensão obtida, correspondente à fração bruta de membranas plasmáticas, foi adicionado Percoll 12% (v/v), sendo o volume final de 52,0 mL ajustado com solução II, a 4°C. A suspensão final foi homogeneizada por dez vezes em homogeneizador tipo POTTER com pistilo de teflon e centrifugada por 66 minutos a 40.000g, em centrífuga Hitachi - Himac, modelo CP70 (Tóquio, Japão) com rotor 60 Ti Beckman (Califórnia, USA). Assim, através da técnica do gradiente de densidade de Percoll foi obtida a separação, por diferença de densidade, das diversas frações de membrana contidas na fração bruta de membranas plasmáticas (GRASSL & ARONSON, 1986). A fração de membrana basolateral foi aspirada e homogeneizada por dez vezes em homogeneizador do tipo potter com pistilo de teflon e então centrifugada por 60 minutos a 200.000g em centrífuga Hitachi - Himac, modelo CP70 (Tóquio, Japão) utilizando rotor 50 Ti Beckman (Califórnia, USA), para a sedimentação do Percoll (SACKTOR *et al.*, 1981). A fração de membrana basolateral (MBL) enriquecida foi ressuspendida em sacarose 250mM para obtenção da proteína em concentração final em torno de 6,0mg/mL. Alíquotas de 0,5 mL foram armazenadas no congelador por um período máximo de até 60 dias. A dosagem da concentração da proteína na suspensão de membrana basolateral foi realizada pelo método de Lowry (1951).

A atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase na preparação foi sistematicamente determinada, uma vez que esta enzima é usada como marcador da membrana basolateral (SCALERA *et al.*, 1980; GMAJ *et al.*, 1982). A atividade específica da (Na⁺+K⁺)ATPase na suspensão de membrana basolateral foi cerca de 5-8 vezes maior que no homogenato total.

III.2 Medida da atividade ATPásica

A atividade ATPásica foi medida pelo método descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981). A reação foi iniciada com a adição da suspensão do homogenato purificado ou da fração enriquecida de membrana basolateral ao meio de reação. A composição do meio de ensaio (0,1 mL) foi: $MgCl_2$ 10 mM; $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ 2.000 cpm/nmol; HEPES-TRIZMA Base 20mM (pH 7,0); NaCl 90 mM; ATP- Na^+ 5 mM (pH 7,0); ouabaína 1 mM. O volume de proteína (suspensão do homogenato purificado ou da fração enriquecida de membrana basolateral) adicionado foi tal que sua concentração final no meio fosse 0,3 mg/mL. Após 10 minutos de incubação a 37°C a reação foi parada pela adição de 0,5 mL de carvão ativado (0,25 g/mL) com HCl 0,1 N. Desta forma, o $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ não hidrolisado é adsorvido ao carvão ativado e precipitado quando as amostras são centrifugadas a 1.900g durante 5 minutos em centrífuga Fanem modelo Excelsa Baby II (São Paulo, Brasil). Alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante contendo o ^{32}P resultante da hidrólise do nucleotídeo radiomarcado foram retiradas e transferidas para pedaços de papel de filtro com dimensões de 2,5 x 7,0 cm. Secos, os papéis foram transferidos para frascos contendo líquido de cintilação composto por uma solução de tolueno contendo 200 mg/L de POPOP (1-[feniloxazol]) e, então, processados em contador de cintilação líquida Packard Tricarb modelo A2100 TR (Illinois, USA).

A atividade da Na^+ -ATPase foi calculada pela diferença entre as atividades ATPásicas medidas na ausência e na presença de Furosemida 2mM, inibidor específico desta enzima (DEL CASTILLO *et al.*, 1982; PROVERBIO *et al.*, 1986), sempre na presença de ouabaína 1 mM. Analogamente, a atividade da $(Na^++K^+)ATPase$, medida na presença de 120 mM de Na^+ e 30 mM de K^+ , foi determinada pela diferença entre as atividades ATPásicas obtidas na ausência e na presença de ouabaína 1 mM, inibidor específico desta enzima (GRUBMEYER & PENEFSKY, 1981). A atividade específica foi determinada pela diferença da quantidade de ^{32}P formado a partir da hidrólise do $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ pelas ATPases, na presença e ausência de seus inibidores, por minuto e por mg de proteína ($nmol\ Pi \times mg^{-1} \times min^{-1}$).

As concentrações protéicas foram determinadas pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

III.3 Medida da atividade de proteínas cinase G

A medida da atividade de proteínas cinase foi iniciada com a adição da membrana basolateral enriquecida (70µg) ao meio de reação (volume final de 0,1mL) contendo [γ - 32 Pi]ATP (15.000 cpm/nmol), MgCl₂ 4mM; ATP-Mg⁺² 10pM; HEPES-TRIZMA Base (pH 7,0) 20mM; histona-1S 0,8 mg/mL (substrato da enzima).

Após 10 minutos de incubação a 37°C, a reação foi parada com 0,1 mL de uma solução gelada contendo ácido tricloroacético (TCA) 40% e os tubos colocados no gelo. Os filtros de nitrocelulose Millipore (0,45 µm) utilizados para a filtração a vácuo foram previamente lavados em tampão fosfato (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0) 4mM. Uma alíquota de 0,1 mL da amostra foi aplicada nos filtros e lavada seqüencialmente com 4mL de TCA 20% e 3mL de tampão fosfato (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0) 4mM. A proteína retida no filtro foi quantificada em contador de cintilação líquida Packard Tri-carb modelo A2100 IR (Illinois, USA).

A atividade da proteína cinase G foi calculada pela diferença entre a quantidade de fosfoproteína (P-Histona) formada na ausência e na presença de um inibidor específico de PKG, o KT5823 10⁻¹⁰M. Conforme os diferentes protocolos experimentais utilizados, como descrito em "Resultados", foram adicionados ANP 10⁻¹¹M, LY83583 10⁻⁸M, db-GMPc 10⁻¹⁰M e Urodilatina 10⁻¹¹M.

A ligação inespecífica do [γ - 32 P]ATP e do 32 Pi à membrana foi medida através de ensaios paralelos, nos quais a proteína foi adicionada somente após a prévia adição da solução de TCA 40%. Os valores da ligação inespecífica foram descontados das contagens obtidas no ensaio correspondente.

III.4 Análise Eletroforética

A técnica de SDS-PAGE foi utilizada como a primeira etapa da técnica de *Western Blot* com o objetivo de separar as proteínas da fração enriquecida de membrana basolateral de acordo com o seu peso molecular. A uma alíquota contendo 50 µg desta fração foi adicionado 10 µL de uma solução tampão contendo Trizma base 0,76% (p/v); glicerol 12,5% (v/v); SDS 2,3% (p/v); β3-mercaptoetanol 400 µL e azul de bromofenol 0,19% (p/v), tendo sido então o volume final dos reagentes fervido por 1 mim. No gel SDS-PAGE 7,5% foram aplicados 50µg de proteína paralelamente a um padrão de peso molecular (Full-Range Rainbow

10.000-250.000 Da, Amershan-Biosciences-Brasil). Este gel era composto por duas camadas, uma de separação, formada por acrilamida 7,5% (gel inferior) e uma de empacotamento, constituída por acrilamida 4,5% (gel superior), segundo a tabela abaixo:

Soluções	Gel Inferior	Gel Superior
acrilamida-bisacrilamida	30:0,8%	30:0,8%
Tris pH8,8 + SDS 10%	-	1,5M
Tris pH6,8 + SDS 10%	1 M	-
H ₂ O	3,05mL	7,5mL
APS	10 g%	10 g%
Temed	0,005mL	0,010mL

Uma vez aplicadas as amostras e o padrão de peso molecular, o gel foi submetido a uma voltagem de 36V numa solução de corrida contendo Trizma base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1g% a pH 8,3. Após a separação das proteínas presentes na preparação enriquecida de membrana basolateral, o gel foi submetido à técnica de *Western Blot* para a identificação de proteínas (RANGEL *et al.*, 2002).

III.5 Western Blot

Para determinar a presença de proteína cinase G na membrana basolateral foi utilizada a técnica de *Western blot*. Uma amostra de 50 µg de proteína total obtida a partir da fração enriquecida de membrana basolateral de túbulo proximal foi separada pelo gel SDS-PAGE 7,5% (conforme descrito anteriormente) e transferida 1h a 100V para membranas de PVDF (Sequi-Blotim PDVF membrane for protein sequencing, 0,2µm, Bio Rad). O tampão de transferência utilizado era composto de tris 0,3%; metanol 20% (v/v). As membranas foram então mantidas por 1 hora, à temperatura ambiente, numa solução composta por leite desnatado sem gordura 5% e IBS Tween 20 (TBS-T) 0,05%. Depois de serem lavadas três vezes com TBS-T 0,05% gelado, as membranas foram incubadas durante a noite com anticorpo monoclonal de coelho anti-PKG. O anticorpo primário foi diluído de 1:4.000 em TBS-T contendo 5% de leite desnatado sem gordura. Na etapa seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho

conjugado à peroxidase), diluído 1:2.000 por 45 minutos e então lavadas três vezes com TBS-T.

Os *Imunoblottings* foram revelados usando o kit ECL-Plus (GE Healthcare, São Paulo - Brasil), segundo instruções do fabricante, e expostos ao filme (Kodak T-Mat, 8x24 cm, Sigma — Aldrich, Montana, EUA) (RANGEL *et al.*, 2002).

III.6 Medida de produção de GMPc

Para determinar a produção de GMPc na fração enriquecida de membrana basolateral de rim de porco, estimulada por adição de ANP e urodilatina em concentração de 10^{-11} M foi utilizado o método de radioimunensaio. A reação foi iniciada com a adição da suspensão da fração enriquecida de membrana basolateral a 0,1 mL de meio de reação contendo: $MgCl_2$ 10 mM; HEPES-TRIZMA Base 20mM (pH 7,0); NaCl 90 mM; ATP- Na^+ 5 mM (pH 7,0); Azida 10mM. O volume da fração enriquecida de membrana basolateral adicionado foi o necessária para obter uma concentração final de 0,3 mg/mL. Após 10 minutos de incubação a 37°C a reação foi parada pela adição de 0,9 mL de ácido tricloroacético 6% (gelado). O GMPc produzido foi medido com o sistema comercial de imunensaio para GMPc (Amersham, Buckinghamshire, UK), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

III.7 Cultura de células

As células LLC-PK1 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25mL com 5 mL meio de cultura contendo DMEM (GIBCO) com 5% de soro fetal bovino (FBS) em estufa com atmosfera de 10% de CO_2 . Por ocasião dos experimentos o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com solução de PBS (NaCl 137mM; Na_2HPO_4 8,1mM; KH_2PO_4 1,5mM; KCl 2,7mM em pH 7,0), à temperatura ambiente, o PBS era descartado e adicionado 1mL de Tripsina 1%, incubadas por 1 minuto a 37°C com a finalidade de desgrudar as células do fundo da garrafa de cultura e, após este tempo, foi posto 1 mL de meio de cultura para neutralizar a reação da tripsina. Então, através do uso de uma câmara de Neubauer foi feita a contagem da densidade das células em suspensão. Nova cultura era iniciada através da semeadura de um volume que continha 6×10^4 células dessa suspensão em 5 mL de meio de cultura por garrafa de 25mL e, para fazer as experiências, foram utilizadas placas multiwell com 6 poços, onde cada poço foi semeado com o volume que

continha 6×10^5 células dessa suspensão acrescido posteriormente com 2mL de meio de cultura em cada poço. Estas células, inoculadas em poços de placa multiwell, ficaram incubadas por 72h em estufa com atmosfera de 10% de CO_2 a 37°C . Na hora do experimento, as células tiveram os seus meio de cultura trocado para meio DMEM sem FBS, onde os agonistas a serem estudados são adicionados com o volume máximo de 100 μL por poço e o poço controle leva a adição do veículo da substância testada. Após 30 minutos em estufa com atmosfera de 10% de CO_2 à 37°C , as células são lavadas com 5 mL de PBS, raspadas e colocadas em microtubos de 1,6mL. Estes microtubos são centrifugados a $2.500g$ durante 5 minutos em centrífuga Fanem modelo Excelsa Baby II (São Paulo, Brasil) o sobrenadante é descartado e o pellet ressuspensionado com 150 μL de solução de solubilização (EDTA 10mM; Deoxicolato 0,01g%; HEPES-TRIZMA Base 20mM; Sacarose 250mM e H_2O) deixando agir por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, estes preparados de homogenato foram guardados em gelo até a hora de serem utilizados nos experimentos (Figura 14). A dosagem da concentração da proteína na suspensão de homogenato de células foi realizada pelo método de Lowry (1951).

