

LINDSEY MATOS POMODORO CABRAL

“GERAÇÃO DE CERAMIDAS NAS MEMBRANAS
BASOLATERAIS DE TÚBULOS PROXIMAIS RENAIIS, E
SEU PAPEL NA REGULAÇÃO DO TRANSPORTE DE
Na⁺”

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



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Tese de doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) desenvolvida entre agosto de 2006 e agosto de 2008 sob a orientação do Prof. Marcelo Einicker Lamas no Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

O trabalho foi financiado com auxílios concedidos pelas seguintes agências de fomento: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

FICHA CATALOGRÁFICA

Cabral, Lindsey Matos Pomodoro
Geração de ceramidas nas membranas basolaterais de túbulos proximais renais, e seu papel na regulação do transporte de Na⁺/ Lindsey Matos Pomodoro Cabral. Rio de Janeiro, 2008.
xvi, 101 páginas

Tese (Doutorado em Biofísica) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2008.

Orientador: Marcelo Einicker Lamas

1. Na⁺-ATPase 2. (Na⁺/K⁺)ATPase 3. Ceramida 4. Ceramida-1P 5. Rim 6. Túbulo Proximal 7. Membrana Basolateral 8. Proteínas cinases 9. Sinalização celular – Teses.

I. Einicker-Lamas, Marcelo (Orient.).
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Geração de ceramidas nas membranas basolaterais de túbulos proximais renais, e seu papel na regulação do transporte de Na⁺.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lindsey Matos Pomodoro Cabral

Geração de ceramidas nas membranas basolaterais de túbulos proximais renais, e seu papel na regulação do transporte de Na⁺

Rio de Janeiro, 1 de agosto de 2008

Dr. Marcelo Einicker Lamas. UFRJ

Dr^a. Tecia Maria Ulisses de Carvalho. UFRJ

Dr^a. Narcisa Leal da Cunha e Silva. UFRJ

Dr^a. Denise Pires de Carvalho. UFRJ

Dr^a. Doris Rosenthal. UFRJ

Aos meus pais Ely e Ruth,
à minha irmã Aline, ao meu noivo
Daniel e ao meu cunhado Sérgio.

AGRADECIMENTOS

Não teria como não citar alguns nomes na minha tese, como forma de agradecimento.

Deus está sempre em primeiro lugar em todas as minhas conquistas, direcionando de forma natural minha vida, fazendo com que eu olhe para trás e veja a mão Dele em cada detalhe.

Quero deixar registrado o meu agradecimento pela minha família (minha mãe, meu pai, minha irmã, meu noivo e meu cunhado). Todos, de forma especial, contribuíram por mais esta meta cumprida. Meus pais, claro, dando-me todo suporte (em todas as áreas), não me deixando desanimar um minuto, orgulhosos por mais esta conquista. Minha irmã e meu cunhado, mesmo no Espírito Santo, se fizeram presentes em cada palavra desta tese, pois graças a eles tive suporte emocional e cada vez mais vontade de conquistar este título.

E o que seria de mim sem o melhor designer, Daniel? Todas as figuras deslumbrantes desta tese e todas as animações e visual da apresentação não teriam acontecido sem ele. Daniel, como sempre ao meu lado, ouviu cada parecer meu com toda sua calma e fez com que esta tese se concretizasse. Eu não teria alguém torcendo por mim mais especial do que ele. Dedico esta tese à minha exemplar família. Amo vocês!

Agradeço ao meu orientador, Marcelo, por esses anos de pesquisa. Esta tese se concretizou graças à sua orientação, com muito trabalho e dedicação, sempre torcendo por este feito.

Agradeço ao professor Adalberto, mais uma vez, por ter aberto as portas do laboratório para mim quando eu o abordei no corredor do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, em março de 2003, quando eu era, ainda, apenas uma aluna de Educação Física da UFRJ. Professor Adalberto, serei grata, eternamente, pela oportunidade que o Sr. me concedeu de passar esses anos pesquisando em seu laboratório.

Muitos dos experimentos realizados nesta tese devo à colaboração do professor Celso Caruso Neves, que abriu as portas de seu laboratório permitindo que eu compartilhasse de sua orientação, interessado em cada experimento e solícito a cada dúvida. Aprendi muito com ele e com sua aluna, Mira Wengert, exemplos de cientistas.

Como sempre prontamente e de uma maneira gentil a professora Doris Rosenthal aceitou ser a revisora desta tese. Agradeço sua dedicação, sensibilidade, educação e profissionalismo, adjetivos estes raramente encontrados juntos em um único pesquisador.

Deixo registrado meu eterno agradecimento ao meu aluno de iniciação científica, Fernando Almeida, que esteve ao meu lado em todos os momentos, apoiando-me de todas as maneiras, tanto experimentalmente quanto sendo meu amigo fiel.

Agradeço, também, meus ex-alunos de iniciação científica (Pedro, Alexandre, Nathalie e Gabriela), que sempre torceram por mim e prontamente me ajudaram.

Se eu citasse os nomes de todos aqueles do laboratório que me ajudaram, poderia causar alguma injustiça, por ordem ou esquecimento. Deixo, portanto, meus agradecimentos a todos os integrantes do laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch que ainda permanecem ou que já saíram do laboratório. Muitos deles levarei como amigos para a vida toda; não teria conquista maior do que esta.

RESUMO

Os túbulos proximais renais são responsáveis pela manutenção do volume extracelular, já que este segmento do néfron está envolvido em ~ 60% do processo de reabsorção de fluidos nos rins. Na membrana basolateral do túbulo proximal, estão presentes os transportadores ativos primários, sendo a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (bombeia o sódio em massa para o interstício), responsável pela geração do gradiente de sódio entre a célula, gradiente este necessário para o transporte de íons do lúmen para dentro da células epiteliais renais. A $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, responsável pela regulação do ajuste fino da reabsorção renal, além da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, foram enzimas de nosso interesse nesta tese. No presente trabalho, foi mostrado que ceramida e ceramida-1P não modulam a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em nosso modelo biológico. No entanto, concentrações nanomolares de ceramida (200 nM), inibem a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$; tendo a ceramida-1P um potencial inibitório maior sobre a enzima (efeito máximo com 100 nM). O efeito inibitório da ceramida sobre a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ ocorre via ativação de PKA, já que este efeito é abolido quando se incubam as membranas com 10 nM do inibidor específico de PKA, peptídeo 5-22. Por outro lado, a inibição da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ por ceramida-1P ocorre via PKC, já que a pré-incubação das membranas com 10 nM de calfofostina C (inibidor específico de PKC) previne a inibição da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$. Foi ainda mostrada a presença da esfingomielinase ácida e neutra na membrana basolateral renal, além da presença e caracterização parcial de uma ceramida cinase, mostrando assim a presença de geradores de ceramidas em membranas basolaterais renais.

Na busca de ativadores para este sistema gerador de ceramidas, foi mostrado que o AMPc estimula a atividade da ceramida cinase, efeito este que é revertido pela

incubação com o inibidor de PKA. Esta é a primeira demonstração de regulação por cinases de uma ceramida cinase. Desta forma, hormônios e autacóides que ativam a via AMPc/PKA, apresentam-se como potenciais moduladores deste sistema de sinalização via esfingolípídios.

ABSTRACT

The kidney proximal tubules are responsible for the maintenance of the extracellular volume, which are involved in ~ 60% of reabsorption process in the kidney. The basolateral membranes from kidney proximal tubules have active primary carriers, which the (Na⁺/K⁺) ATPase (pumps in mass the sodium for the interstitial), responsible for the generation of the gradient of sodium in the cell. This gradient is necessary for the transport of ions present in the lumen into the kidney epithelial cells. The Na⁺-ATPase, responsible for regulating fine renal reabsorption, in addition to (Na⁺/K⁺) ATPase, were enzymes of our interest in this thesis. In this work, it was shown that ceramide and ceramide-1P not modulate the (Na⁺/K⁺) ATPase in our biological model. However, nanomolar concentrations of ceramide (200 nM), inhibit the activity of Na⁺-ATPase. The ceramide-1P has a greater potential inhibitory on the enzyme (maximum effect with 100 nM). The inhibitory effect of ceramide on the Na⁺-ATPase occurs through activation of PKA, as this effect is abolished when the membranes were treated with 10 nM of specific inhibitor of PKA, peptide 5-22. Moreover, inhibition of the Na⁺-ATPase by ceramide-1P occurs via PKC, as the pre-incubation of membranes with 10 nM of calfofostina C (specific inhibitor of PKC) prevents the inhibition of Na⁺-ATPase. It was also shown the presence of acid and neutral esfingomielinase in renal basolateral membrane, besides the presence and partial characterization of a ceramide kinase, thus showing the presence of generators of ceramides in kidney basolateral membranes.

In search of activators for the system whose generates ceramides, it was shown that cAMP stimulates the activity of ceramide kinase, and this effect is reversed by incubation with the inhibitor of PKA. This is the first demonstration of regulation by a

ceramide kinase. Thus, autacoids and hormones that activate cAMP/PKA pathway, present themselves as potential modulators of the sphingolipids signalling system.

ABREVIATURAS

AMPC: Adenosina 3',5' monofosfato cíclico

ADP: Adenosina difosfato

Ang II: Angiotensina II

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

[γ -³²P]ATP : Adenosina trifosfato marcada com ³²P na fosforila γ -terminal

Bis-Tris Propano : 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino]propano

Cer: Ceramida

CerK: Ceramida cinase

CERT: proteína transportadora de ceramida

C1P: Ceramida-1P

CHCl₃: Clorofórmio

CH₃OH: Metanol

Cph: Calfostina C

DMSO: Dimetil sulfóxido

DAG: Diacilglicerol

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ácido etileno dinitrito tetra-acético

Hepes: Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'(2-etano sulfônico)

HCl: Ácido clorídrico

Mg.ATP²⁻: Complexo do Mg²⁺ com o ATP⁴⁻

MOPS: 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid

NaF: Fluoreto de Na⁺

Pi: Fosfato inorgânico

PKA: Proteína cinase A

PKAi: Peptídeo inibidor (5-22) de proteína cinase A

PKC: Proteína cinase C

PLC: Fosfolipase C

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

PMCA: Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática

PMSF: Fluoreto de fenil-metil-sulfonila

POPOP: 1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]-benzeno;2,2'-p-fenileno-bis[5-feniloxazol]

SM: Esfingomielina

SMase: Esfingomielinase

Sph: Esfingosina

S1P: Esfingosina-1P

TBS: Tampão de Tris-salina

TCA: Ácido tricloro-acético

TLC: Cromatografia de camada fina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Os rins	1
1.2- Transporte de íons na membrana basolateral	10
1.3- A (Na ⁺ /K ⁺)ATPase	12
1.4- A Na ⁺ -ATPase	19
1.5- Papel do entorno lipídico na atividade dos transportadores de sódio	22
1.6- Os esfingolipídios	24
1.7- Geração de esfingolipídios bioativos	27
1.7.1- As esfingomielinases	30
1.7.2- A ceramida cinase	31
2- OBJETIVOS	33
3- MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- Material	34
3.2- Isolamento da membrana basolateral	34
3.3- Preparação de [³² P]ATP	36
3.4- Dosagem de proteína	36
3.5- Determinação da atividade da (Na ⁺ /K ⁺)ATPase da membrana basolateral	36
3.6- Determinação da atividade da Na ⁺ -ATPase da membrana basolateral	37
3.7- Medida da atividade de proteína cinase C (PKC)	38
3.8- Medida da atividade de proteína cinase A (PKA)	39

3.9- Ensaio de fosforilação e extração de lipídios da MBL	39
3.10- Separação e identificação dos lipídios	40
3.11- SDS-PAGE e imunodeteccção	41
3.12- Análise estatística	41
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5- RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	82
7- REFERÊNCIAS	87
8- ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os rins

Nos organismos superiores, o controle sistêmico da concentração de diferentes íons no líquido extracelular é realizado pelos rins. Dentre as principais funções que os rins desempenham estão: a regulação da osmolaridade plasmática e do volume extracelular (mantendo a composição destes dentro de uma pequena faixa de variação), excreção de produtos metabólicos e substâncias tóxicas, secreção de hormônios e regulação do equilíbrio ácido-básico e da pressão arterial (BRENNER & RECTOR, 2000).

Diariamente, cerca de 1.200 litros de sangue chegam aos rins pelas artérias renais. Dessa forma, estima-se que em 24 horas sejam filtrados cerca de 180 litros de fluido do plasma; porém são formados apenas 1 a 2 litros de urina por dia, o que significa que aproximadamente 99% do filtrado glomerular é reabsorvido (SCHNERMANN & SAYEGH, 1998; FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Cada rim é composto de milhões de pequenas unidades funcionais denominadas néfrons (Figura 1). Estes são formados pela cápsula de Bowman que circunda o glomérulo, onde ocorre a filtração do plasma, conectado a uma parte tubular, onde ocorrem os processos de reabsorção e/ou secreção de água e osmólitos (MELLO-AIRES, 1999).

O glomérulo é um enovelado capilar, formado a partir da arteríola aferente, que se divide em 5 a 8 ramos que, por sua vez, se subdividem em 20 a 40 alças capilares. Estas são sustentadas por células mesangiais, que possuem receptores

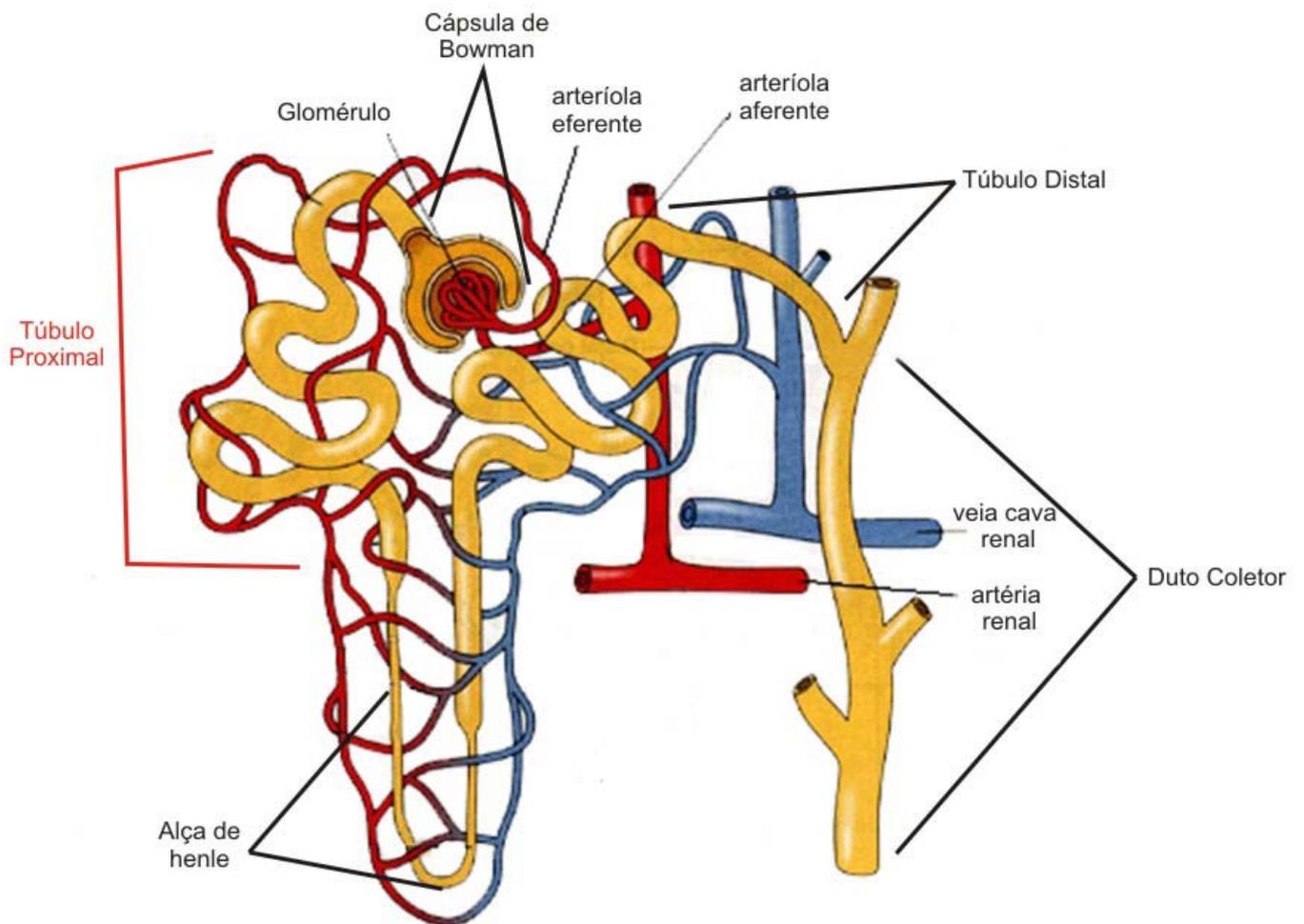


Figura 1: Segmentos do néfron (unidade funcional do rim).