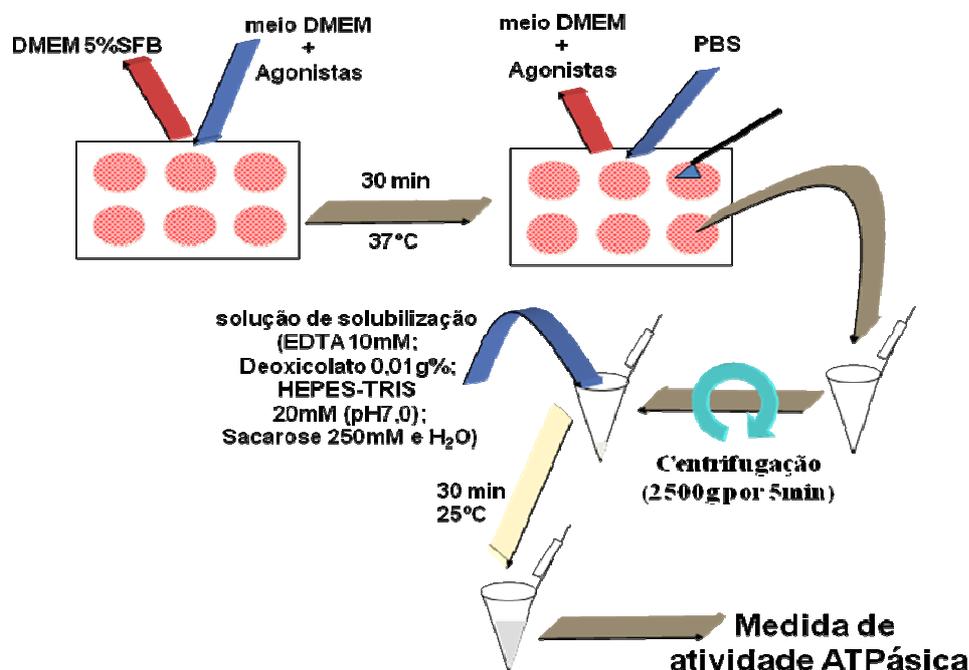


Figura 14: Esquema da preparação de homogenato de células LLC-PK1

III.8 Análise Estatística

As médias dos experimentos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA), considerando os fatores de tratamento reservados aos grupos experimentais. A magnitude das diferenças foi posteriormente verificada através do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (número de experimentos em cada condição testada). Nos ensaios, cada condição experimental foi realizada em triplicatas, sendo computados nos resultados as médias aritméticas assim obtidas. Cada experimento corresponde a uma preparação diferente de MBL de túbulo proximal de rins de porco, advindos de populações distintas de animais, ou de homogenato de cultura de células LLC-PK1, sendo que para cada grupo experimental foram realizados no mínimo 6 ensaios.

IV RESULTADOS

IV.1 Estudo da modulação da atividade da Na⁺-ATPase e da (Na⁺+K⁺)-ATPase por ANP, BNP e urodilatina em membrana basolateral de rim de porco.

Para verificar se a Na⁺-ATPase e (Na⁺+K⁺)-ATPase são alvo da modulação de ANP, BNP e urodilatina no transporte de sódio em túbulo proximal, foi medida a atividade das enzimas com a adição dos peptídeos natriuréticos em concentrações crescentes.

Os dados obtidos, demonstrados na Figura 15, mostram que os três peptídeos, utilizados nas concentrações de 10⁻¹⁶ a 10⁻⁸M, não alteraram a atividade (Na⁺+K⁺)-ATPásica. Por outro lado, como mostrado na Figura 16, tanto o ANP como a urodilatina inibiram a atividade Na⁺-ATPásica de maneira dose-dependente, tendo sido verificado, em ambos os casos, inibições máximas nas concentrações de 10⁻¹¹M. Porém o BNP não é capaz de alterar a atividade desta enzima nas concentrações utilizadas.

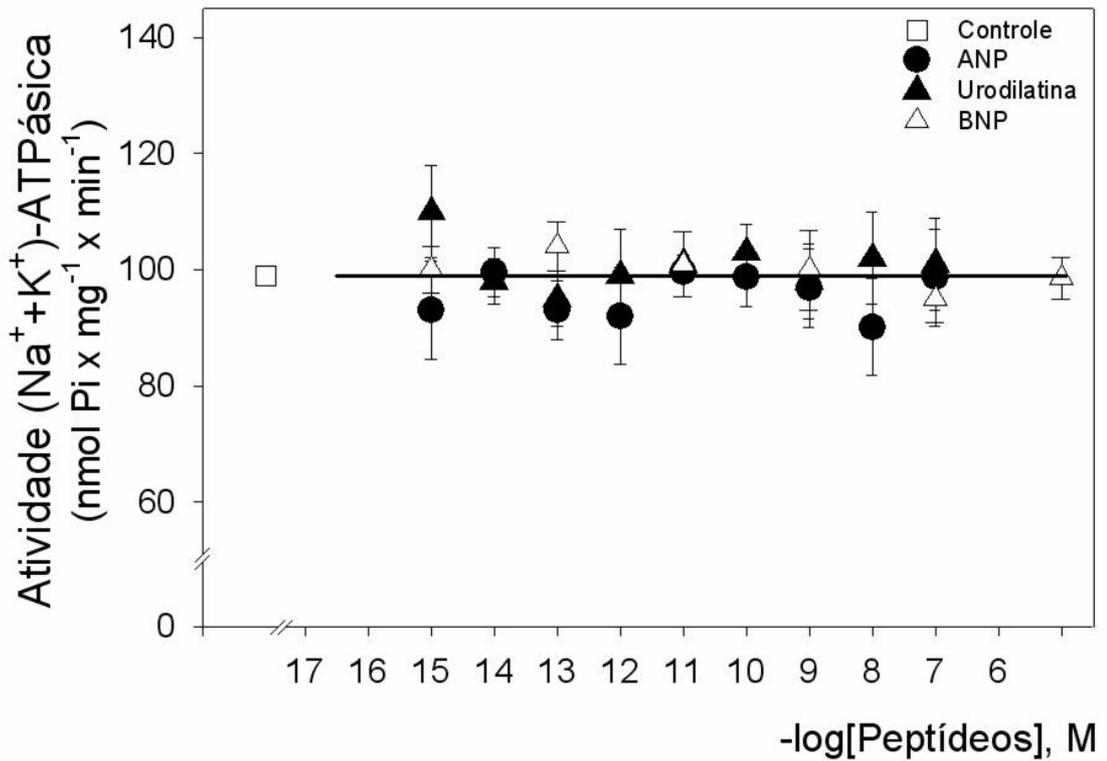


Figura 15: Efeito do ANP, do BNP e da urodilatina na atividade da bomba (Na⁺+K⁺)ATPase. A atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionados ANP (círculos), BNP (triângulos abertos) e urodilatina (triângulos fechados) nas concentrações de 10⁻¹⁶ a 10⁻⁸M. Os resultados são expressos como média ± EP. (n=10)

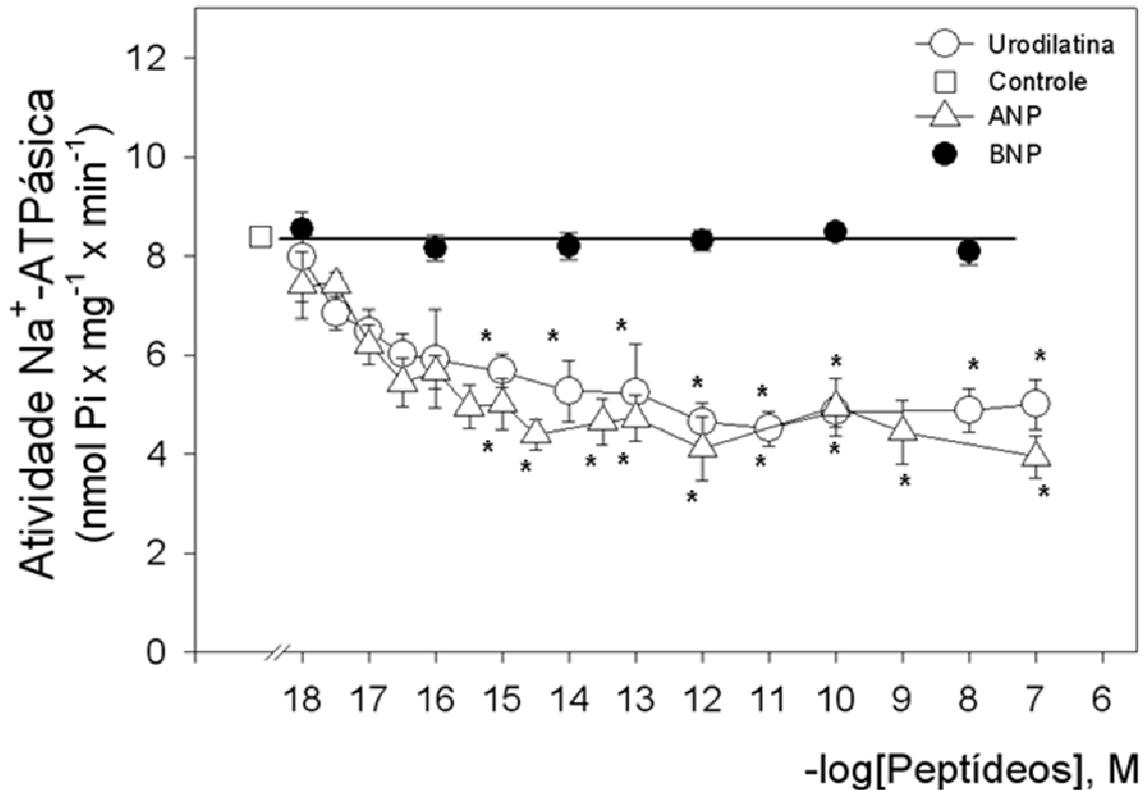


Figura 16: Efeito do ANP, do BNP e da urodilatina na atividade da bomba Na⁺-ATPase.

A atividade Na⁺-ATPásica foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionados ANP (triângulos), BNP (círculos fechados) e urodilatina (círculos abertos) nas concentrações de 10⁻¹⁸ a 10⁻⁷M. Os resultados são expressos como média ± EP. Para ANP e urodilatina, a partir das concentrações de 10⁻¹⁶M os resultados são estatisticamente diferentes do controle com p<0,05 e, após 10⁻¹¹M, com p<0,001. (n=10)

Para avaliar os efeitos destes peptídeos na cinética da Na⁺-ATPase foi analisado o efeito da concentração de Na⁺ sobre a atividade dessa enzima. Para tanto foi comparada a atividade enzimática medida na presença de ouabaína, frente a concentrações crescentes de Na⁺ (0,1 a 120 mM), tanto na ausência como na presença desses peptídeos, usados na concentração de 10⁻¹¹M. Os dados obtidos estão mostrados na Figura 17.

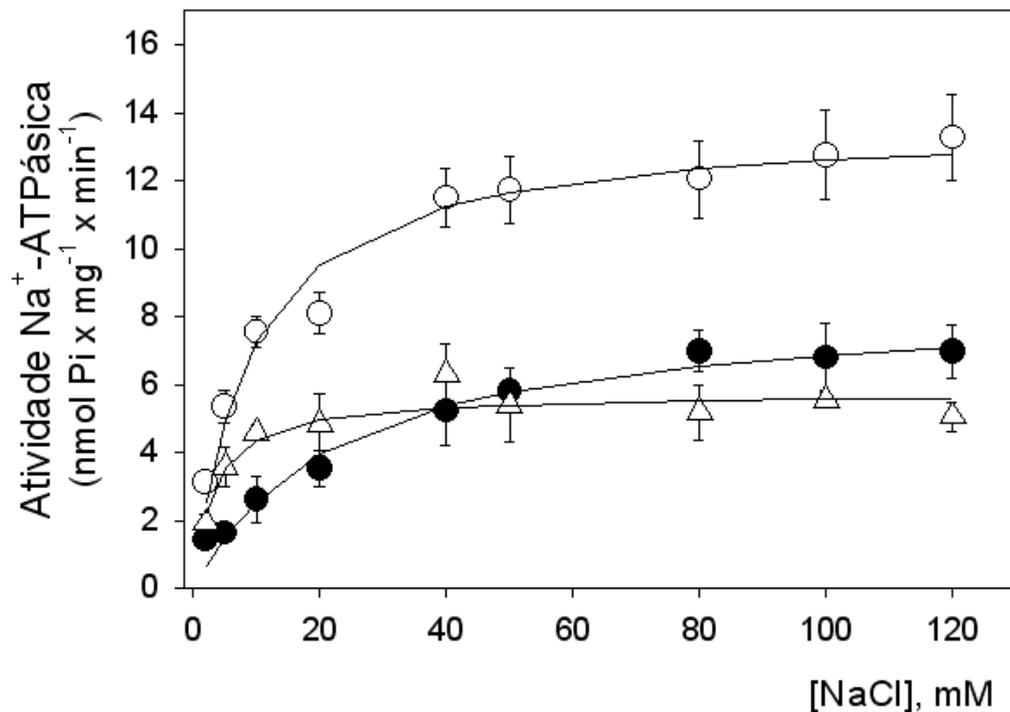


Figura 17: Curva de NaCl, com a adição de ANP 10^{-11} M e urodilatina 10^{-11} M na presença de 1mM de ouabaína, sobre a atividade da Na^+ -ATPase. A atividade da enzima Na^+ -ATPase foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Como indicado, foram adicionados ANP 10^{-11} M (círculo fechado) e urodilatina 10^{-11} M (triângulo aberto). Os resultados estão expressos como média \pm EP. (n=15)

Através da Equação de Michaelis-Menten foi calculada, em condições controle, na ausência dos peptídeos natriuréticos, uma velocidade máxima (V_{\max}) de $13,5 \pm 1,1 \text{ nmol Pi x mg}^{-1} \text{ x min}^{-1}$ e um $K_{0,5}$ de $9,6 \pm 1,5 \text{ mM}$. A urodilatina diminuiu o V_{\max} para $5,7 \pm 0,2 \text{ nmol Pi x mg}^{-1} \text{ x min}^{-1}$ e o $K_{0,5}$ para $3,1 \pm 0,8 \text{ mM}$. Como mostrado na Tabela 5, o ANP diminuiu a V_{\max} para $8,4 \pm 0,4 \text{ nmol Pi x mg}^{-1} \text{ x min}^{-1}$ e aumentou o $K_{0,5}$ para $22,9 \pm 3,9 \text{ mM}$. Podendo assim ressaltar por estes dados que tanto o ANP como a urodilatina diminuem a V_{\max} . Por outro lado o ANP diminui a afinidade da enzima pelo sódio, enquanto a urodilatina aumenta.

Tabela 5: Parâmetros cinéticos da Na⁺-ATPase.

	V_{máx} (nmol Pi x mg ⁻¹ x min ⁻¹)	K_{0,5} (mM)
Controle	13,5 ± 1,1	9,6 ± 1,5
ANP 10⁻¹¹M	8,4 ± 0,4	22,9 ± 3,9
Urodilatina 10⁻¹¹M	5,7 ± 0,2	3,1 ± 0,8

IV.2 Envolvimento da guanilato ciclase/GMPc na inibição da Na⁺-ATPase por ANP e urodilatina.

Com a finalidade de determinar a via de sinalização envolvida com a inibição da Na⁺-ATPase pelos peptídeos natriuréticos, e sabendo, a partir da literatura, que a principal via de ação dos peptídeos natriuréticos é a da guanilato ciclase/GMPc (HUM *et al.*, 2004), verificamos o efeito de db-GMPc em concentrações crescentes (de 1 a 120 nM) sobre a atividade dessa enzima. Como mostra a Figura 18, o GMPc inibe a atividade da Na⁺-ATPase de maneira dose-dependente, apresentando efeito máximo na concentração de 10nM, de modo semelhante ao observado com o uso de ANP e urodilatina.

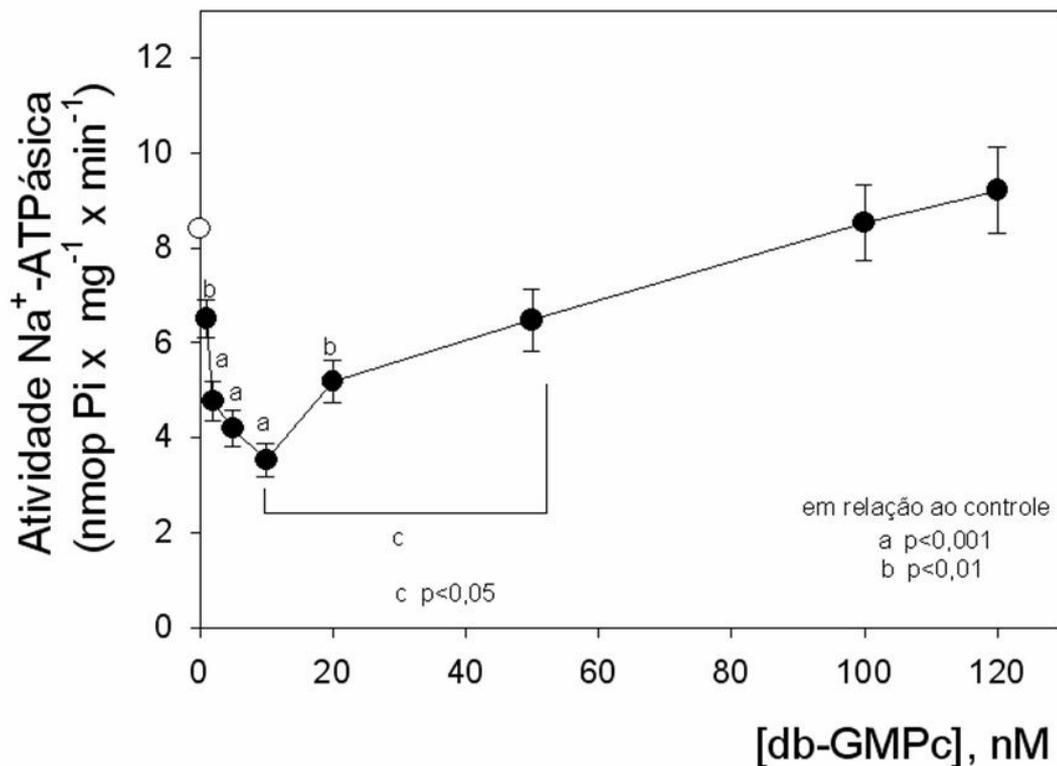


Figura 18: Efeito da adição de db-GMPc em concentrações crescentes (de 1 a 10 nM) sobre a atividade Na⁺-ATPásica. A atividade Na⁺-ATPásica foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionadas concentrações crescentes de db-GMPc, análogo permeável à membrana plasmática, (de 1 a 120 nM). Os resultados estão expressos como média ± EP. a e b - estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) e c - estatisticamente significativo quando comparado 10nM e 50nM ($p < 0,05$). (n=10)

Para confirmar se esses peptídeos inibem a atividade Na⁺-ATPásica através do GMPc, sua produção foi medida através de técnica de radioimunoensaio, em condições controle e na presença de ANP 10^{-11} M e urodilatina 10^{-11} M, sempre utilizando a fração enriquecida de membrana basolateral de córtex de rim de porco, como descrito em materiais e métodos.

Como indicam os dados apresentados na Figura 19, ambos os peptídeos aumentam os níveis deste segundo mensageiro. Por outro lado, como mostram os dados da Figura 20, quando comparadas as atividades Na⁺-ATPásicas medidas na presença simultânea de GMPc 10 nM e ANP 10^{-11} M ou urodilatina 10^{-11} M, não foi observado efeito aditivo. Além disso, através do uso de um inibidor da guanilato ciclase (LY83583 10^{-6} M) foi obtida completa reversão do efeito inibitório do ANP 10^{-11} M e da urodilatina 10^{-11} M sobre a atividade Na⁺-ATPásica (Figura 21).

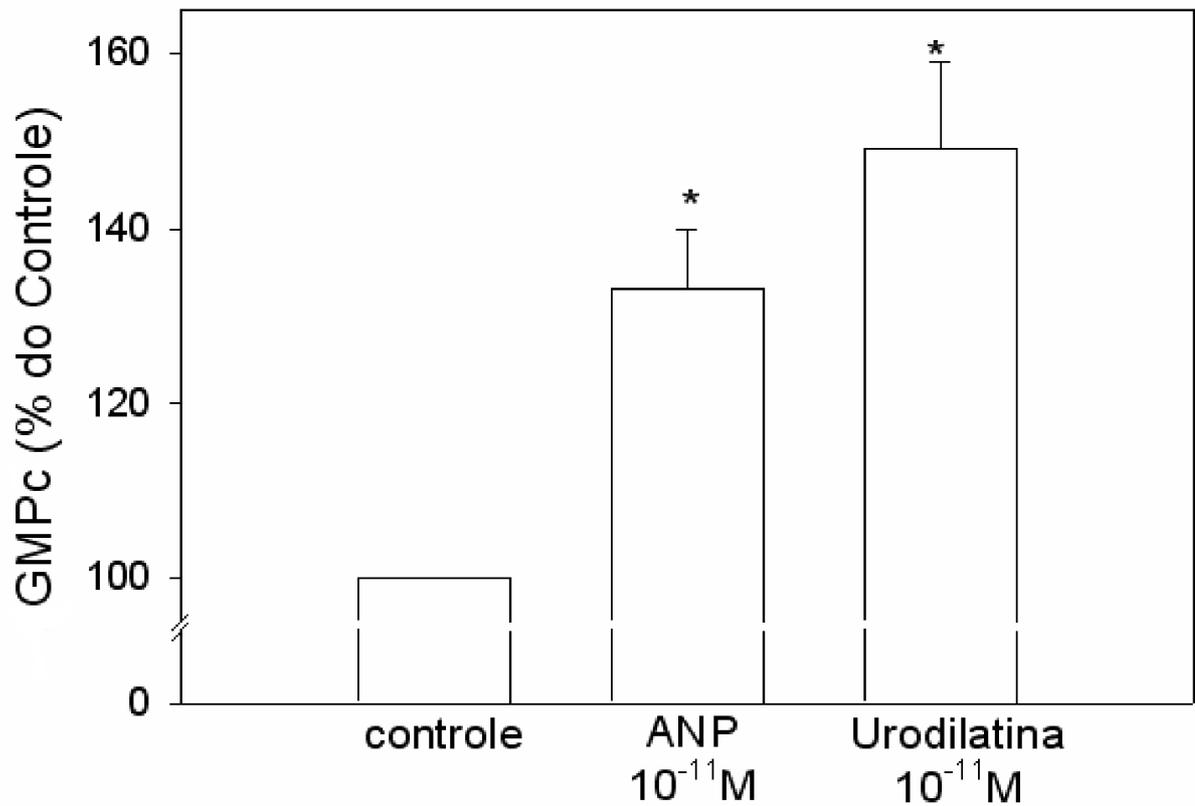


Figura 19: Medida da produção de GMPc estimulada por ANP 10^{-11} M e urodilatina 10^{-11} M em membrana basolateral pela técnica de radioimunoensaio. A produção de GMPc foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionadas concentrações de ANP 10^{-11} M e urodilatina 10^{-11} M em membrana basolateral. Em condições controle o nível de GMPc foi de $6,7 \pm 0,5$ pmol \times mg $^{-1}$. Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($p < 0,01$ e $n = 10$)

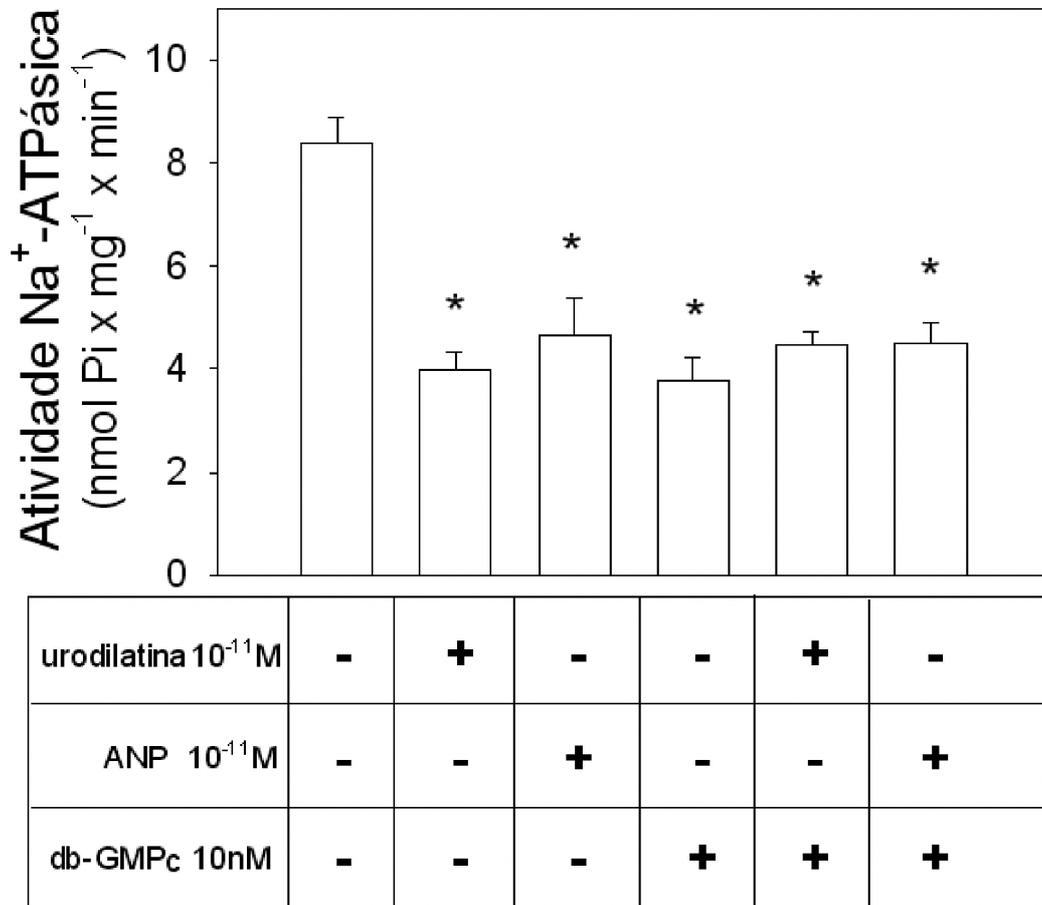


Figura 20: Efeito de db-GMPc 10nM sobre a modulação da atividade Na^+ -ATPásica promovida por ANP 10^{-11} M ou urodilatina 10^{-11} M. A atividade Na^+ -ATPásica foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Como indicado, foram adicionados ANP 10^{-11} M, urodilatina 10^{-11} M e db-GMPc 10nM. Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($p < 0,05$ e $n=10$)

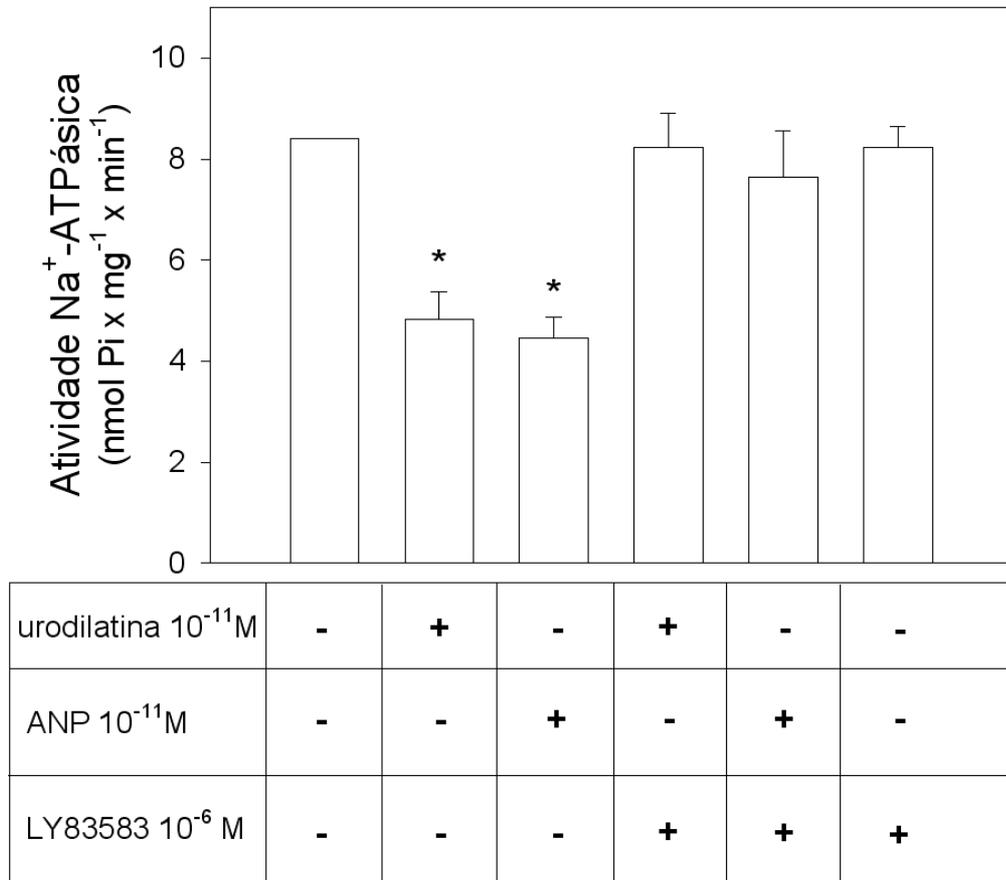


Figura 21: Efeito de LY83583 10^{-6} M sobre a modulação da atividade Na^+ -ATPásica promovida por ANP 10^{-11} M ou urodilatina 10^{-11} M. A atividade Na^+ -ATPásica foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Como indicado, foram adicionados ANP 10^{-11} M, urodilatina 10^{-11} M e LY83583 10^{-6} M, um inibidor de guanilato ciclase. Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($p < 0,05$ e $n = 10$)

IV.3 Identificação do receptor envolvido na inibição da Na⁺-ATPase por ANP e urodilatina.