Os rins são compostos por milhões de unidades funcionais denominadas néfrons. A porção do néfron que circunda o glomérulo é a cápsula de Bowman. A partir da cápsula de Bowman, o líquido tubular passa pelo túbulo proximal, pela alça de Henle, pelo túbulo distal e pelo ducto coletor (modificado de The McGraw-Hill Companies, Inc.).

para vários hormônios que têm papel importante na regulação da hemodinâmica intraglomerular. Posteriormente, as alças capilares se reúnem formando a arteríola eferente do glomérulo (MELLO-AIRES, 1999).

O sangue arterial é conduzido sob alta pressão nos capilares do glomérulo. Essa pressão, que normalmente é de 70 a 80 mm Hg, é suficiente para que parte do plasma passe para a cápsula de Bowman, processo denominado filtração (MULLINS *et al.*, 2006). Este fluido extravasado para a cápsula de Bowman constitui o filtrado glomerular, que é semelhante ao plasma sangüíneo, mas sem células e proteínas. O conceito de que uma das diferenças entre o filtrado glomerular e o plasma sangüíneo é a ausência de proteínas, está sendo mudado. Trabalhos de CARUSO-NEVES e colaboradores (2005 e 2006), mostram que células do túbulo proximal renal podem reabsorver grandes quantidades de albumina através de endocitose mediada por megalina, evidenciando, assim, que possivelmente a ausência de proteínas no ultrafiltrado se deva à sua intensa reabsorção.

O filtrado glomerular passa da cápsula de Bowman para o túbulo proximal. Nesse túbulo ocorre a maior parte da reabsorção ativa de íons e solutos, dentre os quais o Na⁺ aparece como um dos principais íons, estabelecendo um gradiente osmótico através do epitélio tubular que permite, por exemplo, a reabsorção de água, açúcares e aminoácidos. Com isso, quando o líquido percorre o ramo descendente da alça de Henle, há a reabsorção passiva de água a favor do gradiente osmótico existente entre o fluido intratubular e o interstício hipertônico que o envolve. Em virtude de estar envolto por um interstício hipertônico e de sua permeabilidade a sais e uréia ser, de um modo geral, elevada, a concentração intraluminal aumenta à medida que o fluido tubular se dirige para a papila (formações cônicas com ápice voltado para o interior dos cálices renais presentes na

região medular), tanto por saída de água como por entrada passiva de solutos. O ramo descendente percorre regiões do rim com gradientes crescentes de concentração. Conseqüentemente, há a maior perda de água do ramo descendente da alça de Henle (SELDIN & GEIBISCH, 1992; SCHNERMANN & SAYEGH, 1998; FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Esse líquido ultrafiltrado, agora muito concentrado, passa então a percorrer o ramo ascendente da alça de Henle que é formado por células impermeáveis à água. Nessa região, ocorre remoção ativa de Na^+ do lúmen, deixando o líquido tubular hipotônico. O segmento inicial do túbulo distal convoluto é relativamente impermeável à água. Sua porção final, responde ao hormônio antidiurético (ADH), também denominado de vasopressina, tendo permeabilidade à água na presença deste hormônio e impermeabilidade na sua ausência. Ao sair do néfron, o filtrado entra nos ductos coletores. Na membrana apical deste segmento do néfron, pode haver a reabsorção final de água, que se dá pela inserção de canais de água que é ativada pelo ADH, que é um peptídeo formado por oito aminoácidos e sintetizado em células neuroendócrinas localizadas nos núcleos supra-ópticos e paraventriculares do hipotálamo, adjacentes aos centros controladores da sede. Daí é transportado para a hipófise posterior (ou neuro-hipófise), de onde é secretado para a circulação.

A secreção do ADH pela neuro-hipófise pode ser influenciada pela osmolaridade plasmática, volume, pressão sangüíneos e em casos extremos como hipovolemia, decorrente de hemorragias e desidratação, contribuindo para restaurar a pressão arterial normal (SCHNERMANN & SAYEGH, 1998; FÉRAILLE & DOUCET, 2001). O ADH secretado para a circulação nos túbulos distais e ductos coletores liga-se ao receptor localizado na membrana basolateral e, através da estimulação da proteína G (Gs), ativa adenilato ciclase, produzindo AMPc que leva à

ativação da proteína cinase A (PKA). Esse evento resulta na fosforilação de proteínas responsáveis por transferir vesículas lipídicas contendo moléculas de aquaporina 2 para a membrana apical, elevando sua permeabilidade à água (MELLO-AIRES, 1999).

Quando o nível plasmático de ADH é baixo, é excretado maior volume de urina, sendo esta urina diluída. Quando o nível plasmático de ADH está elevado, é eliminado um volume de urina (condição denominada antidiurese), urina esta mais concentrada (MELLO-AIRES, 1999).

Os diferentes processos de transporte presentes ao longo do néfron, fazem de cada segmento um compartimento especializado. Esta característica pode ser exemplificada através dos distintos transportadores de Na^+ presentes ao longo do néfron, os quais dão diferentes contribuições à reabsorção renal de íons (com destaque para o Na^+) e solutos. Dentre os segmentos do néfron, o túbulo proximal é responsável por ~ 60 % da reabsorção de substâncias do fluido glomerular (Figura 2).

As células que compõem o epitélio do néfron apresentam algumas características específicas, quando comparadas com as de outros órgãos e tecidos, destacando-se sua polaridade morfológica e funcional. A membrana plasmática destas células apresenta duas regiões bem distintas: uma porção apical (voltada para o lúmen tubular) e outra porção basolateral (voltada para o interstício) (Figura 3).

A membrana apical do túbulo proximal apresenta um grande número de vilosidades capazes de aumentar a superfície de absorção. Nesta face da célula residem canais e sistemas transportadores específicos, muitos dos quais utilizam o gradiente de Na^+ entre os meios extra (~ 140 mM) e intracelulares (~ 14 mM) como

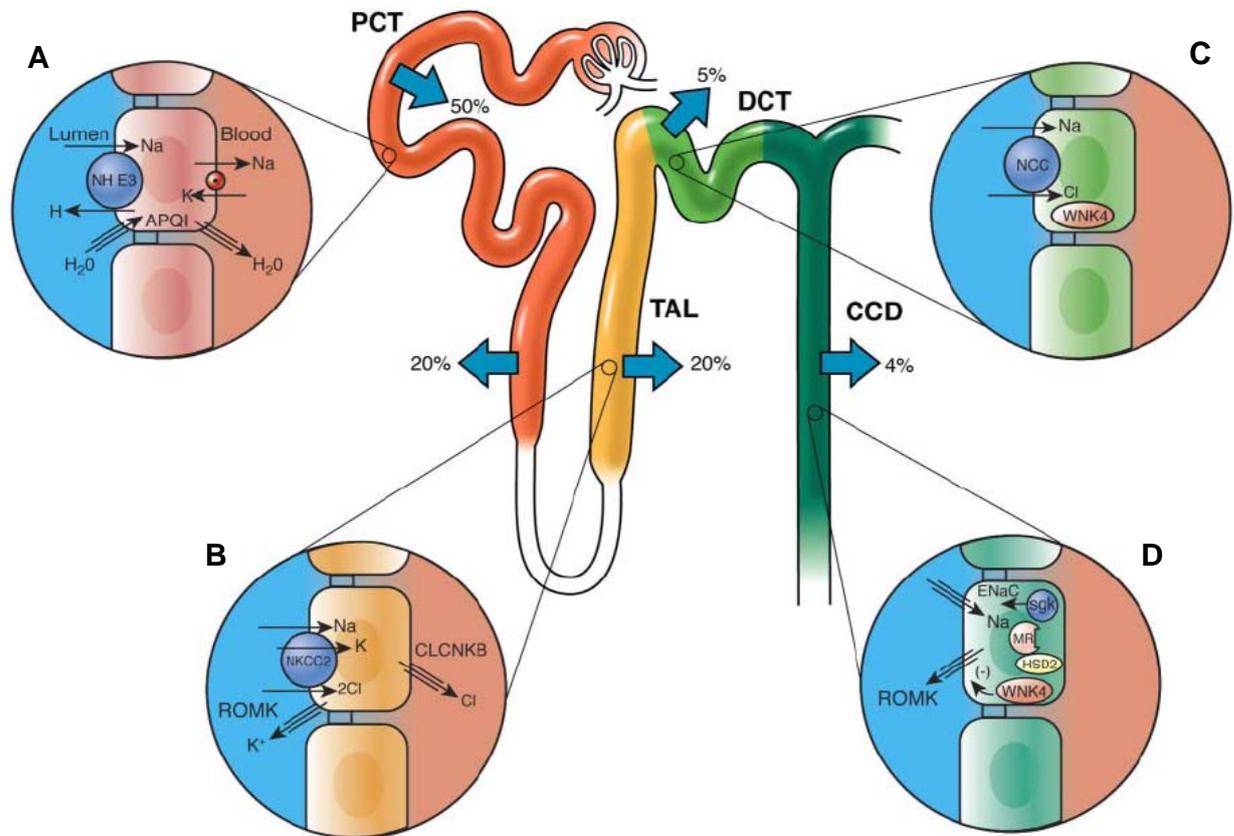


Figura 2: Porcentagem de reabsorção de Na^+ através dos segmentos do néfron.

A presença de transportadores ativos primários em todas as membranas basolaterais é uma característica das células epiteliais. Um exemplo é a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, que transporta para o interstício o Na^+ que entra por canais, trocadores e co-transportadores de Na^+ presentes na membrana apical, garantindo o fluxo de absorção de Na^+ nos diferentes segmentos do néfron. (A) No túbulo proximal, ocorre 50-60 % da reabsorção do Na^+ , através (i) dos transportadores presentes na membrana apical acoplados a substratos, como os aminoácidos; (ii) dos canais de Na^+ ; e (iii) do trocador Na^+/H^+ (responsável pela maior reabsorção de Na^+ neste segmento). (B) 20 % a 30 % de Na^+ são reabsorvidos na alça de Henle, através do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. (C) No túbulo distal, 5 % a 7 % de Na^+ é reabsorvido, mediado pelo co-transportador Na^+/Cl^- e também pelo trocador Na^+/H^+ (com uma pequena porcentagem de contribuição). (D) No ducto coletor, 2 % a 4 % de Na^+ é reabsorvido através do canal de Na^+ (modificado de MULLINS *et al.*, 2006).

PCT – Túbulo proximal

TAL – Alça de Henle

DCT – Túbulo Distal

CCD – Ducto coletor

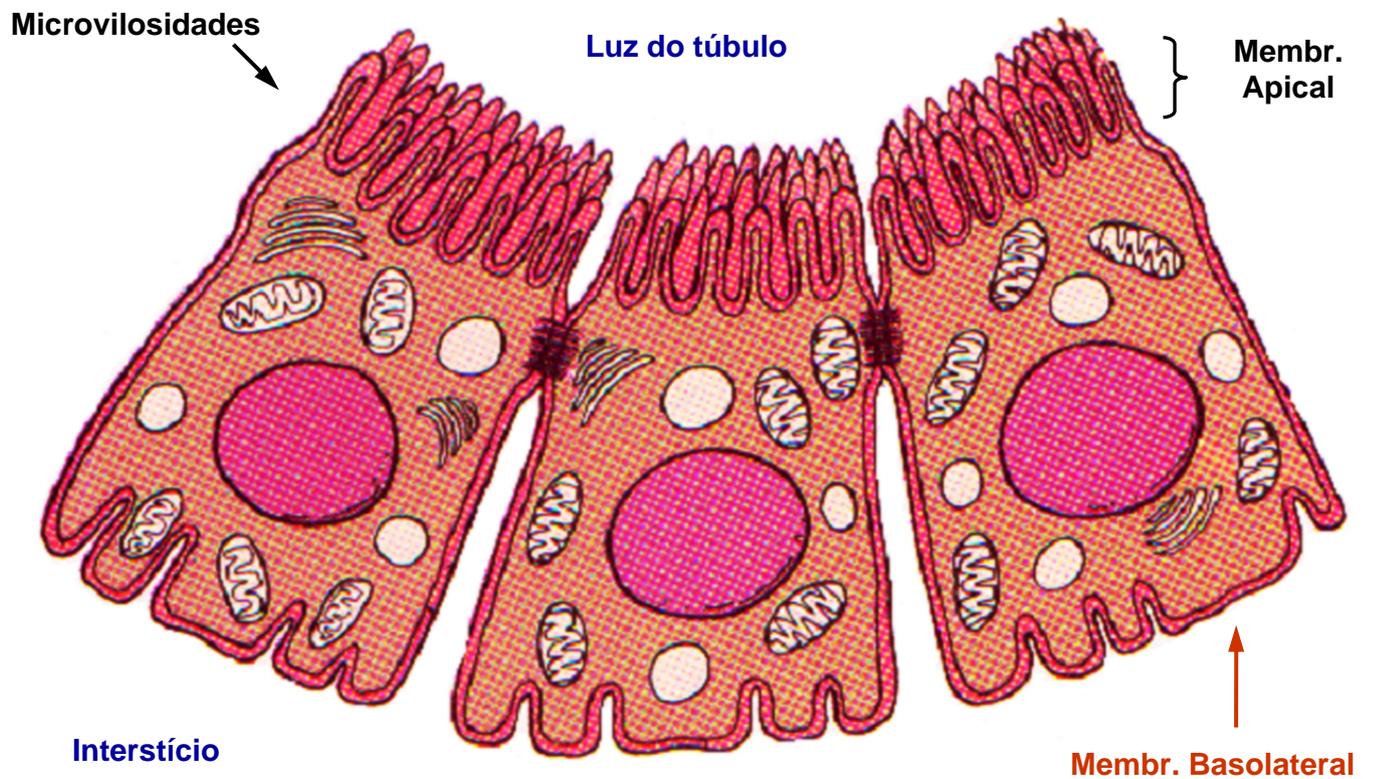


Figura 3: Morfologia das células do túbulo proximal renal.

As células do túbulo proximal renal são ditas polarizadas por apresentarem diferenças morfológicas bem distintas entre duas porções (com a presença de microvilosidades na face apical da célula e ausência delas na face basolateral) (retirado de SCHAUF *et al.*, 1993).

força motriz dos fenômenos de fluxo transepitelial. O gradiente eletroquímico transmembrana de Na^+ é gerado principalmente pela $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, que está localizada na membrana basolateral (SACKTOR *et al.*, 1981), e é utilizado para o transporte de outros solutos tais como glicose, aminoácidos, prótons e solutos orgânicos, por diferentes transportadores ativos secundários presentes na membrana apical (SELDIN & GEIBISCH, 1992). A reabsorção de Na^+ , pode ocorrer também pela via paracelular (através dos espaços entre as células), mas este processo não é ativamente regulado e varia em função das alterações do transporte transcelular (Figura 4). Além da presença de diferentes transportadores na membrana apical e na membrana basolateral, há outra importante diferença funcional, que é a presença de diferentes receptores nessas duas faces da membrana plasmática. Um exemplo é a presença do receptor sensível a Ca^{2+} extracelular, que está localizado exclusivamente na membrana apical das células epiteliais do túbulo proximal (RICCARDI *et al.*, 1996, 1998).