Os dados até agora apresentados mostram que os efeitos de ANP 10^{-11} M e de urodilatina 10^{-11} M na atividade Na⁺-ATPásica são mimetizados pelo GMPc e revertidos pelo LY83583, um inibidor de guanilato ciclase, indicando o envolvimento de uma via de sinalização GMPc-dependente. Estes dados estão de acordo com os descritos na literatura a respeito da principal via de sinalização da família dos peptídeos natriuréticos (SHI *et al.*, 2003; POTTER, 2005). Entretanto, nos rins, receptores para peptídeos natriuréticos (NPR-A e NPR-C) só haviam sido descritos em células de túbulo proximal de rim de porco (HASHIMOTO *et al.*, 1994; SHI *et al.*, 2003). O NPR-A tem alta afinidade por ANP e urodilatina e possui um domínio guanilato ciclásico, como mostrado na Figura 10 (pág. 23) (NAGASE *et al.*, 1997; SHI *et al.*, 2003; NAKANISHI *et al.*, 2005; POTTER, 2005).

Em nossa preparação, a atividade guanilato-ciclásica encontrada sugere a existência de NPR-A, uma vez que é sabido que este receptor ativa a via guanilato ciclase/GMPc (POTTER, 2005). Para verificar a ocorrência deste receptor nas preparações utilizadas neste trabalho empregamos a técnica de Western Blot com o anticorpo primário contra NPR-A, como descrito em Materiais e Métodos. Os dados obtidos, apresentados na Figura 22, mostram a presença de uma banda de aproximadamente 130 KDa correspondente ao peso molecular do NPR-A nas diferentes preparações de MBL (linhas 1, 2 e 3) e em homogenato de células LLC-PK1 (linhas 5 e 6), sendo estes últimos utilizados como controle positivo por já ter sido observado por Mukoyama e colaboradores em 1991 e por Suga e colaboradores em 1992 (WOODARD *et al.*, 2006). O resultado encontrado é coerente com as observações de Nakanishi e colaboradores em 2005.

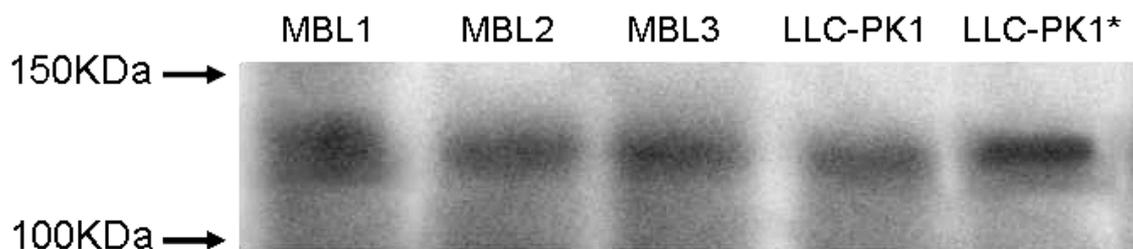


Figura 22: Identificação da presença de NPR-A presente na fração enriquecida de MBL de rim de porco. Foi utilizado anticorpo primário policlonal que reage contra NPR-A de mamíferos. Linhas 1, 2, 3: MBL 40 μ g; linha 4: homogenato de células LLC-PK1 40 μ g; linha 5: homogenato de células LLC-PK1 80 μ g.

IV.4 Envolvimento de proteína cinase G (PKG).

Os resultados até agora apresentados indicam que a inibição da atividade Na^+ -ATPásica promovida por ANP 10^{-11}M e urodilatina 10^{-11}M envolve a ativação de guanilato ciclase e produção de GMPc, possivelmente por ligação ao receptor NPR-A, o que está de acordo com a literatura (BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002; SILVER, 2006). A principal proteína ativada por este mensageiro secundário é uma PKG, descrita como a principal responsável pelos eventos intracelulares iniciados pelos peptídeos natriuréticos (HUM *et al.*, 2004).

Antes de avaliar o envolvimento da PKG foi verificada a existência desta enzima na preparação de membrana basolateral de túbulo proximal de rim de porco através do método de Western Blot usando anticorpo anti-PKG. Como pode ser visto na Figura 23, em três diferentes preparações de membrana basolateral foi verificada a existência de uma banda de aproximadamente 220 KDa, correspondente ao peso molecular da PKG observado em outros tecidos (FEIL *et al.*, 2005; SCHLOSSMANN *et al.*, 2005).

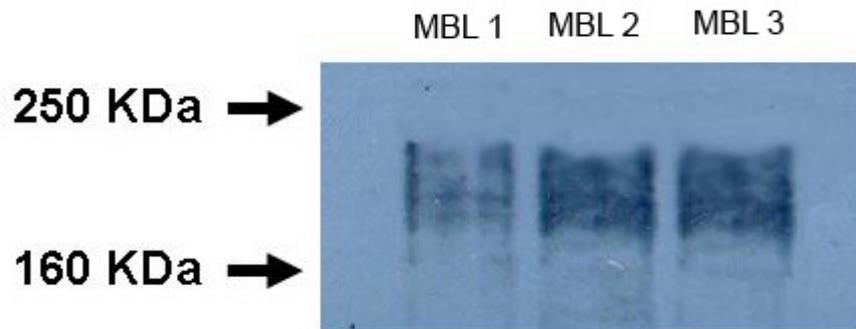


Figura 23: Identificação da presença de PKG presente na fração enriquecida de MBL de rim de porco. Foi utilizado anticorpo primário policlonal que reage contra a maioria das isoformas de PKG de mamíferos.

Após a constatação da presença da PKG, foi verificado se esta PKG era passível de ativação por GMPc, ANP e urodilatina através da medida da atividade da PKG por meio da fosforilação de 45S histona sensível ao KT5823 10^{-6} M, um inibidor específico desta proteína cinase G. Estes dados foram obtidos com a diferença entre os tubos com e sem o KT5823 10^{-6} M. Como pode ser visto na Figura 24, a atividade da enzima aumentou de $0,8 \pm 0,04$ pmol P-histona \times mg^{-1} \times min^{-1} (controle) para $1,49 \pm 0,15$; $1,42 \pm 0,134$ e $1,51 \pm 0,11$ pmol P-histona \times mg^{-1} \times min^{-1} na presença de GMPc, ANP e urodilatina, respectivamente. A adição concomitante de GMPc e ANP ou urodilatina promoveu um aumento da atividade PKG similar e não aditivo ao efeito observado com o uso isolado de cada um dos peptídeos natriuréticos. Por outro lado, LY83583 10^{-10} M bloqueou completamente o aumento da atividade PKG promovido tanto por ANP quanto por urodilatina. Estes dados indicam que o ANP e a urodilatina ativam uma PKG e esta ativação se dá via guanilato ciclase/ GMPc, corroborando as observações realizadas em outros tecidos (BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002).

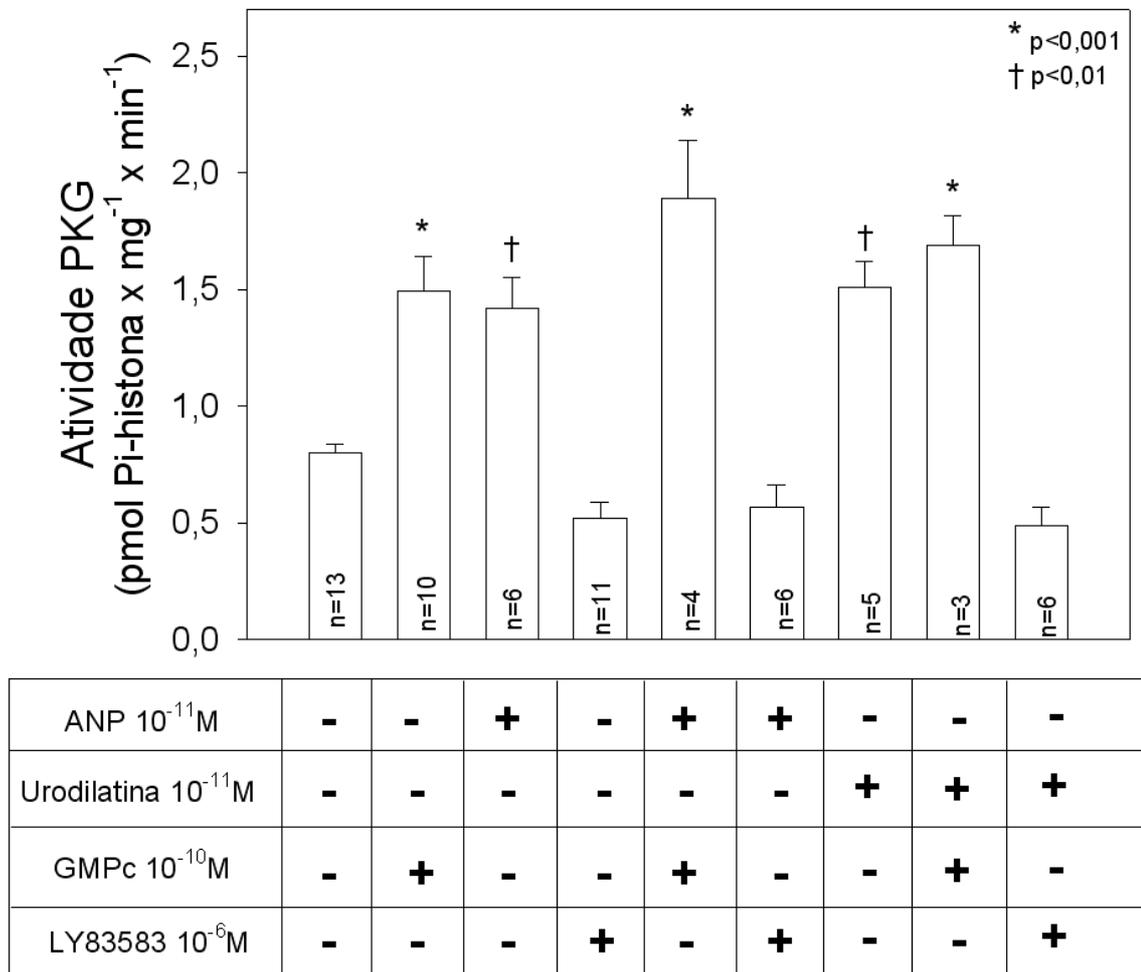


Figura 24: Efeito de LY83583 10⁻⁶M, GMPc 10⁻¹⁰M, ANP 10⁻¹¹M e urodilatina 10⁻¹¹M sobre a atividade da proteína cinase dependente de GMPc (PKG). A atividade da PKG foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionados ANP 10⁻¹¹M, urodilatina 10⁻¹¹M, GMPc 10⁻¹⁰M e LY83583 10⁻⁶M. Os resultados estão expressos como média ± EP. Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (*: p<0,001 †: p<0,01)

Todavia, o fato de ANP 10⁻¹¹M e urodilatina 10⁻¹¹M aumentarem a atividade da PKG não é prova suficiente de que a ativação desta cinase cause a inibição da atividade Na⁺-ATPásica, pois podem ser fenômenos independentes e haver o envolvimento de uma outra via. Para confirmar a hipótese de que, de fato, a modulação da atividade Na⁺-ATPásica seja mediada pela PKG foi medido o efeito de ANP 10⁻¹¹M, urodilatina 10⁻¹¹M ou db-GMPc 10nM na atividade da Na⁺-ATPase na presença de KT5823 10⁻⁶M, um inibidor específico de PKG. Como mostram os dados apresentados na Figura 25, este inibidor da PKG bloqueia completamente o

efeito inibitório de ANP, urodilatina e GMPc. Por outro lado, o KT5823 por si só não altera a atividade da Na⁺-ATPase. Tomados em conjunto estes dados indicam que o efeito inibitório do ANP e da urodilatina pode ocorrer através da ligação ao receptor NPR-A, ativando uma guanilado ciclase, o que elevaria os níveis de GMPc, que, por sua vez, ativaria uma PKG.

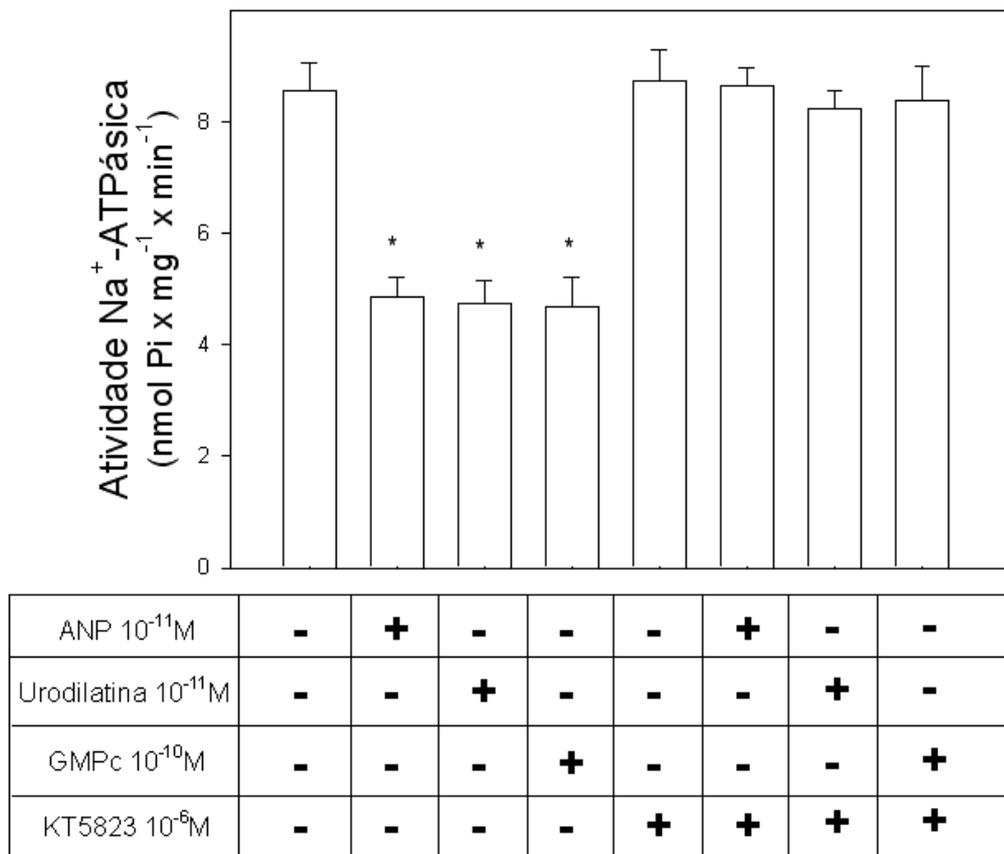


Figura 25: Efeito de KT5823 10⁻⁶M sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica promovida por GMPc 10⁻¹⁰M, ANP 10⁻¹¹M ou urodilatina 10⁻¹¹M. A atividade Na⁺-ATPásica foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionados GMPc 10⁻¹⁰M, ANP 10⁻¹¹M, urodilatina 10⁻¹¹M e KT5823 10⁻⁶M, um inibidor de proteína cinase dependente de GMPc. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (p<0,01 e n=10)

IV.5 Efeito do ANP e urodilatina em células LLC-PK1

Com a finalidade de verificar se na preparação de fração enriquecida de MBL de túbulo proximal de rim de porco ocorre perda de algum mecanismo regulatório, utilizamos cultura de célula LLC-PK1, oriunda do túbulo proximal de rim de porco, um modelo mais próximo das condições *in vivo*. Esta escolha se deve ao fato desta preparação ter sido descrita como ótimo modelo celular para a análise dos efeitos de ANP sobre o transporte de água e solutos, que possivelmente ocorrem através da via de sinalização NPR-A/GMPc/PKG (KISHIMOTO *et al.*, 1991; SUGA *et al.*, 1992b). Por outro lado, ainda não havia sido estudado se estes processos de modulação de transporte de solutos envolve a Na⁺-ATPase e a (Na⁺+K⁺)ATPase.

Primeiramente comparamos os efeitos dos peptídeos natriuréticos sobre a atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica e Na⁺-ATPásica em membrana basolateral isolada de rim de porco e em células LLC-PK1. Como descrito nos Materiais e Métodos, a atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica foi determinada em células pré-incubadas com doses crescentes de ANP e urodilatina (10⁻¹⁶ a 10⁻⁸M). Como pode ser visto na Figura 26, nessa preparação nenhum dos peptídeos modificaram essa atividade enzimática. Por outro lado, nessa mesma preparação, foi verificado que esses peptídeos inibem, de forma dose-dependente, a atividade da Na⁺-ATPase, como mostram os dados apresentados na Figura 27. As inibições máximas foram obtidas com o uso da concentração de 10⁻¹⁰M para ambos os peptídeos. A atividade enzimática medida em condições controle foi de 12,2 ± 1,2 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹, tendo diminuído para 4,57 ± 0,5 e 5,9 ± 0,6 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹, com ANP e urodilatina, respectivamente. Estes dados indicam que os dois peptídeos estudados atuam de maneira semelhante nas células LLC-PK1, inibindo seletivamente a atividade Na⁺-ATPásica quando adicionados pela membrana luminal nas nossas condições experimentais.

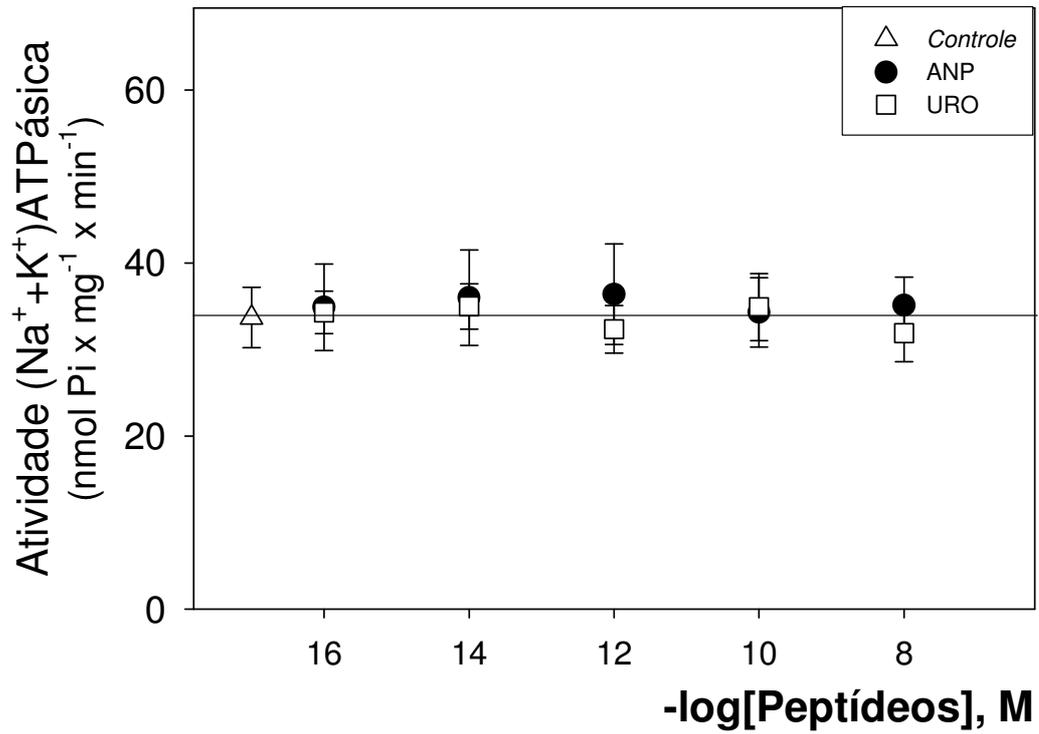


Figura 26: Efeito do ANP e urodilatina na atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase em homogenato de células LLC-PK1. A atividade (Na⁺+K⁺)ATPase foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionados ANP (círculos) e urodilatina (quadrados) nas concentrações de 10⁻¹⁶ a 10⁻⁸M. Os resultados estão expressos como média ± EP (n=15).

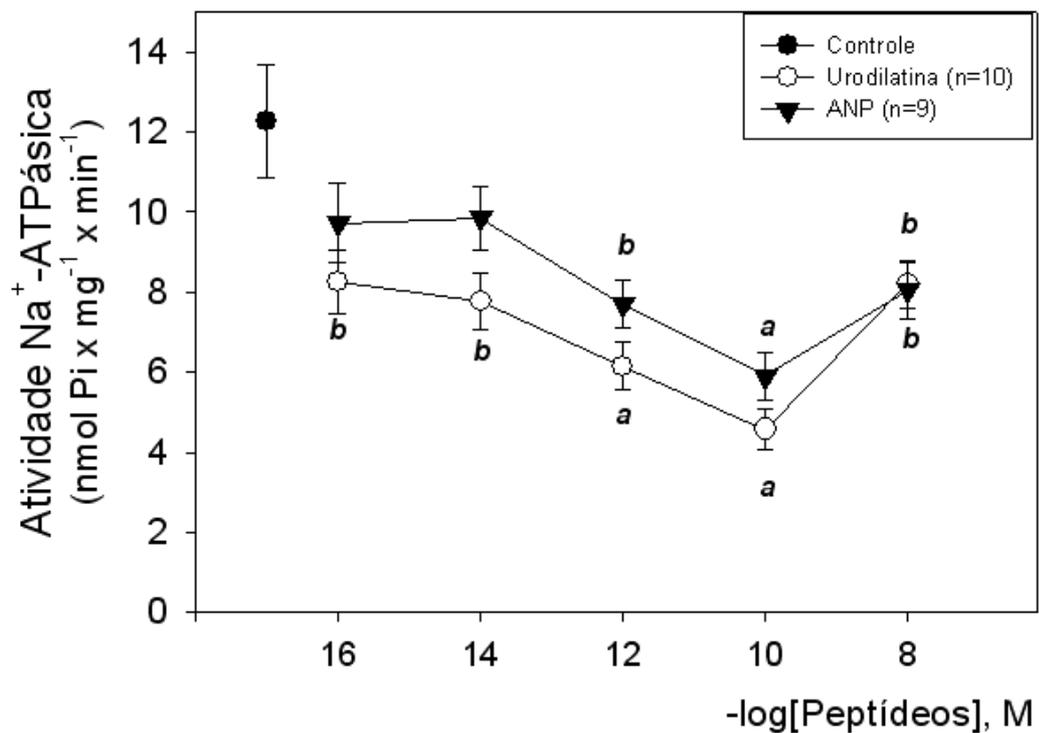


Figura 27: Efeito do ANP e urodilatina na atividade da Na⁺-ATPase em homogenato de células LLC-PK1. A atividade Na⁺-ATPásica foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionados ANP (triângulos) e urodilatina (círculos abertos) nas concentrações de 10⁻¹⁶ a 10⁻⁸M. Os resultados estão expressos como média ± EP. a: estatisticamente diferente do controle (p<0,01); b: estatisticamente diferente do controle (p<0,05).

IV.6 Efeito do GMPc em células LLC-PK1

Após ter constatado o efeito inibitório do ANP e da urodilatina sobre a atividade da Na⁺-ATPase em células LLC-PK1, verificamos se o GMPc, clássico segundo mensageiro destes peptídeos, estaria envolvido neste efeito.

Os resultados apresentados na Figura 28 mostram um efeito bifásico, com inibição até a concentração de 10⁻¹⁰M (de 12,2 ± 1,4 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹ no controle para 4,2 ± 0,8 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹ com o db-GMPc). Frente a concentrações maiores ocorreu reversão completa da inibição, atingindo valores semelhantes ao controle na concentração de 10⁻⁷M (13,5 ± 1,7 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹).

Para confirmar o envolvimento do GMPc na via de sinalização do ANP e da urodilatina em células LLC-PK1, utilizamos o LY 83583, um inibidor de guanilato ciclase. Os efeitos inibitórios dos peptídeos foram completamente revertidos com a

utilização do LY 83583 (10^{-7} a 10^{-5} M), sendo que o inibidor sozinho não exerceu nenhum efeito sobre a Na^+ -ATPase, como está mostrado na Figura 29.