As células epiteliais renais, assim como toda célula epitelial, apresentam especializações nas membranas celulares que unem as células entre si e são denominadas junções oclusivas (Figura 4). A presença das junções oclusivas impede que as proteínas residentes na membrana voltada para o interstício migrem para a face apical e vice-versa. Em uma situação patológica na qual estas junções são destruídas, pode-se encontrar a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ nas membranas apical e basolateral. Estes pacientes apresentam, portanto, grande dificuldade em reabsorver solutos e água, que neste caso, passam a ser eliminados na urina (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Devido à presença de uma grande variedade de proteínas capazes de regular a função renal (APERIA *et al.*, 1994; FÉRAILLE & DOUCET, 2001), a membrana

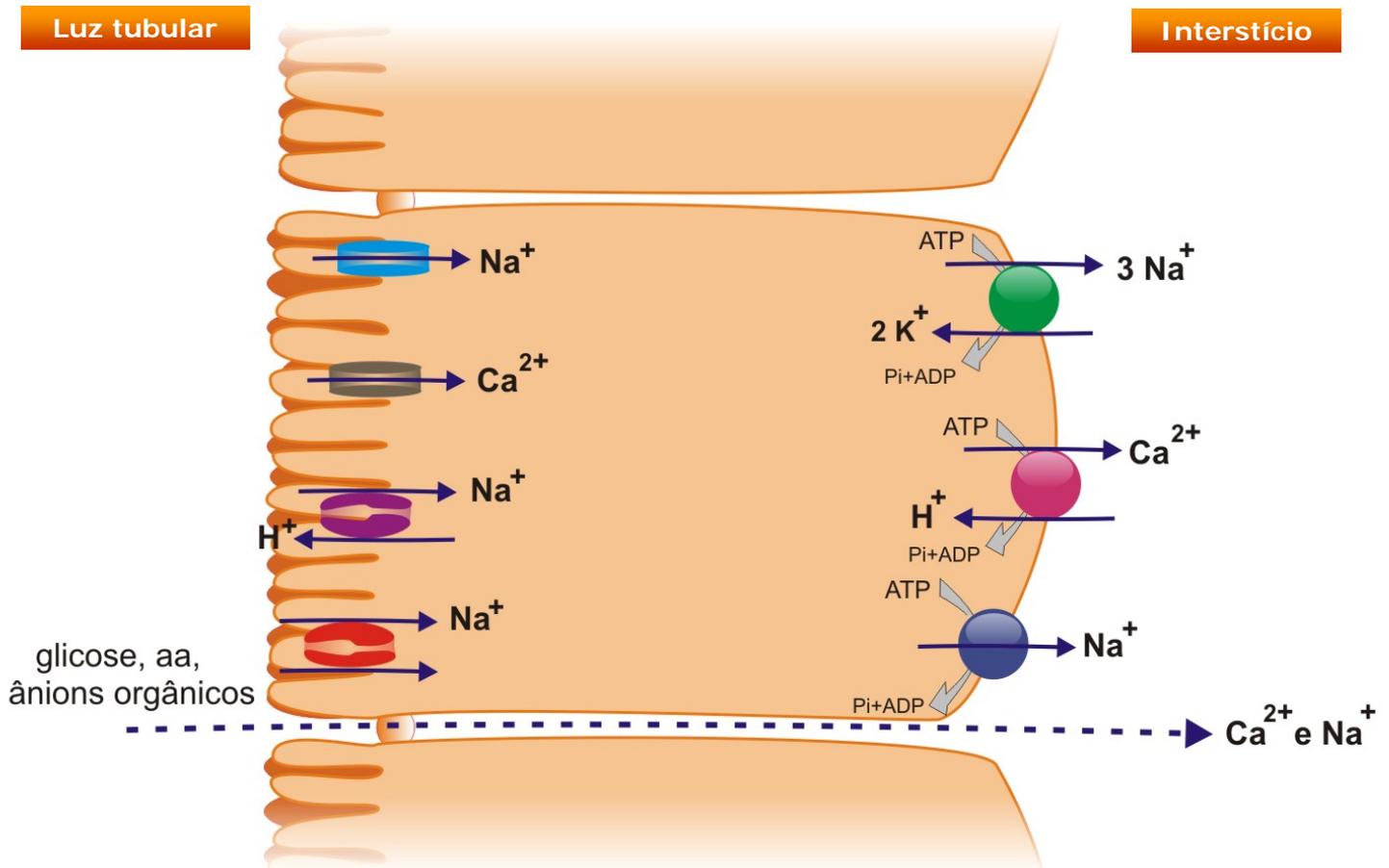


Figura 4: Diferença funcional entre as membranas apical e basolateral, evidenciando os principais mecanismos de transporte.

A face apical (voltada para a luz do túbulo), apresenta transportadores ativos secundários, que utilizam, majoritariamente, a energia do gradiente de Na^+ para co-transportar íons. Já na face basolateral (voltada para o interstício), há a presença de transportadores ativos primários, que utilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar íons contra seu gradiente eletroquímico (desenhado por Daniel Viégas).

basolateral das células epiteliais de túbulos proximais funciona como uma estrutura transdutora de sinais, constituindo um interessante modelo para o estudo de moléculas associadas às vias de sinalização, como por exemplo receptores, ATPases, proteínas cinases e lipídios sinalizadores (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000; EINICKER-LAMAS *et al.*, 2003; CABRAL *et al.*, 2007).

1.2 Transporte de íons através da membrana basolateral

A membrana basolateral contém transportadores ativos primários, como por exemplo, a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, a $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ e a segunda bomba de Na^+ ou $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, além de uma grande variedade de receptores para diferentes hormônios e autacóides (CARUSO-NEVES, 2000; ASSUNÇÃO-MIRANDA, 2005; LARA, 2005). A ativação desses receptores leva à produção de mensageiros secundários capazes de desencadear modificações funcionais específicas no metabolismo celular, regulando o fluxo iônico através das duas membranas (apical e basolateral) e do epitélio como um todo (APERIA *et al.*, 1994; VIEYRA, 1996).

Os transportadores ativos primários presentes na membrana basolateral, deslocam um soluto, como exemplo um íon, contra o seu gradiente eletroquímico, ou seja, o íon é transportado para um determinado compartimento (interstício) apesar deste conter alta concentração do mesmo. Para que esse transporte ocorra é necessário o consumo de energia que é obtida a partir da quebra de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP).

Nas membranas apicais das células epiteliais renais também se encontra um outro tipo de transporte ativo, que desloca um soluto contra o seu gradiente eletroquímico, porém este não utiliza a energia proveniente diretamente da quebra do ATP e por isso é denominado transporte ativo secundário. Esse transporte é

dependente e utiliza a energia de um gradiente iônico de concentração, gerado por um transportador ativo primário presente na membrana basolateral. Exemplificando, a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ na membrana basolateral cria dentro da célula uma diminuição da concentração de Na^+ . Na membrana apical existem transportadores ativos secundários, como por exemplo aqueles que transportam para dentro da célula duas moléculas de Na^+ e uma de glicose, denominado co-transporte $\text{Na}^+/\text{glicose}$ (MULLINS *et al.*, 2006). A diminuição da concentração de Na^+ no meio intracelular gerada pela $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ facilita a entrada do Na^+ para dentro da célula pelo lado luminal, sendo seu transporte acoplado ao transporte de outros solutos e/ou íons, como exemplificado anteriormente no co-transporte $\text{Na}^+/\text{glicose}$ ou, mesmo, no co-transporte $\text{Na}^+/\text{aminoácidos}$.

Alguns solutos são secretados nos túbulos também por transporte ativo secundário. Com freqüência, esse processo envolve o contra-transporte do soluto com o Na^+ . No contra-transporte, a energia liberada a partir do movimento de um dos solutos (que em sua maioria ocorre pela diminuição da concentração intracelular de Na^+) permite o movimento de um segundo soluto na direção oposta. Um exemplo desse transporte é o contra-transporte de Na^+ e próton, ou “antiporter” Na^+/H^+ (MULLINS *et al.*, 2006).

Pode-se concluir então, que a presença de diferentes transportadores nas membranas basolateral e apical é o fator que promove a direção do movimento do fluido, da luz tubular para o interstício (acarretando a reabsorção) ou do interstício para a luz tubular (acarretando a secreção).

Como mencionado anteriormente, a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ é responsável pela formação do gradiente eletroquímico propulsor do transporte transcelular de Na^+ ; logo, sua regulação acarretará em alterações na reabsorção de Na^+ em todo o

néfron e, conseqüentemente, na reabsorção e/ou secreção de solutos, tornando-se de extrema relevância o estudo da modulação desta ATPase.

1.3 A (Na⁺/K⁺)ATPase

Descoberta por SKOU (1957) em fração microsomal de nervos de caranguejo, a (Na⁺/K⁺)ATPase, é o sistema de transporte ativo responsável por manter os gradientes de Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática na maioria das células (HORISBERGER, 2004).

A (Na⁺/K⁺)ATPase utiliza a energia livre liberada pela hidrólise de ATP para transportar três íons Na⁺ para fora da célula e dois íons K⁺ para o interior celular (contra seus gradientes de concentração) (Figura 5), o que é determinante para manter a diferença de concentração de Na⁺ e de K⁺ entre os meios extra e intracelular, estando o Na⁺ em alta concentração fora da célula (~ 140 mM), e o K⁺ em alta concentração dentro da célula (~ 140 mM) .

A característica bioquímica da (Na⁺/K⁺)ATPase de formar um intermediário fosforilado do tipo acil-fosfato durante seu ciclo catalítico, classifica esta enzima como uma P-ATPase, sendo a (Na⁺/K⁺)ATPase a primeira P-ATPase descoberta. A descoberta da (Na⁺/K⁺)ATPase foi um dos grandes feitos da ciência mundial, o que se reflete no fato de Skou em 1997 ter ganho o Prêmio Nobel por este achado. Nos anos subseqüentes, outras P-ATPases foram descobertas em diferentes tecidos e organismos: Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA), Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática (PMCA), (H⁺/K⁺)ATPase e a H⁺-ATPase (KÜHLBRANDT, 2004); sendo a SERCA1a (retículo sarcoplasmático de músculo esquelético), a P-ATPase a ter sua estrutura cristalizada com uma maior resolução (2,6 Å) do que as demais P-ATPases (TOYOSHIMA *et al.*, 2000). A estrutura das outras P-ATPases,

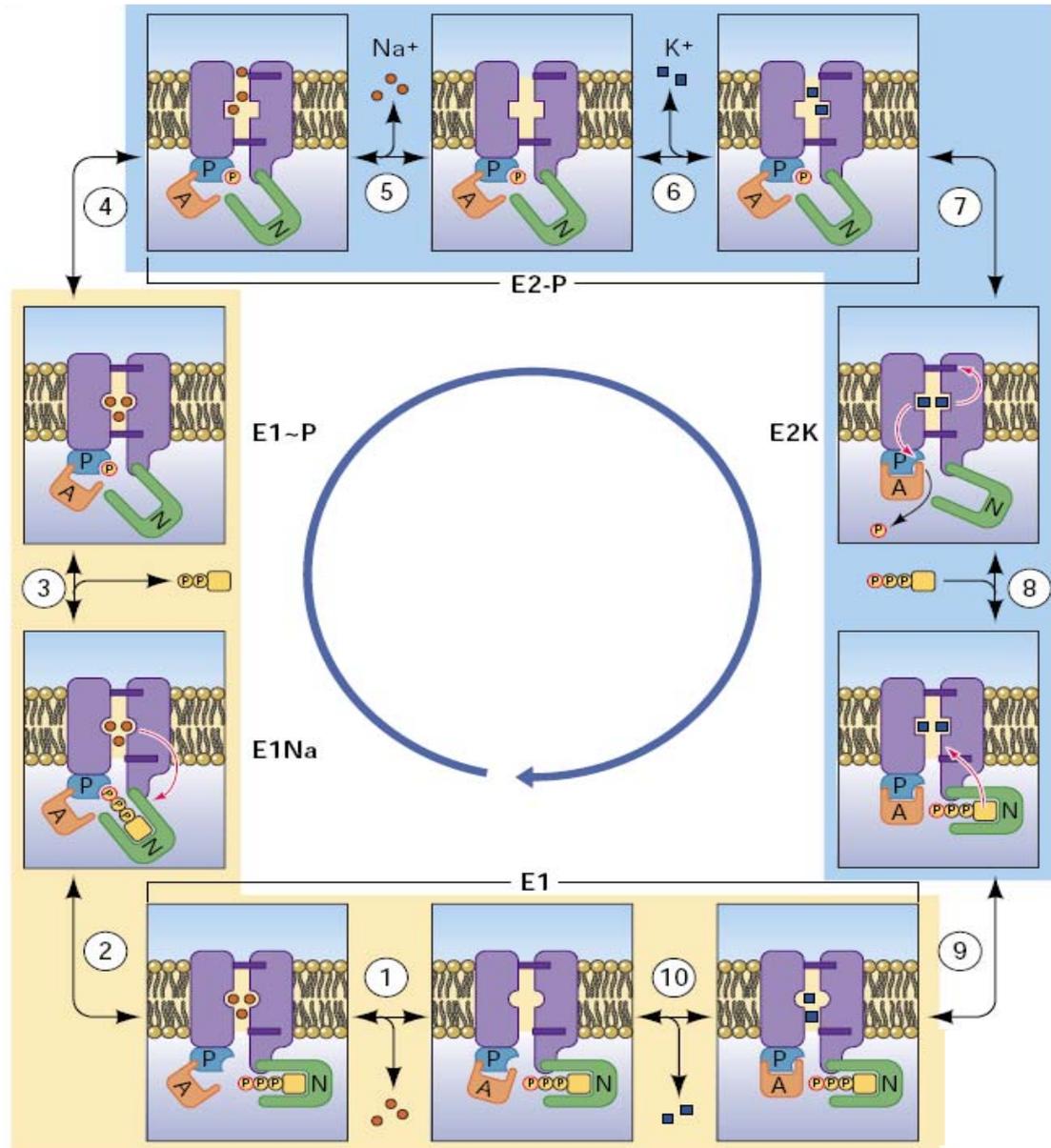


Figura 5: Ciclo catalítico da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$.

(1) A ligação do nucleotídeo no domínio N e ligação de três Na^+ (E1) (2) faz com que haja a fosforilação do domínio P (E1Na), (3) e hidrólise do ATP pelo domínio A, liberando ADP e formando um intermediário de alta energia (E1~P). 4 e 5) Há a transferência dos três Na^+ para o exterior, (6) e a ligação de dois K^+ na superfície extracelular. (7) Ocorre a defosforilação do intermediário fosforilado (E2K) pelo domínio A, (8) podendo haver a ligação do nucleotídeo no domínio N. 9 e 10) Há em seguida a transferência dos dois K^+ através da membrana para o citosol (modificado de HORISBERGER, 2004).

foi baseada na estrutura da SERCA1a, compartilhando sítios de hidrólise do ATP e domínios transmembrana (SWEADNER & DONNET, 2001).

Há mais de trinta anos, foi estabelecido que as P-ATPases mudam de conformação para translocar íons. Originalmente, duas distintas conformações foram chamadas de E_1 e E_2 (enzima-1 e enzima-2), as quais possuem afinidades diferentes para o íon transportado. O modelo atualmente descrito sugere que a ligação dos íons à $(Na^+/K^+)ATPase$ passa por dois estágios: uma forma não ocluída e outra ocluída (JORGENSEN *et al.*, 2003). Um passo chave para a transferência de energia necessária para o transporte ativo desta enzima é que, durante o ciclo catalítico, há formação de um intermediário fosforilado (na presença de Na^+), sendo esse um intermediário de alta energia ($E\sim P$). O íon K^+ promove a liberação do grupo fosfato (P_i) no decorrer do ciclo, fazendo com que a enzima retorne a um estado pronto para a ligação com outro ATP (JORGENSEN *et al.*, 2003; MARTIN, 2005).

Além da formação de um intermediário fosforilado do tipo acil-fosfato durante o ciclo catalítico, as P-ATPases possuem aproximadamente dez domínios transmembranas ($M1-M10$) característicos, e domínios citoplasmáticos que unem as hélices $M2$ e $M3$ e as hélices $M4$ e $M5$. Outra característica é que as porções NH_2 - e $COOH$ - terminal estão no lado citoplasmático da membrana (KÜHLBRANDT, 2004).