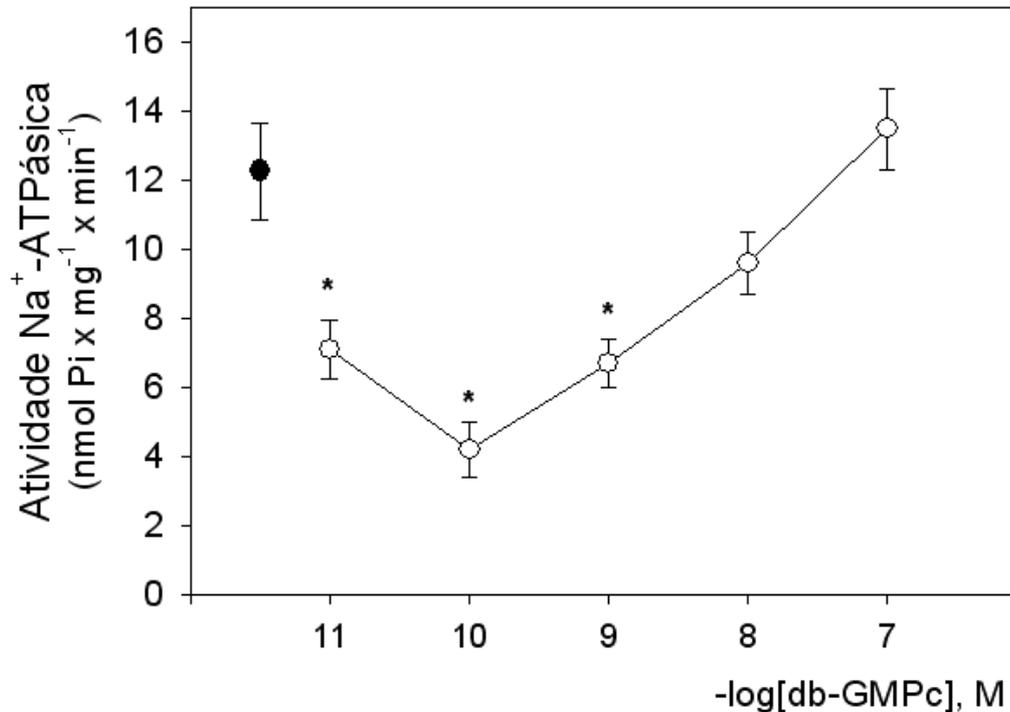


Figura 28: Efeito da adição de db-GMPc em concentrações crescentes (de 10^{-11} a 10^{-7} M) sobre a atividade Na^+ -ATPásica em homogenato de células LLC-PK1. A atividade Na^+ -ATPásica foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionadas concentrações crescentes de db-GMPc, análogo permeável à membrana plasmática, (de 1 a 10 nM). Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($p < 0,05$ e $n = 10$)

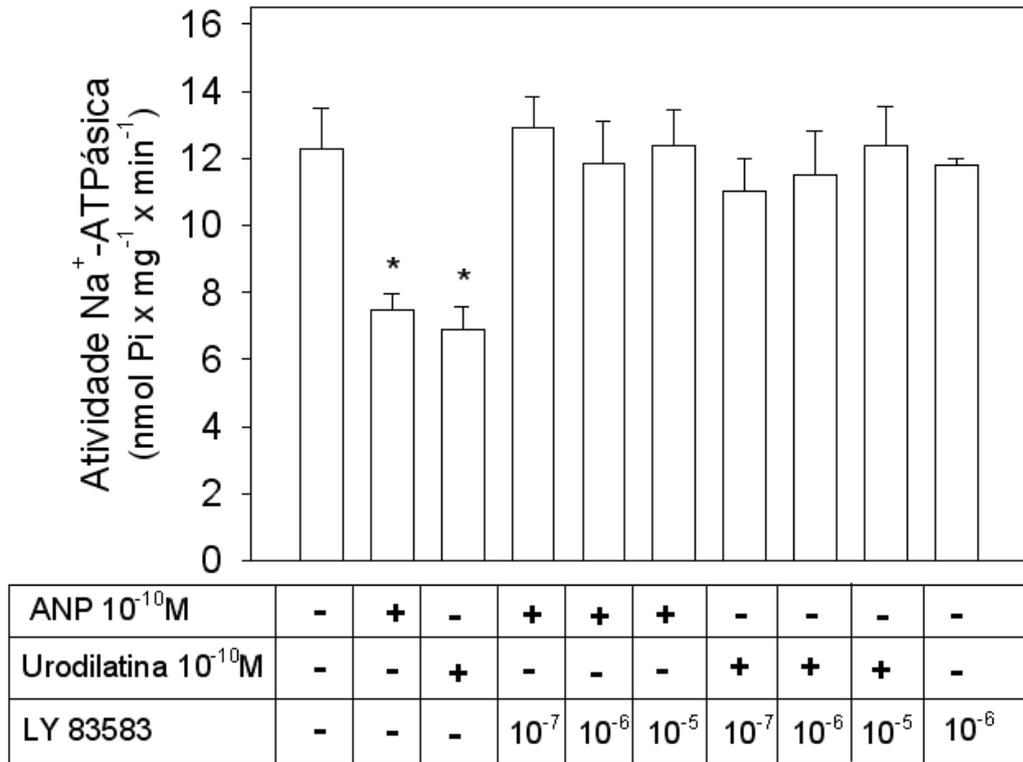


Figura 29: Efeito de LY83583 sobre a modulação da atividade Na^+ -ATPásica promovida por ANP 10^{-11} M ou urodilatina 10^{-11} M em homogenato de células LLC-PK1. A atividade Na^+ -ATPásica foi medida segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Conforme indicado, foram adicionados ANP 10^{-11} M, urodilatina 10^{-11} M e LY83583 nas concentrações de 10^{-7} a 10^{-5} M, um inibidor de guanilato ciclase. Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($p < 0,05$ e $n = 10$)

V DISCUSSÃO

Os peptídeos natriuréticos apresentam dois tipos de efeitos. Um deles está relacionado com uma ação contra-regulatória sobre o Sistema-Renina-Angiotensina-Aldosterona. O outro efeito decorre de sua ação direta sobre a regulação do balanço hidro-eletrolítico e da pressão arterial (HARRIS *et al.*, 1987). O ANP e a urodilatina apresentam efeitos natriuréticos e diuréticos, enquanto que os demais peptídeos dessa família molecular, tais como o CNP e BNP, agem predominantemente no sistema circulatório, atuando como vasodilatadores e promovendo processos de remodelamento cardíaco (DE ARRIBA *et al.*, 1988; SHOWALTER *et al.*, 1988; YOSHIZUMI *et al.*, 1998; OLIVEIRA-SOUZA & DE MELLO-AIRES, 2000; AIRHART *et al.*, 2003; GERMANO *et al.*, 2005; SANTOS-NETO *et al.*, 2006).

O ANP atua sobre a função renal, apesar de sua produção não ocorrer nesse órgão. No caso da urodilatina, todavia, já foi descrita sua produção nas células do aparelho justaglomerular. Tanto o ANP quanto a urodilatina aumentam a taxa de filtração glomerular, reduzem a secreção de renina na mácula densa, inibem a reabsorção renal de água e sódio, sendo sabido que nos ductos coletores reduz a absorção de sódio pela inibição de um canal de cátion sensível ao amiloride (LIGHT *et al.*, 1990; ZEIDEL, 1990; BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002; SILVER, 2006). Estes efeitos resultam da ligação dos peptídeos natriuréticos com o seu receptor NPR-A (ELLMERS *et al.*, 2002, BELTOWSKI & WOJCICKA, 2002).

Em nosso laboratório foi verificado que tanto hormônios que possuem ações anti-natriuréticas, como adenosina e angiotensina II (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997; RANGEL *et al.*, 1999), quanto os que possuem ações natriuréticas, como bradicinina e angiotensina (1-7) (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999b; 2003a; 2003b), modulam a atividade da Na⁺-ATPase presente na membrana basolateral das células do túbulo proximal. Nosso laboratório postula que a Na⁺-ATPase é uma enzima importante no processo de regulação da reabsorção renal de água e NaCl e manutenção do volume extracelular, sendo importante alvo desses peptídeos (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; 2000a; 2000b; 2001; 2003a; 2003b; RANGEL *et al.*, 1999; 2001; 2002; LARA *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2004, LOPES *et al.*, 2004).

A partir dos dados obtidos anteriormente em nosso laboratório, o presente trabalho teve como objetivo verificar se os peptídeos natriuréticos ANP, BNP e urodilatina possuem efeitos modulatórios sobre a atividade Na^+ -ATPásica e (Na^++K^+) ATPásica em membrana basolateral de fração isolada de túbulo proximal de rim de porco, e em células de túbulo proximal de rim de porco (LLC-PK1), e tentar determinar as vias de sinalização envolvidas nesse processo.

Em um primeiro momento averiguamos se os peptídeos natriuréticos modulam a atividade Na^+ -ATPásica e (Na^++K^+) ATPásica em membrana basolateral de fração isolada de túbulo proximal de rim de porco. Observamos que somente ANP e urodilatina modulam a atividade da Na^+ -ATPase, inibindo-a de maneira dose-dependente, enquanto que o BNP não apresentou esse efeito (Figura 16, pág. 40). Por outro lado, os três peptídeos não possuíam nenhum efeito regulatório sobre a (Na^++K^+) ATPase (Figura 15 e Figura 39). O fato da (Na^++K^+) ATPase não ser modulada por estes peptídeos pode ser explicado pela necessidade que tem essa enzima da integridade do citoesqueleto para que ocorra seu efeito modulador, fato que não ocorre em nossa preparação de fração isolada de membrana basolateral ou a sua modulação ser de maneira lenta com a necessidade de transporte de proteínas para a membrana e até mesmo síntese proteica (FÉRAILLE & DOUCET, 2001; ARYSTARKHOVA *et al.*, 2002). Já a Na^+ -ATPase, acredita-se que ela e a maioria de seus constituintes modulatórios estejam em cavéolas, pois a sua modulação não se perde com o processo de obtenção de fração isolada de membrana basolateral.

Com o intuito de estudar como estes peptídeos agiriam sobre a atividade da Na^+ -ATPase, foram analisados os parâmetros cinéticos desta enzima na presença de ANP e urodilatina. Foi constatado que o ANP diminui a afinidade da enzima por NaCl e diminui a atividade (ou velocidade) máxima. Já a urodilatina, apesar de aumentar levemente a afinidade da enzima pelo substrato, diminui a atividade (ou velocidade) máxima. Apesar de ambos os peptídeos diminuírem a atividade da enzima, o fato de ambos alterarem a velocidade máxima e somente o ANP diminuir a afinidade pelo substrato sugere que atuem através de mecanismos diferentes (Tabela 5 e Figura 17, pág. 42 e 41 respectivamente).

Os dados da literatura mostram que o principal receptor responsável pelos efeitos do ANP e da urodilatina nos diversos tecidos é o NPR-A (POTTER, 2005). Análises de hibridação *in situ* de tecidos de macacos resus, indicam que o RNAm do

NPR-A é predominantemente detectado no rim, zona glomerulosa e medula adrenal, glândula pituitária, cerebelo e células endoteliais endocárdicas (WILCOX *et al.*, 1991). Análise de *Western Blot* mostrou uma quantidade significativa da proteína NPR-A em pulmão, rim, adrenal, testículos e tecido de fígado de roedores (Tabela 4, pág. 25) (GOY *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2004). Neste trabalho verificamos a existência deste receptor na fração enriquecida de membrana basolateral (MBL) de túbulo proximal de rim de porco através da técnica de Western-blot, usando anticorpo contra NPR-A (Figura 22, pág. 48). Este resultado está de acordo com a existência de NPR-A em cultura de células de túbulo proximal de rim de porco (LLC-PK1) observada anteriormente (MUKOYAMA *et al.*, 1991; SUGA *et al.*, 1992b; HASHIMOTO *et al.*, 1994). Além disso, também foi verificada a presença do receptor NPR-A em homogenato de córtex de rim de rato Wistar (HASHIMOTO *et al.*, 1994).

Como a estrutura do NPR-A possui uma sub-unidade guanilato ciclásica (GC), a principal via de sinalização descrita para estes peptídeos envolve formação de GMPc. A hipótese do efeito destes peptídeos em nosso sistema de MBL ser via GMPc é viável devido ao fato que a MBL de células epiteliais renais expressarem enzimas que catalizam a transferência de fosfato entre os nucleotídeos de guanina exógenos para funcionamento de enzimas que hidrolizam GTP, tais como guanilato ciclases e proteínas G. Assim sendo, o GTP é regenerado continuamente através do GDP e GMP oriundo da sua catálise e do ATP do meio de reação (OTERO, 1990; COLEMAN & SPRANG, 1996). Como nos experimentos que realizamos não foram adicionados nucleotídeos de guanina, tudo indica que as proteínas G contidas no sistema são capazes de manter seus nucleotídeos de guanina fortemente ligados durante o processo de obtenção do homogenato purificado do córtex renal e da fração enriquecida de MBL (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999b; 2003a; 2003b).

O envolvimento do GMPc no processo de inibição da Na⁺-ATPase pelo ANP e pela urodilatina foi confirmado através dos experimentos que evidenciaram que: (1) GMPc mimetiza o efeito inibitório do ANP e da urodilatina (Figura 18, pág. 43); (2) ANP e urodilatina aumentam os níveis de GMPc nesta preparação (Figura 19, pág. 44); (3) Os efeitos inibitórios do GMPc sobre a atividade da Na⁺-ATPase não é aditivo aos efeitos inibitórios de ANP ou urodilatina (Figura 20, pág. 45); e (4) LY-83583 (inibidor de GC), abole completamente as inibições provocadas pelo ANP e pela urodilatina sobre a Na⁺-ATPase (Figura 21, pág. 46). Estas observações são condizentes com os dados da literatura, ressaltando a importância do GMPc nos

efeitos dos peptídeos natriuréticos (LOHMANN *et al.*, 1997; FEIL *et al.*, 2005; SCHLOSSMANN *et al.*, 2005).

Ao analisarmos as possíveis vias que estariam sendo ativadas pelo GMPc observamos que preferencialmente, no caso dos peptídeos natriuréticos, ocorre uma ativação de uma proteína cinase dependente de GMPc (PKG), tendo sido esta proteína detectada em nossa preparação por Western-blot (Figura 23, pág 49). Isto corrobora com os dados de Suga (1992) que detectou a presença desta proteína em LLC-PK1 (KISHIMOTO *et al.*, 1991; SUGA *et al.*, 1992). O envolvimento desta PKG no processo inibitório da Na⁺-ATPase pelo ANP e pela urodilatina foi assegurado após verificarmos que: 1) estes peptídeos e o GMPc aumentam a atividade PKG (Figura 24, pág. 50) e, 2) que o efeito destes três agentes sobre a atividade da Na⁺-ATPase foi completamente abolido pelo KT5823, inibidor específico de PKG (Figura 25, pág. 51).

Com a finalidade de verificar se na preparação de fração enriquecida de MBL de túbulo proximal de rim de porco ocorre perda de algum mecanismo regulatório, utilizamos cultura de célula LLC-PK1, oriunda do túbulo proximal de rim de porco, um modelo mais próximo das condições *in vivo*. Esta escolha se deve ao fato desta preparação ter sido descrita como ótimo modelo celular para a análise dos efeitos de ANP sobre o transporte de água e solutos, que possivelmente ocorrem através da via de sinalização NPR-A/GMPc/PKG (KISHIMOTO *et al.*, 1991; SUGA *et al.*, 1992). Por outro lado, ainda não havia sido estudado se estes processos de modulação de transporte de solutos envolve a Na⁺-ATPase e a (Na⁺+K⁺)ATPase.

Nos experimentos realizados observamos que ANP e urodilatina adicionados à membrana luminal inibem a atividade Na⁺-ATPásica e não modificam a atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica, semelhante ao observado em MBL isolada. A falta de modulação da (Na⁺+K⁺)ATPase pode ser decorrente do tempo, já que a principal modulação descrita envolve processos de síntese protéica ou transporte de proteínas para a membrana que não poderia ocorrer, visto que em nossa preparação o citoesqueleto não se encontra íntegro (FÉRAILLE & DOUCET, 2001; ARYSTARKHOVA *et al.*, 2002).

Para verificar a participação do GMPc na modulação da atividade da Na⁺-ATPase pelos peptídeos natriuréticos, foi utilizado db-GMPc e LY-83583, inibidor da guanilato ciclase. Os dados obtidos em células LLC-PK1 foram semelhantes aos verificados na fração enriquecida MBL de túbulo proximal de rim de porco (Figuras

27 e 28, páginas 55 e 56 respectivamente). Estes dados sugerem que, possivelmente, os efeitos sobre o transporte de solutos observados por Suga em 1992 seja devido, em parte, da modulação da atividade da Na⁺-ATPase (KISHIMOTO *et al.*, 1991; SUGA *et al.*, 1992).

VI CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que, em nossos modelos experimentais, o ANP e a urodilatina inibem a Na⁺-ATPase seletivamente via ativação de receptor NPR-A, deflagrando produção de GMPc que, por sua vez, ativa uma PKG, sendo que esta irá inibir direta ou indiretamente a Na⁺-ATPase. A confirmação através dos experimentos de Western-blot da presença de NPR-A sugere que o ANP produza seu efeito via este receptor, o que está de acordo com os dados de Suga (KISHIMOTO *et al.*, 1991; SUGA *et al.*, 1992). Sendo estas conclusões ilustradas nas figuras 29 e 30.

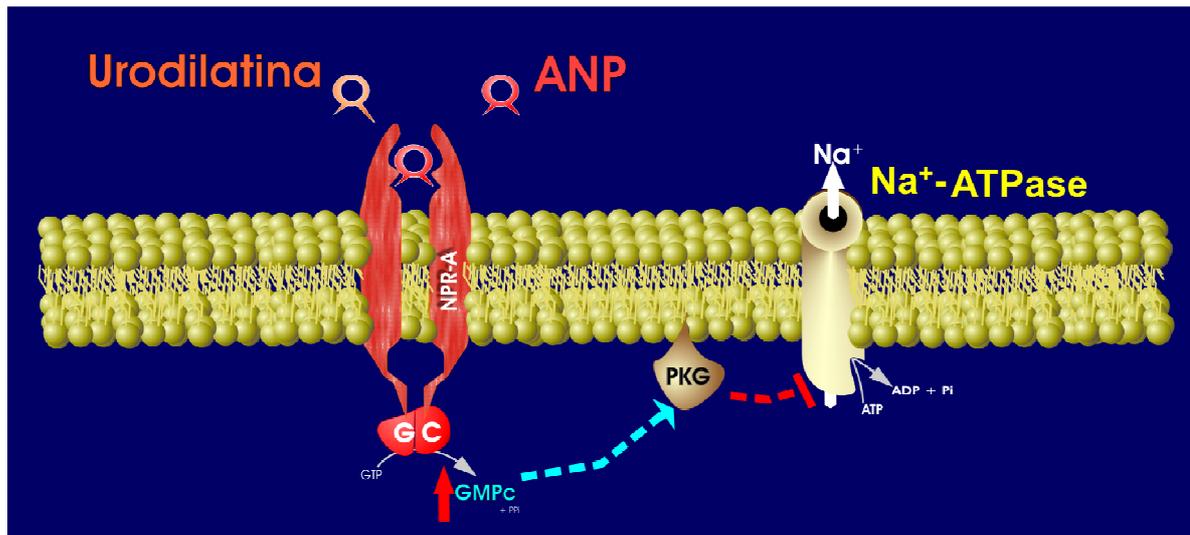


Figura 30: Esquema da conclusão final dos achados em MBL. Esquema de MBL onde postulamos que o ANP e urodilatina se ligam ao receptor de NPR-A, ativa a subunidade guanilato ciclásica, aumentam os níveis de GMPC que irá ativar uma PKG, que por sua vez irá inibir direta ou indiretamente a atividade Na⁺-ATPásica.

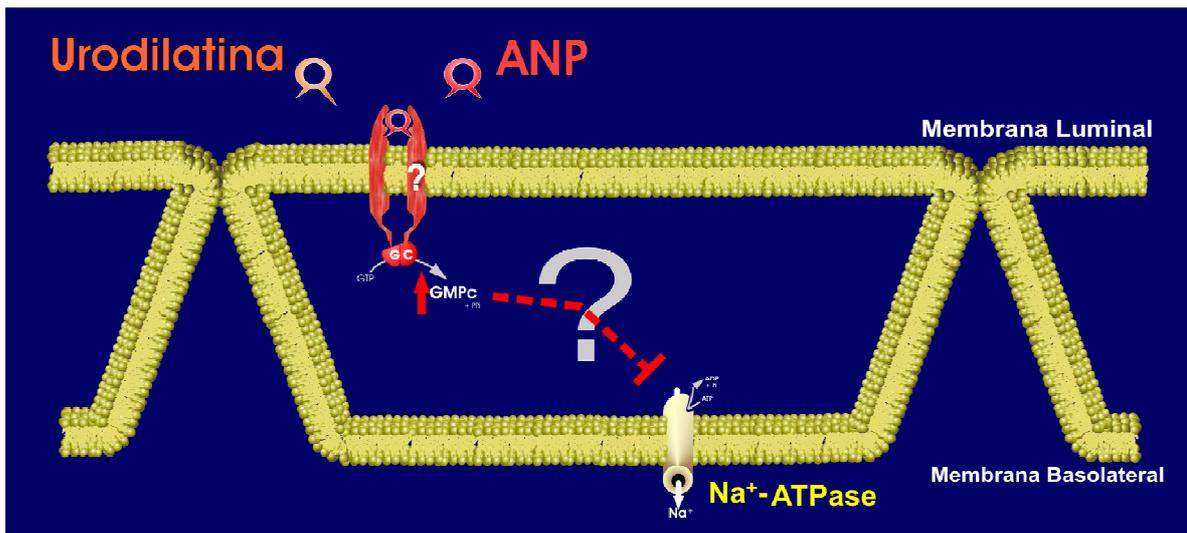


Figura 31: Esquema da conclusão final dos achados em LLC-PK1. Esquema de membrana de célula LLC-PK1 onde postulamos que o ANP e urodilatina se ligam ao receptor de NPR-A, ativa a subunidade guanilato ciclásica, aumenta os níveis de GMPc, que por sua vez irá inibir direta ou indiretamente a atividade Na⁺-ATPásica.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABASSI, Z.A. *et al.* Control of Extracellular Fluid Volume and the Pathophysiology of Edema Formation. In: The Kidney. F.C.R. Barry M. Brenner (Ed.). Benner & Rector's 7th edition: v. 1, 2004.

AIRHART, N. *et al.* Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction. The Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 40, p. 38693-3868, 2003.

ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. Peptides, v. 26, n. 6, p. 1044-1059, 2005.

ARYSTARKHOVA, E.; WETZEL, R.K.; SWEADNER, K.J. Distribution and oligomeric association of splice forms of Na(+)-K(+)-ATPase regulatory gamma-subunit in rat kidney. American Journal of Physiology (Renal Physiology), v. 282, n. 3, p. F393-F407, 2002.

ASHMAN, D.F. *et al.* Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. Biochemical and Biophysical Research Communication, v. 11, p. 330-334, 1963.

BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiological Reviews, v. 75, n. 4, p. 725-748, 1995.

BELTOWSKI, J.; WOJCICKA, G. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. Medical and Science Monitoring, v. 8, n. 2, p. RA39-RA52, 2002.

BENITO, B.; QUINTERO, F.J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1328, n. 2, p. 214-226, 1997.

BORGATTI, A.R. *et al.* Ouabain-insensitive Na⁺ stimulation of a microsomal Mg²⁺ - ATPase in gills of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Comparative Biochemistry and Physiology A, v. 81, n. 1, p. 127-135, 1985.

BOUMENDIL-PODEVIN, E.F.; PODEVIN, R.A. Isolation of basolateral and brush-border membranes from the rabbit kidney cortex. Vesicle integrity and membrane sidedness of the basolateral fraction. Biochimica et Biophysica Acta, v. 735, n. 1, p. 86-94. 1983.

CANDIDO, R. *et al.* Vasoactive Peptides and the Kidney. In: The Kidney. F.C.R. Barry M. Brenner (Ed.). Benner & Rector's 7th edition: v. 1, 2004.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membranes of the proximal tubule. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1329, p. 336-344, 1997.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 54c, p. 100-104, 1999a.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1431, p. 483-491, 1999b.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Angiotensin (1-7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1467, p. 189-197, 2000a.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity is an effector protein for cAMP in basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1468, p. 107-114, 2000b.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Regulation of the renal tubule second sodium pump by angiotensins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, n. 8, p. 1079-1084 rev., 2001.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Modulation of the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in the renal proximal tubule by Mg²⁺, MgATP and furosemide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 34, n. 12, p. 1586-1593, 2002.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Bradykinin B₁ receptor stimulates the proximal tubule Na⁺-ATPase activity through protein kinase C pathway. *Regulatory Peptides*, v. 115, p. 195-201, 2003a.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Bradykinin counteracts the stimulatory effect of angiotensin-(1-7) on the proximal tubule Na⁺-ATPase activity through B₂ receptor. *Regulatory Peptides*, v. 110, p. 207-212, 2003b.

CARUSO-NEVES, C. *et al.* Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase of proximal tubule is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1660, p. 93-98, 2004.

CHAN, J.C. *et al.* Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 102, n. 3, p. 785-790, 2005.

CODY, R.J. *et al.* Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *Journal of Clinical Investigation*, v. 78, n. 5, p. 1362-1374, 1986.

COLEMAN, D.E.; SPRANG, S.R. How G proteins work: a continuing story. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 21, n. 2, p. 41-44, 1996.

DE ARRIBA, G. *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II-induced contraction of isolated glomeruli and cultured glomerular mesangial cells of rats: the role of calcium. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, v. 111, n. 4, p. 466-474, 1988.

DE BOLD, A.J.; DE BOLD, M.L.; SARDA, I.R. Functional-morphological studies on *in vitro* cardionatin release. *Journal of Hypertension Supplement*, v. 4, n. 2, p. S3-S7, 1986.

DE SOUZA, A.M. *et al.* Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na⁺-ATPase activity through AT₂ receptor. *Regulatory Peptides*, v. 120, n. 1-3, p. 167-175, 2004.

DE SOUZA, A. M. *et al.* Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in MDCK I cells. *Biochimie*, v. 89, n. 11, p. 1425-1432, 2007.

DEL CASTILLO, J.R. *et al.* Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 692, n. 1, p. 61-68, 1982.

DEMPSKI, R.E.; FRIEDRICH, T.; BAMBERG, E. The beta subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase follows the conformational state of the holoenzyme. *Journal of General Physiology*, v. 125, n. 5, p. 505-520. 2005.

DWORKIN, L.D.; BRENNER, B.M. The Renal Circulations. In: *The Kidney*. F.C.R. Barry M. Brenner (Ed.). Benner & Rector's 7th edition: v. 1, 2004.

EDWARDS, B.S. *et al.* Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circulation Research*, v. 62, n. 2, p. 191-195, 1988.

ELLMERS, L.J. *et al.* Ventricular expression of natriuretic peptides in Npr1(-/-) mice with cardiac hypertrophy and fibrosis. *American Journal of Physiology (Heart Circulation Physiology)*, v. 283, n. 2, p. H707-H714, 2002.

FEIL, S. *et al.* Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience*, v. 135, n. 3, p. 863-868, 2005.

FÉRAILLE, E. & DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 1, p. 345-418. 2001.

FÉRAILLE, E. *et al.* Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 986, p. 570-578, 2003.

FORD, P. *et al.* Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2. *Biology of the Cell*, v. 97, n. 9, p. 687-697, 2005.

GARCIA, R. *et al.* Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. II. Effect of chronic administration of alpha- and beta-adrenergic and cholinergic agonists on plasma and atrial ANF in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 136, n. 2, p. 510-520, 1986.

GARDNER, D.G. Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy? *Trends in Endocrinology Metabolism*, v. 14, n. 9, p. 411-416, 2003.

GERRING, K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 33, n. 5, p. 425-438, 2001.

GERMANO, C.M. *et al.* The interaction of plasma renin activity and plasma atrial natriuretic peptide in 21-hydroxylase deficiency patients. *Journal of Endocrinology Investigation*, v. 28, n. 4, p. 300-304, 2005.

GMAJ, P.; MURER, H.; CARAFOLI, E. Localization and properties of a high-affinity ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase in isolated kidney cortex plasma membranes. *FEBS Letters*, v. 144, n. 2, p. 226-230, 1982.

GOETZE, J.P. *et al.* Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *Faseb Journal*, v. 17, n. 9, p. 1105-1107, 2003.

GOETZE, J.P. *et al.* BNP and N-terminal proBNP are both extracted in the normal kidney. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 36, n. 1, p. 8-15, 2006.

GOY, M.F. *et al.* Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. *Biochemical Journal*, v. 358, Pt 2, p. 379-387, 2001.

GRASSL, S.M.; ARONSON, P.S. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 261, n. 19, p. 8778-8783, 1986.

GRUBMEYER, C.; PENEFSKY, H.S. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 8, p. 3718-3727, 1981.