Baseado na seqüência homóloga da SERCA1a, as P-ATPases podem ser classificadas em o tipo 1 ao 5, sendo as P1-ATPases as que transportam metais pesados, as P2-ATPases as que transportam metais não-pesados (como exemplo de P2-ATPases, a $(Na^+/K^+)ATPase$, a PMCA e a Na^+ -ATPase), as P3-ATPases as que são ATPases de procariotos, as P4-ATPases são transportadoras de lipídios, e as P5-ATPases cuja especificidade permanece indeterminada (CATTY & GOFFEAU,

1996; HORISBERGER, 2004; KÜHLBRANDT, 2004; PAULUSMA & OUDE ELFERINK, 2005).

A (Na^+/K^+)ATPase possui peso molecular de ~ 110 kDa e é formada por três subunidades: α , β e γ . As subunidades α e β estão associadas em uma razão molar de 1:1. A subunidade α , composta de aproximadamente 1.000 resíduos de aminoácidos e com peso molecular de ~ 110 kDa, possui 10 domínios transmembrana e suas porções NH_2 - e COOH - terminal são intracelulares. A subunidade α da (Na^+/K^+)ATPase é a subunidade catalítica da enzima (VASILETS & SHWARTZ, 1993), e nela encontram-se sítios de ligação para ATP, Na^+ , K^+ , sítio de fosforilação na porção citoplasmática, ligação da ouabaína e de lipídios na região extracelular. Dentre as quatro isoformas dessa subunidade (α_1 , α_2 , α_3 e α_4), a α_1 é a que está presente majoritariamente nos rins. Essa isoforma pode ser fosforilada por PKA, proteína cinase C (PKC), proteína cinase G (PKG) e, ainda, por tirosina cinases, o que indica que seja regulada por diferentes vias de sinalização celular (LOPINA, 2001).

A subunidade β tem peso molecular entre 40 a 60 kDa, sendo composta por cerca de 370 aminoácidos, com apenas um domínio transmembrana e uma grande porção extracelular glicosilada. Apesar de não possuir atividade enzimática e de transporte, sua associação com a subunidade α é necessária ao funcionamento da enzima, pois possibilita o correto enovelamento da subunidade α recém sintetizada e seu direcionamento ao retículo endoplasmático e à membrana plasmática, bem como sua estabilização dentro da própria membrana (GEERING *et al.*, 1989, 1996; UENO *et al.*, 1997). Três isoformas da subunidade β já foram identificadas: β_1 , β_2 e β_3 (LOPINA, 2001).

Mais recentemente, um grupo de sete pequenas proteínas, chamado “FXYP” (baseado na seqüência de motivos conservados), foi identificado. Uma dessas proteínas (FXYP2) é a subunidade γ da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (53 aminoácidos e peso molecular ~ 10 kDa), sendo esta subunidade expressa principalmente nos rins. Mais membros deste grupo foram associados com o protômero α/β da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (SWEADNER & RAEL, 2000; ARYSTARKHOVA & SWEADNER, 2005). Dados de CORTES e colaboradores (2006) mostram a importância da subunidade γ na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ de rins de porco, já que a medula externa deficiente em subunidade γ tem redução na atividade máxima da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, enquanto a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ foi aumentada quando houve a fosforilação da subunidade γ pela PKA. Duas variantes da subunidade γ foram identificadas (γ_a e γ_b), com expressão diferenciada nos diferentes segmentos do néfron (PIHAKASKI-MAUNSBACH *et al.*, 2005) (Figura 6).

PU e colaboradores, em 2001, e ZOUZOULAS e colaboradores, em 2003, demonstraram o papel modulador da subunidade γ sobre a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ através de diferentes efeitos: (1) pelo aumento da afinidade de Na^+ pela $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ na presença de altas concentrações de K^+ ; (2) e pelo aumento da afinidade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ por ATP.

Na célula tubular renal, assim como em todo o epitélio transportador de Na^+ , a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ está exclusivamente localizada na membrana basolateral. Assim, o gradiente de Na^+ formado é dissipado através da membrana apical, resultando no transporte vetorial do íon Na^+ (SCHWARTZ *et al.*, 1974), conforme detalhado anteriormente (seção 1.2).

Trabalhos recentes, como o de PANAYIOTIDIS e colaboradores (2006), têm revelado que essa enzima tem uma função adicional de transdutora de sinais

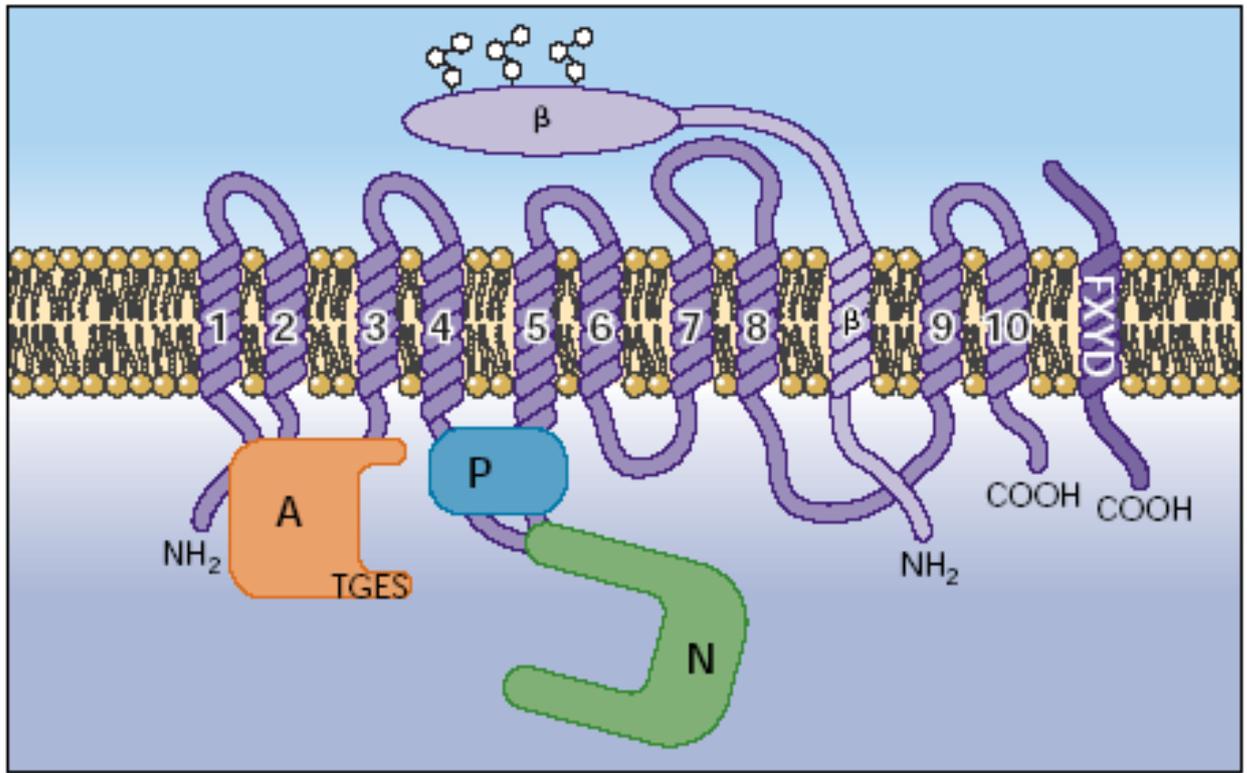


Figura 6: Modelo estrutural da (Na⁺/K⁺)ATPase.

Estrutura da (Na⁺/K⁺)ATPase evidenciando seus dez domínios transmembrana. Esta enzima é uma ATPase que forma um intermediário fosforilado do tipo acil-fosfato. A letra A representa um motivo envolvido na defosforilação. O P é o domínio catalítico de fosforilação da enzima. N é o domínio de ligação do nucleotídeo. As subunidades β e γ possuem um único domínio transmembrana (retirado de HORISBERGER, 2004).

do meio extracelular para o interior da célula, aumentando, por exemplo, o crescimento e a adesão celular e, ainda, o início do processo de apoptose. O mecanismo no qual a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ atua como uma espécie de receptor é baseado na ligação da ouabaína (inibidor da enzima) e, a partir daí, a enzima passa a ter uma interação física com outras moléculas sinalizadoras citosólicas (APERIA, 2007). De acordo com COSTA e colaboradores (2003), esse papel “secundário” da interação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ com outras proteínas pode estar relacionado com a dimerização da enzima, uma vez que foi sugerido que essas interações ocorram na subunidade α , o que justificaria a formação de dímeros na célula, ainda que estes dímeros não sejam essenciais para o transporte dos cátions na membrana. Porém, uma vez que a enzima é retirada da membrana e solubilizada, ela se apresenta como uma mistura de protômeros associados-dissociados, sendo que a relativa quantidade deles depende tanto da concentração de proteína quanto da dos ligantes. Além disso, existem evidências que mostram que a bicamada lipídica na qual a enzima está inserida também controla a interação entre os protômeros da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (MIMURA *et al.*, 1993; LOPINA, 2001).

O clássico inibidor da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, a ouabaína, inibe a bomba de Na^+ ligando-se à porção extracelular da enzima, seletivamente na sua forma fosforilada E_2P , muito provavelmente devido à posição adequada de alguns grupos importantes para a interação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ com este inibidor (KAPLAN, 2002), mas a interação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ com a ouabaína promove, além da inibição da enzima, a sua dimerização e associação com outras proteínas afetando múltiplas funções celulares como, por exemplo, a expressão gênica, a resposta imune, dentre outros (XIE & CAI 2003).

1.4 A Na^+ -ATPase

A segunda bomba de Na^+ ou Na^+ -ATPase, foi evidenciada por WHITTEMBURY & FISHMAN (1969) em fatias de rim de rato, sendo descrita mais tarde em diferentes espécies de animais, insetos, protozoários e, mesmo, em algas (WHITTEMBURY & FISHMAN, 1970; MORETTI *et al.*, 1991; CARUSO-NEVES *et al.*, 1998, 1999b, 2002; GIMMLER, 2000). Acredita-se que esta enzima possa ter antecedido a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ na escala evolutiva, devido à sua presença em eucariotos inferiores, como por exemplo a ameba, nos quais a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ está ausente (BENITO *et al.*, 1997; DE SOUZA *et al.*, 2007a).

A Na^+ -ATPase, tem o peso molecular estimado de 100 KDa, transporta Na^+ contra o gradiente eletroquímico acoplado à hidrólise do ATP de maneira dependente de Na^+ e independente de K^+ (MARÍN *et al.*, 1985). Esta enzima é insensível à ouabaína e inibida por furosemide e ácido etacrínico (CARUSO-NEVES *et al.*, 1998, 2002; GIMMLER, 2000).

Embora na ausência de K^+ e presença de 7 mM de ouabaína (inibidor da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$) ainda se encontre atividade ATPásica dependente de Na^+ na membrana basolateral de túbulo proximal de rim de rato (PROVERBIO *et al.*, 1989), o que permite concluir que haja uma segunda bomba de Na^+ , o papel da Na^+ -ATPase no transporte transepitelial é ainda questionado por alguns autores, principalmente pelo fato desta enzima ainda não ter sido clonada em mamíferos. Esta segunda bomba de Na^+ , ou Na^+ -ATPase, seria responsável por cerca de 10 % do transporte de Na^+ mediado pela $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em rins de porco. Desta forma, postula-se que a Na^+ -ATPase seja responsável pelo ajuste fino da reabsorção renal de Na^+ , estando assim envolvida na manutenção do volume intracelular (WHITTEMBURY & FISHMAN, 1970; PROVÉRPIO *et al.*, 1975; MARÍN *et al.*, 1985;

MORETTI *et al.*, 1991; GIMMLER, 2000; CARUSO-NEVES *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2007b).

O papel fisiológico da Na^+ -ATPase tem sido explorado por diferentes estudos, os quais mostram entre outras coisas que: (1) ratos alimentados com dieta rica em cloreto de Na^+ 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); (2) compostos natriuréticos inibem a atividade Na^+ -ATPásica de túbulo proximal e compostos antinatriuréticos a estimulam (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997, 1999a, 2000, 2003; RANGEL *et al.*, 1999); (3) a reabsorção de Na^+ em túbulos proximais é inibida por furosemide, inibidor da Na^+ -ATPase, como mostram experimentos realizados através de técnicas de micropunção de néfrons corticais (MALNIC *et al.*, 1969).

Assim como a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, a Na^+ -ATPase pertence à família das P-ATPases, por também formar um intermediário fosforilado durante o seu ciclo catalítico, além de ser inibida por vanadato. Estas características, além do fato dela não transportar metais pesados, permitem classificar a Na^+ -ATPase como do tipo 2 das P-ATPases transportadoras de íons (MOLLER *et al.*, 1996; DE SOUZA *et al.*, 2007b) (Figura 7).

Não são conhecidos os sítios de fosforilação por proteínas cinases, nem sítios de ligação para lipídios, já que o gene da Na^+ -ATPase ainda não foi clonado em mamíferos e a estrutura primária da proteína não foi seqüenciada. No entanto, um grande número de trabalhos mostra bioquimicamente a regulação desta enzima por cinases (PKA, PKC e PKG), hormônio (bradicinina) e autacóides (angiotensina (1-7) e angiotensina II), dentre outros sistemas de sinalização celular (CARUSO-NEVES

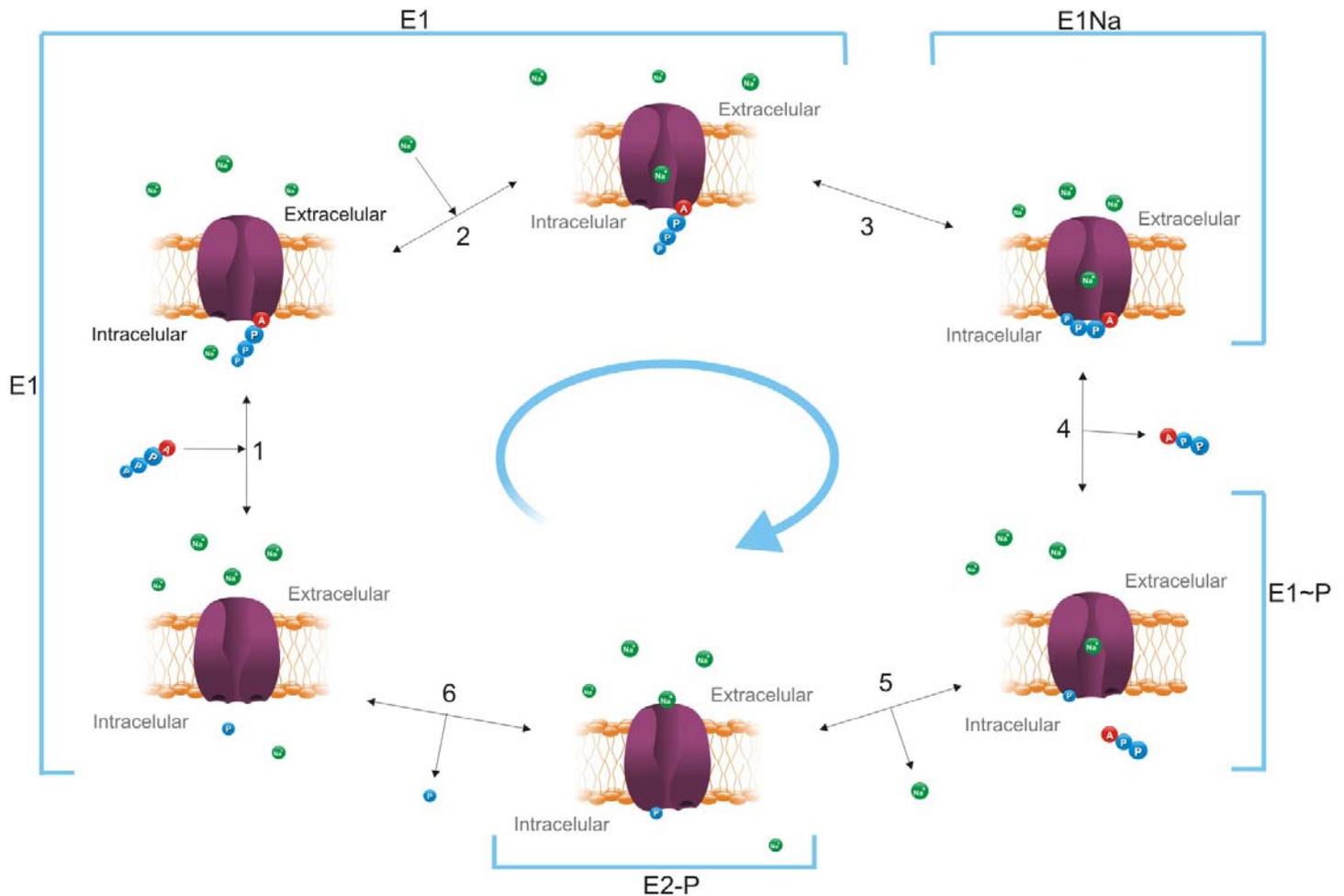


Figura 7: Proposta do ciclo catalítico da Na⁺-ATPase.