HARRIS, P.J.; THOMAS, D.; MORGAN, T.O. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature*, v. 326, n. 6114, p. 697-698, 1987.

HASHIMOTO, Y. *et al.* Functional evidence for an apical ANP receptor in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 268, n. 3, p. 443-445, 1994.

HOBBS, A. *et al.* Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation*, v. 110, n. 10, p. 1231-1235, 2004.

HOUWELING, A.C. *et al.* Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of CNP-3 in chicken. *Development and Dynamics*, v. 233, n. 3, p. 1076-1082, 2005.

HUM, D. *et al.* Characterization of a cGMP-response element in the guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A gene promoter. *Hypertension*, v. 43, n. 6, p. 1270-1278, 2004.

JOHN, S.W. *et al.* Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science*, v. 267, n. 5198, p. 679-681, 1995.

KHANNA, A.; KURTZMAN, N.A. Metabolic alkalosis. *Journal of Nephrology*, v. 19 Suppl 9, p. S86-S96, 2006.

KISHIMOTO, I.; DUBOIS, S.K.; GARBERS, D.L. The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 93, n. 12, p. 6215-6219, 1996.

LACHANCE, D. *et al.* Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 135, n. 3, p. 1090-1098, 1986.

LARA, L.S. *et al.* Angiotensin-(1-7) reverses the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na⁺-ATPase activity via a A779-sensitive receptor. *Regulatory Peptides*, v. 103, p. 17-22, 2002.

LEDSOME, J.R.; KING, K.A. Mechanisms of release of atrial natriuretic factor in vivo. *Advances in Experimental Medical Biology*, v. 381, p. 175-186, 1995.

LIGHT, D.B.; CORBIN, J.D.; STANTON, B.A. Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature*, v. 344, n. 6264, p. 336-339, 1990.

LISY, O. *et al.* Atrial BNP endocrine function during chronic unloading of the normal canine heart. *American Journal of Physiology (Regulatory and Integrated Comparative Physiology)*, v. 288, n. 1, p. R158-R162, 2005.

LOHMANN, S.M. *et al.* Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 22, n. 8, p. 307-312, 1997.

LOPES, A.G. *et al.* PLA₂/PGE₂ are involved in the inhibitory effect of bradykinin on the angiotensin-(1-7)-stimulated Na⁺-ATPase activity of the proximal tubule. *Regulatory Peptides*, v. 117, p. 37-41, 2004.

LOWE, D.G. *et al.* Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *Embo Journal*, v. 8, n. 5, p. 1377-1384, 1989.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCHNER, A. *et al.* Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction. *Cardiovascular Research*, v. 51, n. 3, p. 601-607, 2001.

MADDOX, D.A.; BRENNER, B.M. Glomerular Ultrafiltration. In: *The Kidney*. F.C.R. Barry M. Brenner (Ed.). Benner & Rector's 7th edition: v. 1, 2004.

MADSEN, K.M.; TISHER, C.C. Anatomy of the Kidney. In: *The Kidney*. F.C.R. Barry M. Brenner (Ed.). Benner & Rector's 7th edition: v. 1, 2004.

MALNIC, G. *et al.* Effect of furosemid and NaCl-loading on chloride excretion in single nephrons of rat kidneys. *Pflügers Archives*, v. 309, n. 1, p. 21-37, 1969.

MARÍN, R.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F. Active sodium transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 814, n. 2, p. 363-373, 1985.

MARÍN, R.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F. Inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 858, n. 1, p. 195-201, 1986.

MARÍN, R. *et al.* Ouabain-insensitive, Na-ATPase activity in pure suspensions of rat kidney proximal tubules. *FEBS Letters*, v. 269, n. 1, p. 77-78, 1990.

MAURICE, D.H. *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Molecular Pharmacology*, v. 64, n. 3, p. 533-546, 2003.

MCBRIDE, K.; NEMER, M. Regulation of the ANF and BNP promoters by GATA factors: lessons learned for cardiac transcription. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 79, n. 8, p. 673-681, 2001.

MCKENZIE, J.C. *et al.* Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the kidney, adrenal medulla, pituitary, and atrium of rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 33, n. 8, p. 828-832, 1985.

MOE, O.W. *et al.* Renal Transport of Glucose, Amino Acids, Sodium, Chloride, and Water. In: *The Kidney*. F.C.R. Barry M. Brenner (Ed.). Benner & Rector's 7th edition: v. 1, 2004.

MOE, O.W.; HUANG, C.L. Hypercalciuria from acid load: renal mechanisms. *Journal of Nephrology*, v. 19, Suppl 9, p. S53-S61, 2006.

MORETTI, R. *et al.* Ouabain-insensitive Na-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 98, n. 4, p. 623-626, 1991.

MUKOYAMA, M. *et al.* Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic

peptide and brain natriuretic peptide. *Journal of Clinical Investigation*, v. 87, n. 4, p. 1402-1412, 1991.

MÜLLER, D. *et al.* Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology*, v. 145, n. 3, p. 1392-1401, 2004.

NAGASE, M. *et al.* Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, v. 15, n. 11, p. 1235-1243, 1997.

NAKAMURA, K., J. Hirano, *et al.* Protein kinase G activates inwardly rectifying K⁺ channel in cultured human proximal tubule cells. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)*, v. 283, n. 4, p. F784-F791, 2002.

NAKANISHI, M. *et al.* Role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A in myocardial infarction evaluated using genetically engineered mice. *Hypertension*, v. 46, n. 2, p. 441-447, 2005.

OGAWA, T. *et al.* Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria. *American Journal of Physiology*, v. 276, n. 6, Pt 2, p. H1977-H1986, 1999.

OGAWA, Y. *et al.* Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *Journal of Clinical Investigation*, v. 93, n. 5, p. 1911-1921, 1994.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; DE MELLO-AIRES, M. Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on pH(i) regulation in MDCK cells. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)*, v. 279, n. 5, p. F944-F953, 2000.

OLIVER, P.M. *et al.* Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 95, n. 5, p. 2547-2551, 1998.

OTERO, A.D. Transphosphorylation and G protein activation. *Biochemical Pharmacology*, v. 39, n. 9, p. 1399-1404, 1990.

PAGANO, M.; ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 25, p. 22064-22070, 2001.

PAGLIARANI, A. *et al.* (Na⁺+K⁺)- and Na⁺-stimulated Mg²⁺-dependent ATPase activities in kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 90, n. 1, p. 41-52, 1988.

PFEIFER, A. *et al.* Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo Journal*, v. 17, n. 11, p. 3045-3051, 1998.

POTTER, L.R. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Frontiers of Bioscience*, v. 10, p. 1205-1220, 2005.

POTTER, L.R.; HUNTER, T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Molecular and Cell Biology*, v. 18, n. 4, p. 2164-2172, 1998.

PROVERBIO, F.; CONDRESCU-GUIDI, M.; WHITTEMBURY, G. Ouabain-insensitive Na^+ stimulation of an Mg^{2+} -dependent ATPase in kidney tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 394, n. 2, p. 281-292, 1975.

PROVERBIO, F.; DEL CASTILLO, J.R. Na^+ -stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 646, n. 1, p. 99-108, 1981.

PROVERBIO, F.; PROVERBIO, T.; MARÍN, R. Na^+ -ATPase is a different entity from the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 858, n. 1, p. 202-205, 1986.

PROVERBIO, F. *et al.* Cell volume-sensitive Na^+ -ATPase activity in rat kidney cortex cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 941, n. 1, p. 107-110, 1988a.

PROVERBIO, F. *et al.* Na-pump activity in rat kidney cortex cells and its relationship with the cell volume. *FEBS Letters*, v. 236, n. 2, p. 318-320, 1988b.

PROVERBIO, F.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T. The ouabain-insensitive sodium pump. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 99, n. 3, p. 279-283, 1991.

RANGEL, L.B. *et al.* Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1416, n. 1-2, p. 309-319, 1999.

RANGEL, L.B. *et al.* Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na^+ -ATPase activity from proximal tubules. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1512, n. 1, p. 90-97, 2001.

RANGEL, L.B. *et al.* Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na^+ -ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1564, n. 2, p. 310-316, 2002.

REDFIELD, M.M. *et al.* Age- and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study. *Circulation*, v. 112, n. 15, p. 2254-2262, 2005.

ROLLIN, R. *et al.* Downregulation of the atrial natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor-C system in the early stages of diabetic retinopathy in the rat. *Molecular Vision*, v. 11, p. 216-224, 2005.

RUTH, P. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacological Therapy*, v. 82, n. 2-3, p. 355-372, 1999.

RYBALKIN, S.D. *et al.* Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circulation Research*, v. 93, n. 4, p. 280-291, 2003.

SACKTOR, B. *et al.* Sodium gradient- and sodium plus potassium gradient-dependent L-glutamate uptake in renal basolateral membrane vesicles. *Journal of Membrane Biology*, v. 60, n. 1, p. 63-71, 1981.

SANTOS-NETO, M.S. *et al.* Interaction of atrial natriuretic peptide, urodilatin, guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Regulatory Peptides*, v. 136, n. 1-3, p. 14-22, 2006.

SCALERA, V. *et al.* A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small-intestinal epithelial cells. *Biochemical Journal*, v. 186, n. 1, p. 177-181, 1980.

SCHLOSSMANN, J.; FEIL, R.; HOFMANN, F. Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Frontiers of Bioscience*, v. 10, p. 1279-1289, 2005.

SEILHAMER, J.J. *et al.* Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 165, n. 2, p. 650-658, 1989.

SELDIN, D.W.; GIEBISCH, G. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Seldin, D.W. & Giebisch, G. (Eds) 2nd edition: Haven Press (New York), 1992.

SHI, S.J. *et al.* Natriuretic peptide receptor A mediates renal sodium excretory responses to blood volume expansion. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)*, v. 285, n. 4, p. F694-F702, 2003.

SHOWALTER, C.J. *et al.* Renal response to atrial natriuretic factor is modulated by intrarenal angiotensin II. *American Journal of Physiology*, v. 254, n. 3, Pt 2, p. R453-R456, 1988.

SILVER, M.A. The natriuretic peptide system: kidney and cardiovascular effects. *Current Opinions in Nephrology and Hypertension*, v. 15, n. 1, p. 14-21, 2006.

SKOU, J. C. Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Bioscience Report*, v. 18, n. 4, p. 155-169, 1998.

SMOLENSKI, A. *et al.* Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 358, n. 1, p. 134-139, 1998.

SOUALMIA, H. *et al.* Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 29, n. 5, p. 605-611, 1997.

STASCH, J.P. *et al.* Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life Sciences*, v. 45, n. 10, p. 869-875, 1989.

SUDOH, T. *et al.* A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, v. 332, n. 6159, p. 78-81, 1988a.

SUDOH, T. *et al.* Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 155, n. 2, p. 726-732, 1988b.

SUGA, S. *et al.* Phenotype-related alteration in expression of natriuretic peptide receptors in aortic smooth muscle cells. *Circulation Research*, v. 71, n. 1, p. 34-39, 1992a.

Suga, S., K. Nakao, *et al.* Characterization of natriuretic peptide receptors in cultured cells. *Hypertension*, v. 19, n. 6, Pt. 2, p. 762-765, 1992b.

SULLIVAN, D.R.; WEST, M.; JEREMY, R. Utility of brain natriuretic peptide (BNP) measurement in cardiovascular disease. *Heart and Lung Circulation*, v. 14, n. 2, p. 78-84, 2005.

TAMURA, N. *et al.* Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 97, n. 8, p. 4239-4244, 2000.

TSUTAMOTO, T. *et al.* Relationship between renal function and plasma brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *Journal of American Coll Cardiology*, v. 47, n. 3, p. 582-586, 2006.

VENTRELLA, V. *et al.* Gill (Na⁺+K⁺)- and Na⁺-stimulated Mg²⁺-dependent ATPase activities in the gilthead bream (*Sparus auratus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 95, n. 1, p. 95-105, 1990.

VUOLTEENAHO, O.; ALA-KOPSALA, M.; RUSKOAHO, H. BNP as a biomarker in heart disease. *Advances in Clinical Chemistry*, v. 40, p. 1-36, 2005.

WHITTEMBURY, G.; FISHMAN, J. Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused toad kidney: the effect of K, ouabain and ethacrynic acid. *Pflügers Archives*, v. 307, n. 3, p. 138-153, 1969.

WHITTEMBURY, G.; PROVERBIO, F. Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflügers Archives*, v. 316, n. 1, p. 1-25, 1970.

WILCOX, J.N. *et al.* Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Molecular and Cell Biology*, v. 11, n. 7, p. 3454-3462, 1991.

WOODARD, G.E.; ZHAO, J.; ROSADO, J.A. Different effect of ATP on ANP receptor guanylyl cyclase in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Acta Physiologica (Oxford)*, v. 188, n. 3-4, p. 195-206, 2006.

YAN, W. *et al.* Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 97, n. 15, p. 8525-8529, 2000.

YANG-FENG, T.L. *et al.* The pronatriodilatin gene is located on the distal short arm of human chromosome 1 and on mouse chromosome 4. *American Journal of Human Genetics*, v. 37, n. 6, p. 1117-1128, 1985.

YE, P.; WEST, M.J. Cosegregation analysis of natriuretic peptide genes and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Clinical Experimentation in Pharmacology and Physiology*, v. 30, n. 12, p. 930-936, 2003.

YODA, A.; YODA, S. Two different phosphorylation-dephosphorylation cycles of Na,K-ATPase proteoliposomes accompanying Na⁺ transport in the absence of K⁺. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 262, n. 1, p. 110-115, 1987.

YOSHIZUMI, M. *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor 1 induced by angiotensin II in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemostasy*, v. 79, n. 3, p. 631-634, 1998.

ZEIDEL, M.L. Renal actions of atrial natriuretic peptide: regulation of collecting duct sodium and water transport. *Annual Review of Physiology*, v. 52, p. 747-759, 1990.

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](#)