O ciclo inicial proposto para a Na⁺-ATPase consiste das etapas: 1) ligação do ATP no domínio de ligação do nucleotídeo (E1), 2) ligação do Na⁺ no domínio de ligação do íon (E1), 3) fosforilação do domínio de fosforilação por ATP (E1Na), 4) hidrólise do ATP, liberando ADP (E1~P) formando um intermediário de alta energia, 5) interconversão para um intermediário de baixa energia e pouca afinidade por Na⁺ (E₂-P), acarretando na liberação do mesmo para o meio extracelular, 6) hidrólise do intermediário é completada, liberando o Pi. A furosemide inibe a formação do intermediário fosforilado (desenhado por Daniel Viégas).

et al., 2000, 2003; RANGEL *et al.*, 2001; WENGERT *et al.*, 2007; LARA *et al.*, 2008; LÍBANO-SOARES *et al.*, 2008). Foi sugerido, por BORGATTI e colaboradores em 1985, que essa enzima, em mamíferos, teria distribuição paralela (encontrada no mesmo tecido) à da (Na⁺/K⁺)ATPase, o que justificaria a dificuldade de se isolar a Na⁺-ATPase.

1.5 Papel do entorno lipídico na atividade dos transportadores de Na⁺

As membranas biológicas definem o limite externo das células e regulam o trânsito molecular através desse limite. Nas células eucarióticas, elas também dividem o espaço interno em compartimentos distintos para separar processos metabólicos e componentes estruturais.

O conceito de como é a membrana plasmática passou por muitas mudanças. No final do século XIX, OVERTON (1899) definiu a membrana plasmática como sendo apenas uma barreira estática entre o citosol e o meio extracelular, sem definição acerca de sua estrutura. Já em 1925, GORTER & GREDEL evidenciaram que a membrana celular era uma bicamada lipídica. Em 1935, DANIELLI & DAVSON sistematizaram e organizaram os resultados de diferentes autores a respeito da composição e da organização da membrana plasmática, obtidos desde 1920 até o início dos anos 30, revelando a existência não somente de lipídios mas também de proteínas na superfície celular. No início da década de 70, SINGER e NICOLSON (1972) propuseram um modelo no qual a membrana plasmática seria composta não apenas de diferentes classes de lipídios, mas também de diferentes proteínas imersas na matriz lipídica. Assim, a membrana seria como um mosaico de diferentes tipos de proteínas e lipídios com alto grau de fluidez, em condições fisiológicas e,

por isso, passou a ser chamado de “Modelo do Mosaico Fluido”, sendo este modelo aceito até os dias de hoje.

Já é descrito na literatura que alguns lipídios apresentam um papel chave no processo de regulação da dinâmica da membrana. Por exemplo, foi demonstrado que proporções muito baixas de lipídios mensageiros como ceramidas, diacilglicerol, alguns tipos de ácidos graxos, esfingolípídeos, glicolípídeos e seus produtos metabólicos causam mudanças de organização molecular de interfaces mistas com fosfolípídeos. Isto se pode ampliar a níveis supramoleculares e induzir mudanças topológicas que afetam a formação de domínios segregados de diferentes estados de fase, espessura e curvatura interfacial que podem participar na transdução de sinal mediada por fosfolipase A2 (PLA2), fosfolipase C (PLC) e esfingomilelinases (BORIOLI *et al.*, 2002; MAGGIO *et al.*, 2002, 2006; NOLAN *et al.*, 2003).

Um fato importante a ser destacado é que a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase pode ser ativada por gangliosídeos e outros glicoesfingolípídeos que, em pequenas proporções, induzem mudanças consideráveis do estado mesomórfico e topológico dos fosfolípídeos nas biomembranas (CAPUTTO *et al.*, 1977; LEON *et al.*, 1981; MAGGIO, 1994).

Dentre os lipídios já descritos como envolvidos na regulação do transporte de Na⁺ – transporte este alvo de estudo desta tese de doutorado - estão: colesterol, fosfolípídeos e glicoesfingolípídeos. Foi visto que o colesterol (molécula lipídica com uma estrutura característica de quatro anéis esteróides e componente importante da membrana plasmática das células animais) e a fosfatidilcolina (fosfolípídeo predominante na membrana plasmática de várias células de mamíferos) juntos, interagem diretamente com os segmentos transmembrana hidrofóbicos das duas

bombas de Na^+ , aumentando a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ (CORNELIUS, 2001, 2008; CORNELIUS *et al.*, 2003).

Além da fosfatidilcolina, o fosfatidilinositol-4-fosfato (um dos principais fosfoinosítídeos) também é descrito por modular P-ATPases, como a SERCA de músculo esquelético e a PMCA em rim, levando ao aumento da atividade das bombas de Ca^{2+} (STARLING *et al.*, 1995; GUILHERME *et al.*, 1998).

1.6 Os esfingolipídios

Nomeados por THUDICHUM em 1884, os esfingolipídios eram tidos apenas como constituintes de membrana, mas desde há cerca de duas décadas vêm sendo considerados importantes moléculas sinalizadoras, capazes de modular lipases, cinases, fosfatases e ATPases (HOLTHUIS *et al.*, 2001; COLOMBAIONI & GARCIA-GIL, 2004; FUTERMAN & HANNUN, 2004; GOMEZ-MUÑOZ, 2004; CABRAL *et al.*, 2007).

O representante mais conhecido dos esfingolipídios é a esfingomielina (SM), abundante em células do sistema nervoso central de mamíferos (SHAYMAN, 2000). Os esfingolipídios são, por definição, componentes que contêm uma base esfingóide, ou seja, uma longa cadeia de amino álcool com a esterificação de um ácido graxo no carbono C-1, sendo esta a estrutura molecular da esfingosina (Sph) (esfingolipídio mais simples). Com a ligação de um ácido graxo no carbono C-2 do amino álcool, há a formação da ceramida (Cer). A SM possui como estrutura básica, a Cer, tendo no carbono C-3 a ligação de um grupamento fosfato e de uma colina (Figura 8).

A Cer está envolvida em eventos de sinalização celular, com diversos efeitos celulares, tais como: proliferação, sobrevivência celular, diferenciação, apoptose, etc

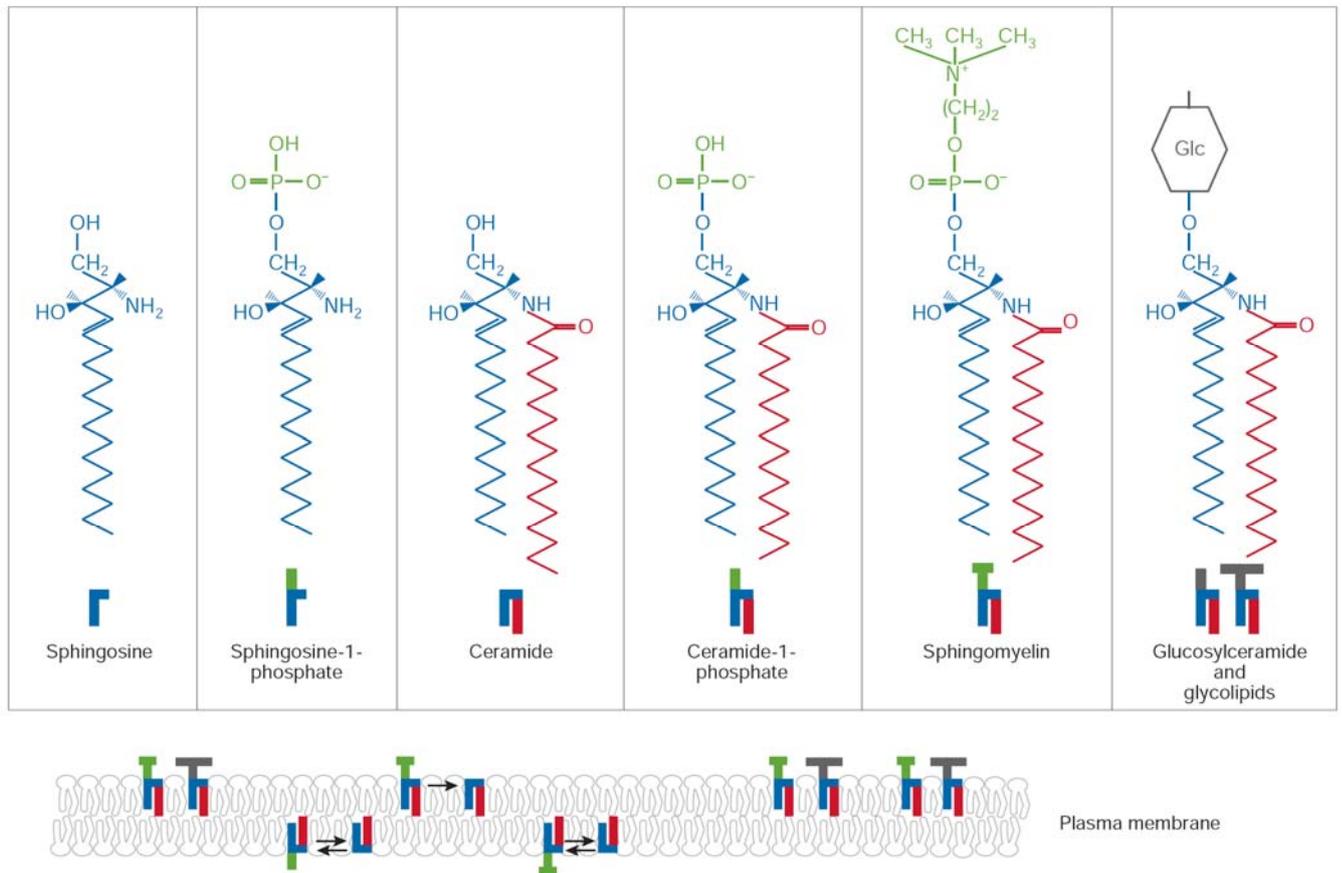


Figura 8. Principais esfingolípídios.

Os esfingolípídios possuem uma base esfingóide (azul), e com a ligação de um ácido graxo no carbono C-2, há a formação de ceramida, sendo seu produto fosforilado, a ceramida-1P, com a ligação de um grupamento fosfato no carbono C-3. A esfingomielinina possui como estrutura básica a ceramida mais a ligação de um grupamento fosfato e de uma colina (retirado de FUTERMAN & HANNUN, 2004).

(FUTERMAN & HANUNN, 2004; SNOOK *et al.*, 2006), envolvendo modulação de fosfatases (PP1A e PP2A), cinases (PKA e PKC), fosfolipase (PLD) e Ras (CHALFANT *et al.*, 1999; RUVOLO, 2003; GOMEZ-MUÑOZ, 2004; CABRAL *et al.*, 2007), ações celulares estas que dependem do tamanho da cadeia de hidrocarboneto da Cer e do tipo celular estudado.

A ceramida-1P (C1P), produto fosforilado da Cer, é igualmente relacionada a diferentes e importantes efeitos celulares, por exemplo, bloqueia a apoptose, aumenta a fagocitose, é mediadora de respostas inflamatórias e é mitogênica, além de modular cinases (PKA, PKC, ERK e PI3K), lipases (PLD e cPLA₂ alfa) e inibir esfingomielinases ácidas (GOMEZ-MUÑOZ, 2004; PETTUS *et al.*, 2004).

Além de sua ação como molécula sinalizadora, a Cer participa decisivamente da organização de microdomínios regulatórios presentes nas membranas plasmáticas, chamados de *rafts* ou plataformas sinalizadoras, que são enriquecidos em esfingolípídios e colesterol (SIMONS & IKONEN, 1997). Esses microdomínios lipídicos, concentrariam elementos envolvidos em cascatas de sinalização celular, aumentando a eficiência da resposta celular (SIMONS & IKONEN, 1997).

A geração de moléculas de Cer leva a mudanças significativas na organização da membrana plasmática com maior formação de pequenos microdomínios ricos em Cer, os quais são capazes de se unir espontaneamente a outros microdomínios, resultando assim nas chamadas plataformas sinalizadoras (HOLOPAINEN *et al.*, 1998; KOLESNICK *et al.*, 2000; NURMINEN *et al.*, 2002). Desta maneira, microdomínios ricos em Cer desempenham a importante função de facilitar e amplificar processos de sinalização via diferentes tipos de receptores celulares, resultando na ativação de uma maquinaria celular que tem como produto final a resposta celular (BOLLINGER *et al.*, 2005).

TORTELOTE e colaboradores, em 2004, mostraram a presença exclusiva da PMCA em microdomínios ricos em caveolina denominados cavéolas, onde esta ATPase está ativa e é regulada por lipídios característicos de *rafts*, como a Cer (CABRAL *et al.*, 2007). A existência de poucas cópias da PMCA na membrana basolateral e sua localização exclusiva em cavéolas, faz desses microdomínios lipídicos, importantes plataformas sinalizadoras, implicando em um vigoroso controle da atividade da enzima e da concentração intracelular de Ca^{2+} (TORTELOTE *et al.*, 2004).

A associação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ com cavéolas/*rafts* já foi evidenciada por LIU e colaboradores em 2003. Entretanto, por existirem muito mais cópias de $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ do que de PMCA, é possível se propor que existam “pools” de $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ encontrados em microdomínios lipídicos e “pools” fora desses microdomínios. Como a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ ainda não foi clonada em mamíferos, ainda não existe anticorpo contra a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, mas por ela apresentar 1 décimo da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em rins de porco, postula-se que, assim como a PMCA, a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ apresente menos cópias do que a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, podendo estar localizada também exclusivamente em cavéolas/*rafts*, que são microdomínios ricos em ceramidas, o que aumenta o interesse no estudo da regulação da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$. Com base nessas informações, decidimos investigar os efeitos de Cer e C1P sobre as duas bombas de Na^+ presentes na membrana basolateral: $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ e $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, e pesquisar qual via de sinalização estaria envolvida na possível modulação dessas bombas de Na^+ por ceramidas.

1.7 Geração de esfingolipídios bioativos

Existem duas vias principais de geração de ceramidas:

1- A síntese *de novo*, que se inicia com a condensação da serina com o palmitoil-CoA, resultando na 3-cetodihidroesfingosina. Posteriormente há uma redução seguida de N-acilação resultando na formação da diidroceramida. A introdução de dupla ligação entre os carbonos 4-5 resulta na formação da Cer. A Cer é então convertida a glicosfingolípídios complexos e SM no complexo de Golgi (SNOOK *et al.*, 2006). Pelo fato da Cer ser uma molécula hidrofóbica, a transferência dela do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, e posteriormente para a membrana plasmática, ocorre através de uma proteína específica chamada de proteína transportadora de Cer (CERT), já identificada em diferentes organismos (SNOOK *et al.*, 2006).

2- A Cer também pode ser formada através da ação de esfingomielinases (SMase) que agem sobre a SM, gerando Cer e fosfocolina (Figura 9).

A SM é o lipídio mais abundante presente na membrana apical de células de túbulo proximal renal (estando também presente na membrana basolateral), sendo encontrada preferencialmente na face externa da bicamada lipídica formando interações hidrofóbicas com o colesterol e conferindo a essas membranas menor fluidez (SNOOK *et al.*, 2006).

Sabe-se que mudanças na fluidez e/ou na composição lipídica da membrana plasmática afetam a atividade de co-transportadores presentes na membrana apical. A degradação da SM inibe os co-transportadores Na^+ /glicose e Na^+ /Pi presentes na membrana apical de células epiteliais renais, independentemente de alterações na fluidez da membrana (VRTOVSNIK *et al.*, 1992).

Como mencionado anteriormente, a Cer deflagra diversas respostas celulares (RUVOLO, 2003; GOMEZ-MUÑOZ, 2004), o que levou alguns autores a considerarem a via de geração de Cer a partir de SM responsável por danos

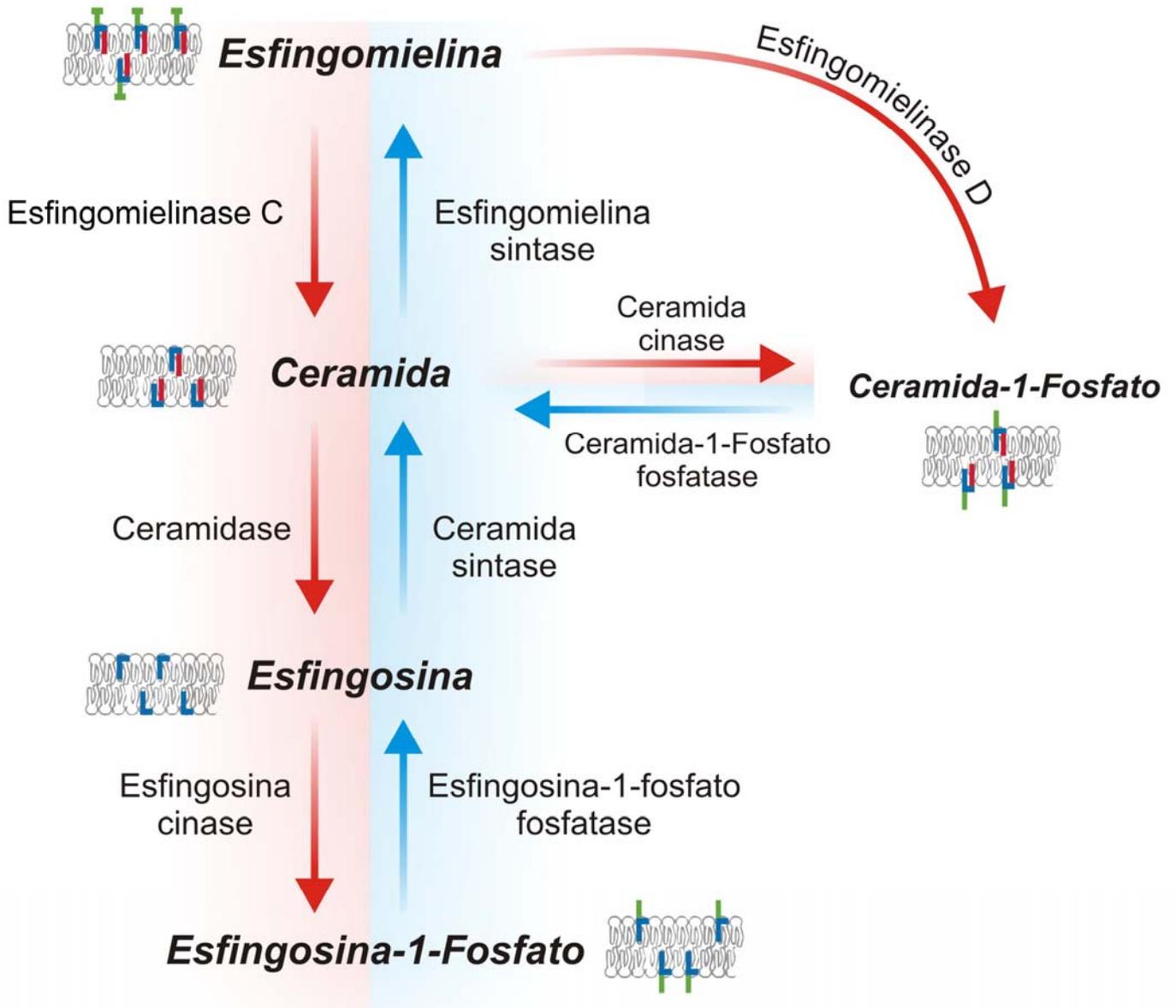


Figura 9: Geração de ceramidas.

Existem duas vias principais de geração de ceramidas. A figura 9 mostra a geração de ceramidas através da ação da esfingomielinase sobre a esfingomielina. Sendo que a ceramida pode ser gerada pela ação de uma ceramida-1P fosfatase, por uma cerebrosidase (glucosilceramida), por uma ceramida sintase (esfingosina + acil CoA) e pela reação reversa da ceramidase. A ceramida, por sua vez, pode ser fosforilada por uma ceramida cinase, formando ceramida-1P (desenhado por Daniel Viégas).

celulares e tissulares como aqueles induzidos por isquemia ou injúria renal. Nestes casos, a explicação para a acumulação de Cer durante o estresse fisiológico seria a ativação de SMases, tendo a geração de Cer pela síntese *de novo* menor contribuição neste processo (KOLESNICK & KRÖNKE, 1998; ZAGER *et al.*, 1998; ZAGER, 2000; ANDRIEU-ABADIE *et al.*, 2001).

1.7.1 As esfingomielinases

As SMases já são bem conhecidas há muitos anos (BARENHOLZ *et al.*, 1966), mas nas últimas décadas despertaram maior interesse dos pesquisadores, principalmente depois da descoberta do importante papel da SM e de seu metabólito, a Cer, em vias de transdução de sinal. A ativação de SMases é provavelmente o principal evento gerador de Cer nas células já estudadas, entretanto este evento gerador de Cer é ainda um ponto de discussão entre os autores (GOÑI & ALONSO, 2002; MARCHESINI & HANNUN, 2004).

As SMases são classificadas de acordo com a posição da ligação do carbono com o hidrogênio, onde promovem a hidrólise. Duas classes de SMases foram identificadas: SMase C e SMase D. As SMases C clivam SM, produzem Cer e fosfocolina, são as SMases mais comuns e são subclassificadas de acordo com seu pH ótimo: ácidas (localizadas na membrana externa da bicamada lipídica, com um pH ótimo entre 4,5 e 5,5), neutras (localizadas na membrana interna da bicamada lipídica, dependentes ou independentes de Mg^{2+} , com um pH ótimo de 7,4) e alcalinas. As SMases D são menos comuns e estudadas, e produzem C1P e colina, podendo ser subclassificadas em: bacteriana e secretória (MARCHESINI & HANNUN, 2004; SNOOK *et al.*, 2006).

Além de inibidores fisiológicos de SMases, como a glutationa, inibidores farmacológicos, tais como, scifostatina e xantona α -mangostina também já foram testados (GOÑI & ALONSO, 2002). Dentre os ativadores para SMases já foram identificados, alguns agentes extracelulares como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e estresse mecânico e oxidativo (LEVADE & JAFFRÉZOU, 1999).

1.7.2 A ceramida cinase

Há pouco mais de uma década, foi sugerido que a Cer poderia ser fosforilada por uma ceramida cinase (CerK), cessando assim a sinalização celular disparada pela Cer. Mais tarde, foi descoberto que a fosforilação de Cer por CerK resulta em outro esfingolípido bioativo, a C1P, com funções diferenciadas dependendo do tipo celular em questão, levando a respostas celulares opostas às da Cer, como por exemplo, anti-apoptose (FUTERMAN & HANUNN, 2004; SNOOK *et al.*, 2006).

A CerK só foi clonada em 2002 por SUGIURA e colaboradores, o que pode explicar a pouca literatura ainda existente sobre a atividade desta enzima. Com isso, existem muitos questionamentos sobre a enzima CerK, como por exemplo, de que maneira ela é regulada? É alvo de cinases? Estudo recente de MITSUTAKE & IGARASHI (2005) sugere que a Ca^{2+} /calmodulina cinase ativa a CerK, já que esta é dependente de Ca^{2+} . Esta dependência de Ca^{2+} também é evidenciada em células de epitélio cardíaco, que quando tratadas com ionóforo de Ca^{2+} (A23187) apresentam maior formação de C1P (PETTUS *et al.*, 2003; MITSUTAKE *et al.*, 2004).

Foi observada maior expressão de CerK em coração, cérebro, músculo esquelético, fígado e rins. Também foi verificada uma alta similaridade da região

catalítica da CerK com a da esfingosina cinase (SUGIURA *et al.*, 2002), lipídiocinase envolvida no balanço de outros dois esfingolipídios bioativos, Sph e esfingosina-1P (S1P).

BORNANCIN e colaboradores, em 2005, além de mostrarem a ativação da expressão e da atividade da CerK por PMA (éster de forbol - clássico ativador de PKC) (BAUMRUKER *et al.*, 2005), identificaram um novo homólogo de CerK, designado ceramida cinase-like protein (CERKL). No entanto, a Cer com diferentes tamanhos de cadeia de hidrocarbonetos, que são substratos para CerK, não foram fosforiladas por CERKL *in vitro*.

A necessidade de caracterizar a atividade da CerK, enzima responsável pela modulação dos níveis de dois importantes esfingolipídios bioativos em mamíferos, Cer e C1P, tornou-se de nosso interesse, já que o balanço na formação e degradação destes dois esfingolipídios leva a importantes respostas celulares, como já mencionado (GOMEZ-MUÑOZ, 2004), evidenciando que provavelmente, Cer e C1P tenham ações antagônicas nas células. Isto levanta a pergunta: teriam a Cer e a C1P também ações antagônicas sobre a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$? Além disso, uma vez demonstrada a presença de sistemas de geração de Cer e C1P na membrana basolateral, qual seria a relevância fisiológica desta via envolvendo esfingolipídios bioativos e transporte de Na^+ ?

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi:

Investigar a possível modulação das ATPases transportadoras de Na^+ por Cer e C1P, e a geração destes esfingolipídios na membrana basolateral de túbulos proximais renais.

Os objetivos operacionais desta tese foram:

1. Verificar se a Cer e a C1P são capazes de modular a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ e da $\text{Na}^+-\text{ATPase}$. Se estes efeitos forem comprovados, identificar se são dose-dependentes.
2. Identificar os componentes da via de sinalização envolvidos na possível regulação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ e da $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ por Cer e C1P.
3. Identificar a presença de SMases na membrana basolateral, usando anticorpos específicos contra SMases já descritas.
4. Pesquisar a presença e caracterizar a atividade de uma CerK na membrana basolateral de túbulos proximais renais, a partir da quantificação da formação de C1P.
5. Investigar o papel de hormônios e autacóides com ação renal sobre a geração de Cer e C1P.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

ATP, ouabaína, sacarose, EDTA, PMSF, inibidor de tripsina, Bis-Tris Propano, Hepes, Tris, AMPc, calfofina C, PMA, peptídeo inibidor de PKA (5-22), Cer , C1P e Histona H8 foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Percoll foi comprado da GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Os solventes orgânicos e as cromatoplasmas foram adquiridos da Merck (Resende, Brasil). Todos os outros reagentes foram da mais alta pureza disponível. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada do Sistema Milli-Q de resinas (Millipore Corp., Marlborough, MA). [$^{32}\text{P}_i$] foi obtido do Instituto Brasileiro de Energia e Pesquisas Nucleares (IPEN) em São Paulo, Brasil. Os anticorpos para SMases ácidas e neutras, e para as diferentes isoformas de PKC foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Membrana de nitrocelulose (Hybond) e Kit ECLTM foram comprados da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Filme X-OmatTM foi obtido da Eastman Kodak Co. (Resende, Brasil), assim como as soluções de revelação e fixadores dos filmes de raio-X.

3.2 Isolamento da membrana basolateral

As preparações de córtex renal (homogeneizado e de membrana basolateral de túbulo proximal) foram feitas a partir de rins de porcos adultos. Os rins foram removidos imediatamente após a morte dos animais e mantidos em solução gelada contendo: sacarose 250 mM, HEPES-Tris (pH 7,6) 10 mM, EDTA 2 mM e PMSF 1 mM. Fatias bem finas de córtex externo foram removidas com bisturi e, após a

dissecção, as fatias foram homogeneizadas na mesma solução com uso de um homogeneizador do tipo *potter*.

O homogeneizado foi centrifugado a 1.500 g, por 10 minutos, a 4° C, na centrífuga Sorvall SCR20B, usando o rotor RPR12-2 (Hitachi). Após a centrifugação descartou-se o precipitado, composto por células inteiras e núcleos, e o homogeneizado foi coletado. Uma alíquota foi separada e estocada a -4° C para alguns ensaios e controles posteriores. O restante sofreu uma série de centrifugações para o isolamento da membrana basolateral. Inicialmente, o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 44 minutos, a 4° C, em ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 45Ti. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e, utilizando 6 ml de solução II (sacarose 250 mM, HEPES-Tris 10 mM (pH 7,6), PMSF 1 mM e inibidor de tripsina tipo II-S Soybean 0,15 mg/ml) por tubo, coletou-se apenas a camada superficial do precipitado, que corresponde à fração microssomal (fração que contém todos os tipos de membranas). Logo após, utilizando um gradiente de Percoll (concentração final 12 % v/v), a fração microssomal foi centrifugada a 40.000 g, por 1 hora, a 4° C, em ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 70Ti, para a formação do gradiente de densidade de Percoll e conseqüente separação das diferentes frações de membranas contidas na fração microssomal (BOUMENDIL-PODEVIN & PODEVIN, 1983). A fração correspondente à membrana basolateral foi, então, recolhida de cada tubo e homogeneizada com homogeneizador do tipo *potter* e centrifugada a 200.000 g, por 1 hora, a 4° C, em ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 90Ti para a sedimentação do Percoll. A preparação de membrana foi ressuspensa em sacarose 250 mM, numa concentração final de aproximadamente 25 mg ptn x ml⁻¹, e estocada em nitrogênio líquido para a maior preservação das frações de membrana. A

determinação da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, um marcador da membrana basolateral, é sempre usada como controle da purificação, e fica em torno de $220,6 \pm 20,3 \text{ nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, correspondente a um enriquecimento de ± 8 vezes, quando comparada à atividade medida em homogeneizado total de córtex renal.

3.3 Preparação de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

A marcação de ATP com ^{32}Pi na posição γ foi realizada como descrito por MAIA *et al.* (1983). Resumidamente, o procedimento consiste em promover a ligação covalente de ^{32}Pi (ortofosfato radioativo) ao ADP, formando assim $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Para isso, são montadas *in vitro* duas reações sucessivas da via glicolítica: a de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, com fosforilação concomitante por ^{32}Pi no seu carbono 1, formando 1,3-difosfoglicerato, e a de transferência da fosforila marcada deste último composto para o ADP. As concentrações dos reagentes e das enzimas envolvidas (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e fosfoglicerato cinase) foram escolhidas para garantir o deslocamento das reações (que envolvem pequenas variações de ΔG°) no sentido favorável à formação de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

3.4 Dosagem de proteína

A concentração de proteína das preparações de membrana basolateral foram determinadas pelo método de Folin fenol (LOWRY, 1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

3.5 Determinação da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ da membrana basolateral

A atividade $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPásica}$ foi determinada colorimetricamente dosando-se o fosfato inorgânico (Pi), resultante da hidrólise do ATP. Foi utilizado um meio de

ensaio (1 ml) contendo: Bis-Tris propano 50 mM (pH 7,4), EDTA 0,2 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 120 mM e concentrações de Cer ou C1P indicadas na abscissa da figura 10. Depois das amostras serem pré-incubadas a 37° C, por 10 minutos, na presença de 0,1 mg x ml⁻¹ de proteína, foram adicionados KCl 24 mM e ATP 5 mM (pH 7,0) para iniciar a reação. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 ml de carvão ativado (0,17 g x ml⁻¹) com HCl 0,1 N para adsorção do ATP não hidrolisado, ainda presente na solução. As amostras foram imediatamente centrifugadas em centrífuga Spin VI (Incibrás), a 1.900 g, por 5 minutos. Alíquotas de 0,5 ml dos sobrenadantes foram retiradas e o Pi determinado colorimetricamente pelo método descrito por TAUSSKY & SHORR (1952).

A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase foi calculada pela diferença entre as atividades medidas com e sem 1 mM ouabaína (inibidor da (Na⁺/K⁺)ATPase).

3.6 Determinação da atividade da Na⁺-ATPase da membrana basolateral

Para investigar os efeitos de Cer e C1P sobre a atividade da Na⁺-ATPase da membrana basolateral foi utilizado o método descrito por GRUBMEYER & PENEFSKY (1981). A composição do meio de ensaio (0,1 ml) foi: MgCl₂ 10 mM, [γ -³²P]ATP 2.000 cpm/nmol, HEPES-Tris 20mM (pH 7,0), NaCl 6 mM, ATP-Na⁺ 5 mM (pH 7,0), ouabaína 1 mM, concentrações de Cer ou C1P indicadas na abscissa da figura 11 e, quando indicado, na presença de 10 nM de calfofostina C (inibidor de PKC) ou 10 nM de PKAi (peptídeo 5-22 inibidor de PKA). A reação foi iniciada com a adição da fração enriquecida da membrana basolateral de forma que a concentração final da proteína na reação fosse 0,3 mg x ml⁻¹. Após 20 minutos, a reação foi parada pela adição de 0,5 ml de carvão ativado (0,17 g x ml⁻¹) em HCl 0,1 N. Desta forma o [γ -³²P]ATP não hidrolisado é adsorvido ao carvão ativado e precipitado quando as

amostras são centrifugadas a 1.900 g durante 5 minutos em centrífuga Fanem modelo Excelsa Baby II (São Paulo, Brasil). Alíquotas de 0,5 ml do sobrenadante contendo o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ resultante da hidrólise do nucleotídeo radiomarcado foram retiradas e transferidas para tiras de papel de filtro com dimensões de 7,0 x 2,5 cm. Secos, os papéis foram transferidos para *vials* contendo líquido de cintilação composto por uma solução de tolueno contendo 200 mg x L⁻¹ de POPOP (1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]-benzeno;2,2'-p-fenileno-bis[5-feniloxazol]) e, então, lidos em contador de cintilação líquida Packard Tri-carb modelo A2100 TR (Illinois, USA).

A atividade da Na⁺-ATPase foi calculada pela diferença entre a quantidade de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ resultante da hidrólise do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ obtidas na ausência e na presença de 2 mM furosemide, inibidor específico desta enzima (DEL CASTILLO *et al.*, 1982; PROVERBIO *et al.*, 1986) e, nos dois casos, na presença de ouabaína 1 mM.

3.7 Medida da atividade de PKC

A atividade de PKC em membrana basolateral isolada foi medida pela incorporação de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ às histonas. A reação, com volume final 0,1 ml, foi iniciada com a adição de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 15.000 cpm/nmol. A composição do meio de reação foi: MgCl₂ 4 mM, HEPES-Tris (pH 7,0) 20 mM, 1,5 mg x ml⁻¹ de histona, 0,7 mg x ml⁻¹ de proteína e Cer (200 nM) ou C1P (100 nM). Após 10 minutos, a 37° C, a reação foi parada com a adição de 0,1 ml TCA 40% e imediatamente colocada em gelo até a filtração em filtros Millipore (0,45 µm). Os filtros foram lavados com solução gelada de TCA 20% (3 ml) e tampão fosfato 2 mM (pH 7,0) (4 ml).

As histonas foram utilizadas com substrato para a proteína cinase. A radioatividade incorporada às histonas foi quantificada através da contagem dos filtros por cintilação líquida em contador de cintilação Packard Tri-Carb 2100 TR. A

atividade de PKC foi calculada pela diferença de incorporação da fosforila γ -terminal do [γ - 32 P]ATP às histonas, na presença e na ausência do inibidor de PKC (calfostina C).

3.8 Medida da atividade de PKA

Para medida da atividade da PKA, a reação, com volume final 0,1 ml, foi iniciada com a adição de [γ - 32 P]ATP 15.000 cpm/nmol. A composição do meio de reação foi: MgCl₂ 4 mM, HEPES-Tris (pH 7,0) 20 mM, 1,5 mg x ml⁻¹ de histona, 0,7 mg x ml⁻¹ de proteína e Cer (200 nM) ou C1P (100 nM). Após 10 minutos a 37° C, a reação foi parada com a adição de 0,1 ml de TCA 40% e imediatamente colocada em gelo até a filtração em filtros Millipore (0,45 μ m). Os filtros foram lavados com solução de TCA 20% (3 ml) e tampão fosfato 2 mM (pH 7,0) (4 ml). A radioatividade incorporada foi quantificada através da contagem de cintilação líquida dos filtros com histonas em contador de cintilação Packard Tri-Carb 2100 TR.

As histonas foram utilizadas com substrato para a proteína cinase. A atividade de PKA em membrana basolateral isolada foi medida pela incorporação da fosforila γ -terminal do [γ - 32 P]ATP às histonas, na presença e ausência do peptídeo (5-22) inibidor de PKA (PKAi).

3.9 Ensaio de fosforilação e extração de lipídios da membrana basolateral

Os fosfolipídios totais foram extraídos da membrana basolateral isolada utilizando o método descrito por BEKTAS *et al.* (2003), que inicia-se com a membrana isolada (0,2 mg de proteína final) incubada por 20 minutos a 37°C em um meio de reação (0,5 ml) contendo: [γ - 32 P]ATP 10⁸ cpm, MOPS-Tris 20 mM (pH 7,2),

NaCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 2 mM, CaCl₂ 3 mM, NaF 10 mM, MgCl₂ 100 mM, ATP-Na⁺ 1 mM e, quando indicado, foi adicionada Cer.

A reação foi parada com 8,6 ml de uma solução de clorofórmio: metanol (1:1 v/v) e, em seguida, foi adicionado 3,6 ml de MOPS-KCl (1M). As fases foram separadas por centrifugação a 1.000 g por 10 minutos em temperatura ambiente. A fase orgânica (inferior) foi transferida para um novo tubo e o solvente foi evaporado em nitrogênio.

3.10 Separação e identificação dos lipídios

Os lipídios extraídos foram separados e analisados por cromatografia em camada fina (TLC) com corrida unidimensional em cromatoplas de sílica gel (60 F254, Merck), usando um sistema de solvente contendo clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água (10:4:3:2:1 v/v) (BEKTAS *et al.*, 2003). As cromatoplas foram previamente ativadas a 110 °C por 10 min e, em seguida, todo o volume do extrato lipídico foi aplicado, juntamente com lipídios padrões. Após a corrida e a evaporação completa dos solventes, um filme para raio-X (Kodak X-Omat™) ou o “phosphor screen” (PhosphorImager Storm 860 - Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA) foi exposto à cromatoplas. Após 48 horas aproximadamente, o filme ou o phosphor screen foi revelado e a cromatoplas exposta a vapores de iodo para a visualização dos lipídios, possibilitando determinar a mobilidade relativa de cada lipídio da amostra e do padrão de C1P (10 µg) aplicados. As áreas correspondentes a C1P foram marcadas na cromatoplas, sobrepondo-as com as do seu respectivo autorradiograma.

Para a quantificação da radiação presente na C1P marcada, a sílica da região da cromatoplas contendo o lipídio radioativo foi cuidadosamente raspada com

bisturi e colocada diretamente em *vials*, contendo solução cintiladora composta por tolueno contendo 200 mg/L de POPOP (1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]-benzeno;2,2'-p-fenileno-bis[5-feniloxazol]). A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Packard Tri-Carb 2100 TR e, calculada a partir dos nanomoles de Pi utilizados na reação.

3.11 SDS-PAGE e imunodeteção

As proteínas presentes no homogenato total e na fração de membrana basolateral foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond), incubadas por 1 hora com leite 5 % diluído em TBS 1X (pH 7,6) (Tris 20 mM, NaCl 137 mM) – para bloqueio de ligações inespecíficas - e incubadas com os anticorpos anti-goat para SMases ácidas ou neutras (Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)) e, para as diferentes isoformas de PKC com o anticorpo anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)). O anticorpo primário foi incubado com a membrana de nitrocelulose por 1 hora, sendo esta lavada com TBS 1X, 3 vezes por 5 minutos. Após a lavagem da membrana, ela foi incubada com o anticorpo secundário (ECL™ Peroxidase labelled) por 1 hora. A partir daí detectamos a proteína utilizando o sistema ECL™ e o filme X-Omat™.

3.12 Análise estatística

Quando indicado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SPSS 8.0. Quando foram observadas diferenças significativas entre as médias, utilizou-se o teste de Bonferroni com $p \leq 0,05$ (nível de confiança). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rins são os órgãos responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluido extracelular do indivíduo dentro dos limites fisiológicos compatíveis com a vida, sendo o túbulo proximal renal, o segmento do néfron (unidade funcional do rim) onde ocorre a maior parte da reabsorção ativa de íons e solutos, dentre os quais o Na^+ aparece como o principal íon, estabelecendo gradientes osmóticos, através do epitélio tubular (MELLO-AIRES, 1999).

As membranas basolaterais do túbulo proximal renal possuem as duas ATPases transportadoras de Na^+ ($(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ e a $\text{Na}^+-\text{ATPase}$) já descritas nesta tese, responsáveis pelo transporte deste íon para o meio extracelular. A $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ é a enzima fundamental na reabsorção de Na^+ em massa, e responsável pela geração do gradiente eletroquímico de Na^+ favorável à entrada do íon pela membrana apical, permitindo que diferentes transportadores ativos secundários transportem solutos tais como glicose, aminoácidos, próton e solutos orgânicos (SELDIN & GEIBISCH, 1992).

O estudo da possível modulação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ pelos esfingolípídios bioativos (Cer e C1P) em mamíferos tornou-se alvo de nosso interesse, devido: (1) à importância da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em gerar o gradiente eletroquímico de Na^+ , como mencionado acima; (2) à atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ poder ser afetada por gangliosídeos e glicosfingolípídios; (3) além de sua associação com cavéolas/rafts, sendo possível se propor que existam “pools” de $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ encontrados em microdomínios lipídicos e “pools” fora desses microdomínios, já que existem muito mais cópias de $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ do que de PMCA, sendo que esta última foi

encontrada exclusivamente e ativa em cavéolas, em estudo anterior de nosso grupo (TORTELOTE *et al.*, 2004).

Nosso primeiro objetivo foi avaliar a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ na presença de concentrações crescentes de Cer e C1P. A modulação da enzima pelos esfingolipídios estudados não foi observada (Figura 10A e 10B). Buscamos então, dados da literatura que confirmassem nosso achado e, vimos que compostos natriuréticos e anti-natriuréticos como bradicinina e angiotensina II, respectivamente, não modulam a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ de membrana basolateral de túbulos proximais renais (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999; RANGEL *et al.*, 1999), além de APERIA e colaboradores, em 1994, mostrarem a necessidade de cascatas intracelulares para haver a modulação da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ presente no túbulo proximal de rins de rato, sendo então necessário o estudo da modulação desta enzima em cultura de células. Assim, o fato de no nosso modelo - membranas isoladas - não observarmos efeito de Cer e C1P na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, não significa que em célula intacta estes esfingolipídios não tenham efeito sobre esta ATPase.

Tivemos o interesse de pesquisar a possível modulação da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ por ceramidas, devido: (1) à distribuição da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ ser paralela à da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$; (2) à possível localização da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em microdomínios lipídicos ricos em ceramidas; (3) à um grande conjunto de dados indicar que a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ possa ser responsável pelo ajuste fino da reabsorção renal de Na^+ no túbulo proximal (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997, 1999a, 2000; RANGEL *et al.*, 1999, 2002).

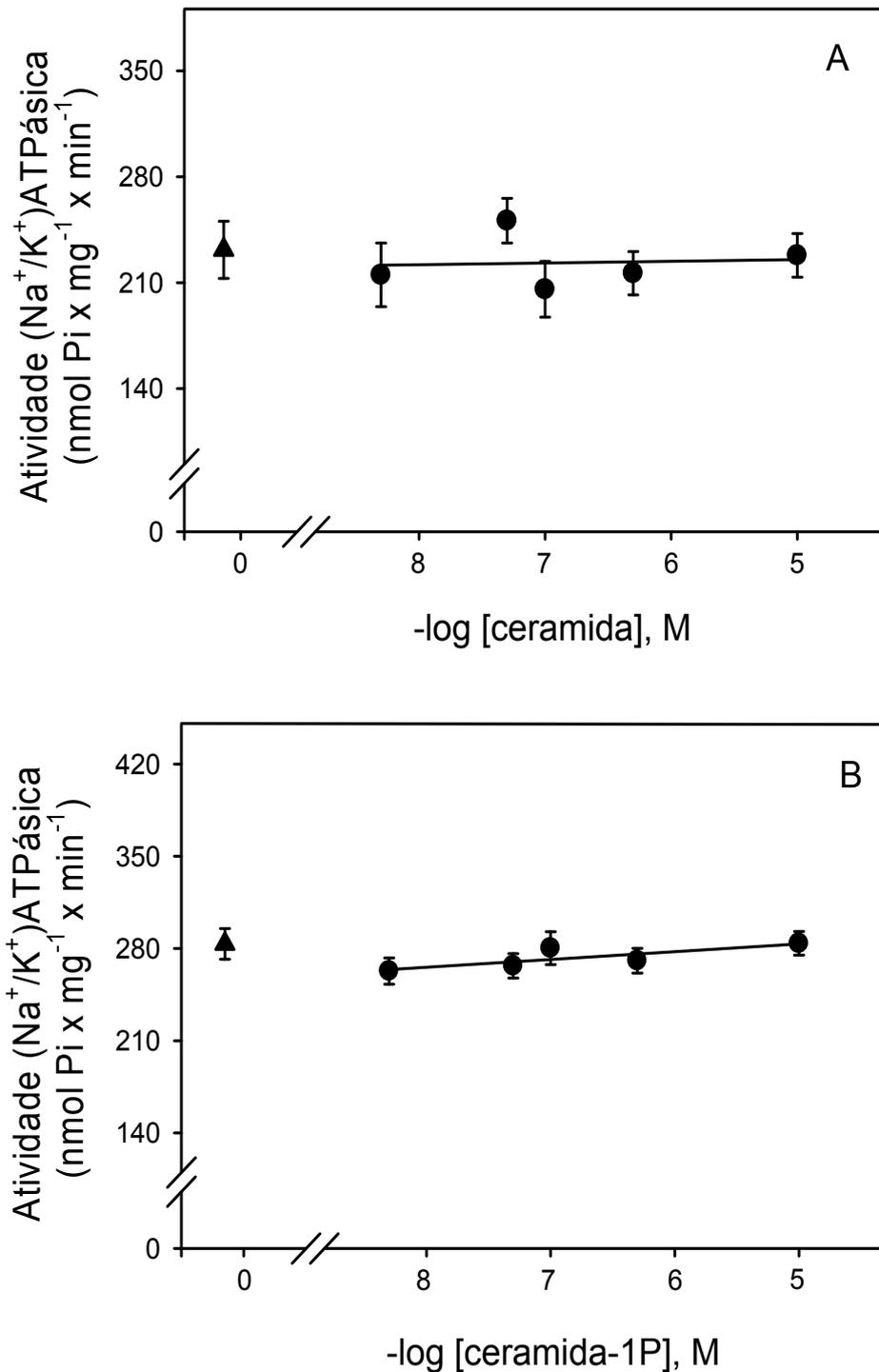


Figura 10. Cer (A) e C1P (B) não atuam como moduladores da (Na⁺/K⁺)ATPase em membrana basolateral isolada.

A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase de membrana plasmática foi ensaiada na presença das concentrações de Cer e C1P mostradas na abscissa das figuras, como descrito em Material e Métodos. O resultado foi obtido a partir de seis experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão.

Medimos a atividade da Na⁺-ATPase presente na membrana basolateral na presença de concentrações crescentes de Cer, observamos um efeito inibitório máximo de ~ 54 % sobre a atividade da Na⁺-ATPase (média da atividade controle = 21,27 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹) na concentração de 10 µM do esfingolipídio (Figura 11A), sendo que seu derivado fosforilado (C1P) tem um potencial inibitório ainda maior do que o promovido por Cer sobre a atividade da Na⁺-ATPase, já que concentrações nanomolares de C1P (mais baixas do que as que promovem a inibição da Na⁺-ATPase por Cer) são capazes de inibir a enzima (Figura 11B). Ao que nos foi possível verificar, esta é a primeira vez que se mostra a modulação da Na⁺-ATPase por ceramidas.

Os dados obtidos em relação à medida da atividade dos transportadores de Na⁺ na presença de concentrações crescentes de Cer e C1P, mostram que a Na⁺-ATPase, responsável pelo ajuste fino das concentrações de Na⁺ do volume extracelular, é influenciada pela composição da membrana, diferente da (Na⁺/K⁺)ATPase, responsável pelo transporte em massa do Na⁺ intracelular para o interstício, que não teve sua atividade modulada pelos esfingolipídios (Cer e C1P) de membrana plasmática (Figuras 10 e 11).

A modulação de ATPases por Cer já foi descrita, como por exemplo a Ca²⁺-ATPase de eritrócitos (COLINA *et al.*, 2002) e PMCA (CABRAL *et al.*, 2007). A modulação da Ca²⁺-ATPase de eritrócitos, no entanto, foi avaliada na presença de concentrações de Cer acima da concentração micelar crítica, ou seja, levando a uma desorganização da membrana (chamado de efeito detergente), quando os constituintes de membrana se dissociam e levam a diversos efeitos antes não esperados, como por exemplo, mudanças físicas da ATPase e o deslocamento da Cer para um outro domínio de membrana, levando assim à ativação ou mesmo ao

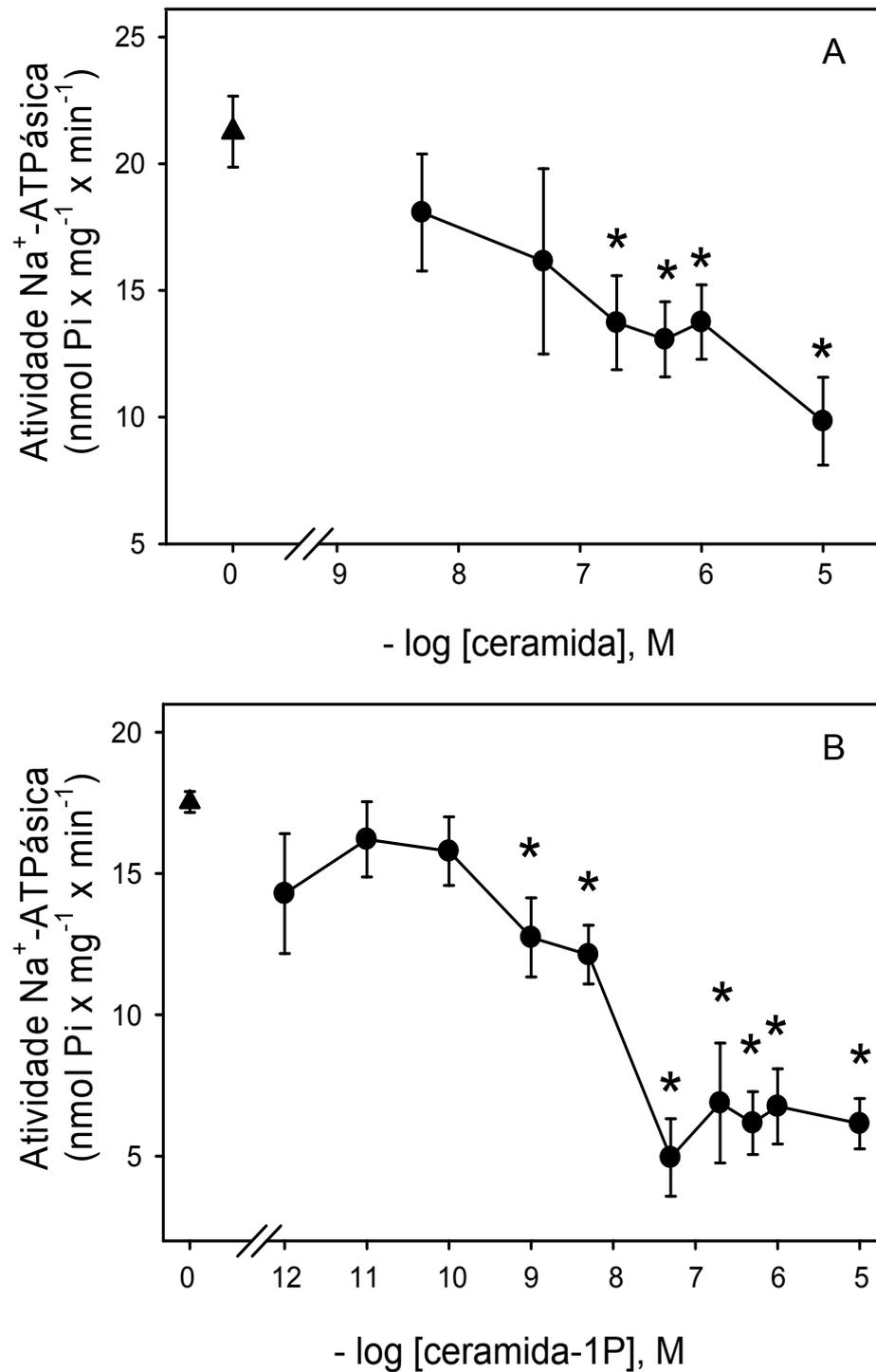


Figura 11. Inibição da atividade da Na⁺-ATPase de membrana plasmática por Cer e C1P.

A atividade da Na⁺-ATPase de membrana plasmática foi ensaiada na presença das concentrações de Cer e C1P mostradas na abscissa das figuras, como descrito em Material e Métodos. O resultado foi obtido a partir de seis experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão.

* indica os diferentes efeitos de Cer em relação ao controle.

silenciamento de uma determinada proteína. Nesta tese, no entanto, foram utilizadas concentrações na faixa de picomolar e nanomolar (abaixo do valor da concentração micelar crítica da Cer), podendo-se aceitar que o efeito de inibição observado na atividade da Na⁺-ATPase foi produzido pelas ceramidas, e não pelo efeito detergente de altas concentrações dos lipídios.

Nosso próximo passo foi pesquisar se haveria o envolvimento de proteínas cinases na inibição da Na⁺-ATPase por Cer e C1P. Torna-se então importante lembrar que a regulação de ATPases envolve modificações pós-traducionais englobando acetilações, glicosilações, fosforilações, entre outras. A modificação pós-traducional leva, por exemplo, a alterações na capacidade catalítica da proteína ou em sua afinidade por co-fatores e substratos. O processo de fosforilação é um destes processos de regulação, sendo catalisado por proteínas cinases, podendo levar a mudanças conformacionais na estrutura da proteína, capazes de expor seqüências que medeiam a associação com proteínas constituintes de microdomínios de membrana.

A fosforilação por proteínas cinases envolve a transferência do grupo fosfato terminal de uma molécula de ATP para uma hidroxila de cadeia lateral dos aminoácidos serina, treonina ou tirosina na proteína. Essa reação catalisada por proteínas cinases, é essencialmente unidirecional. A fosforilação de uma proteína pode tanto ativá-la quanto inibi-la.

Tanto a PKA quanto a PKC são serino-treonino cinases que fosforilam resíduos de serina e treonina das proteínas alvo, regulando suas atividades. A PKA existe em todas as células animais e é ativada pelo AMP cíclico (AMPc) (pequeno mediador intracelular). Os substratos da PKA diferem nos diferentes tipos celulares, o que explica por que os efeitos do AMPc variam tanto dependendo do tipo celular.

Três subunidades catalíticas da PKA ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$), são encontradas em proporções variadas dependendo do tipo celular estudado (SKALHEGG & TASKEN, 2000), sendo a subunidade γ apenas encontrada em primatas. CANAVES & TAYLOR em 2002 identificaram quatro diferentes isoformas de subunidade regulatória em mamíferos ($R1\alpha$, $R1\beta$, $R1\alpha$, $R1\beta$). No seu estado inativo, a PKA consiste de um complexo de duas subunidades catalíticas e de duas subunidades reguladoras. Classicamente a ligação do AMPc às subunidades reguladoras altera a conformação dessas subunidades, provocando sua dissociação do complexo. As subunidades catalíticas são, assim, ativadas e fosforilam substratos protéicos específicos (TASKEN & AANDAHL, 2004) (Figura 12). As subunidades reguladoras são também importantes para localizar a enzima dentro da célula. A PKA é, assim, classicamente ativada pelo AMPc sintetizado a partir do ATP pela adenilato ciclase, e contrabalançada pela presença e ação de fosfodiesterases (PDEs) capazes de degradar o AMPc produzido, sendo as PDEs fosforiladas pela própria PKA, o que as torna ativas. Uma segunda maneira de terminar o sinal disparado pela PKA, é a fosforilação do receptor acoplado à proteína Gs, levando a sua internalização, sendo esta fosforilação feita pela própria PKA (MOVSESIAN, 2003). O sinal disparado pela PKA, também pode ser terminado, através da ação de diferentes fosfatases, que são proteínas com ação de defosforilar proteínas fosforiladas por cinases. Também foi mostrada a ativação da PKA dependente de Cer e independente de AMPc, na qual a Cer se liga diretamente nas subunidades catalíticas da PKA, ativando-a (CABRAL *et al.*, 2007).

A PKA é encontrada tanto em frações citosólicas como associada a frações de membrana. Dados anteriores de nosso grupo mostram a presença de PKA associada à fração de membrana basolateral (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000;

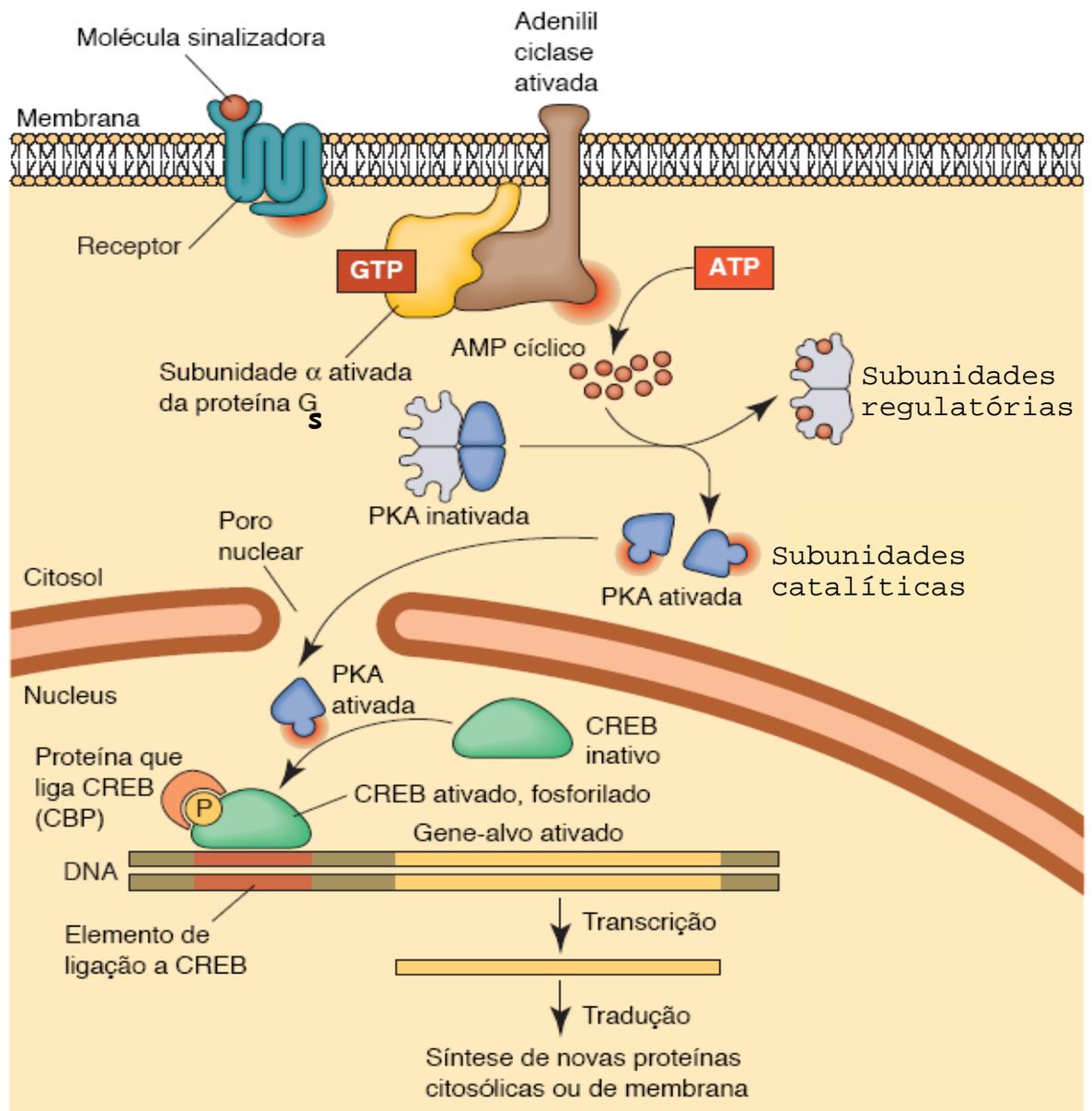


Figura 12. Ativação da PKA dependente de AMPc.

A ligação de uma molécula extracelular ao receptor acoplado à proteína G_s, leva à ativação da adenilato ciclase e aumento das concentrações de AMPc. Este aumento leva à ligação de quatro moléculas de AMPc às duas subunidades regulatórias da PKA, ativando-a. A ativação da PKA faz com que as duas subunidades regulatórias se dissociem das duas subunidades catalíticas da cinase, promovendo assim a fosforilação subsequente de proteínas alvos (modificado de ALBERTS *et al.*, 2002).

CABRAL *et al.*, 2007). Estudos recentes descrevem ainda, que PKA pode ser modulada pela interação direta com outras cinases como Ca^{2+} /calmodulina cinase (VALVERDE *et al.*, 2005) e diferentes esfingolipídios como S1P (MA *et al.*, 2005) e Cer (CABRAL *et al.*, 2007), tendo sido esta a primeira vez que se demonstrou a modulação de PKA pelo esfingolipídio Cer.

Assim como no caso da PKA, os efeitos provocados por PKC variam dependendo do tipo celular, podendo esta outra cinase estar envolvida em processos como a diferenciação celular, crescimento celular, etc. (SHENK & SNAAR-JAGALSKA, 1999; NEWTON, 2003).

A PKC pode ter três domínios importantes: C1 (domínio de ligação do diacilglicerol), C2 (domínio de ligação do Ca^{2+}) ou C1 atípica (domínio de ligação de lipídios). Dados da literatura mostram a existência de onze isoformas de PKC, sendo estas divididas em três famílias: convencional ou clássica (dependentes de Ca^{2+} e diacilglicerol), novel ou novas (dependentes de diacilglicerol e independentes de Ca^{2+}) e atípicas (dependentes de lipídios – como por exemplo Cer - independentes de diacilglicerol e de Ca^{2+}) (PARKER & MURRAY-RUST, 2004) (Figura 13). Classicamente, a PKC é ativada quando um sinal extracelular ativa um receptor acoplado à proteína Gq, que ativa uma fosfolipase C, residente na membrana, que por sua vez cliva fosfatidilinositol (4,5) bifosfato em diacilglicerol e IP_3 . Conseqüentemente há o aumento do Ca^{2+} citosólico, induzido por IP_3 , alterando a PKC de forma que ela se desloca do citosol para a face citoplasmática da membrana. Aí ela é ativada pela combinação de Ca^{2+} , de diacilglicerol e do fosfolipídio de membrana carregado negativamente (fosfatidilserina). Dados prévios do nosso laboratório mostram a presença de PKC associada à membrana basolateral (ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2005).

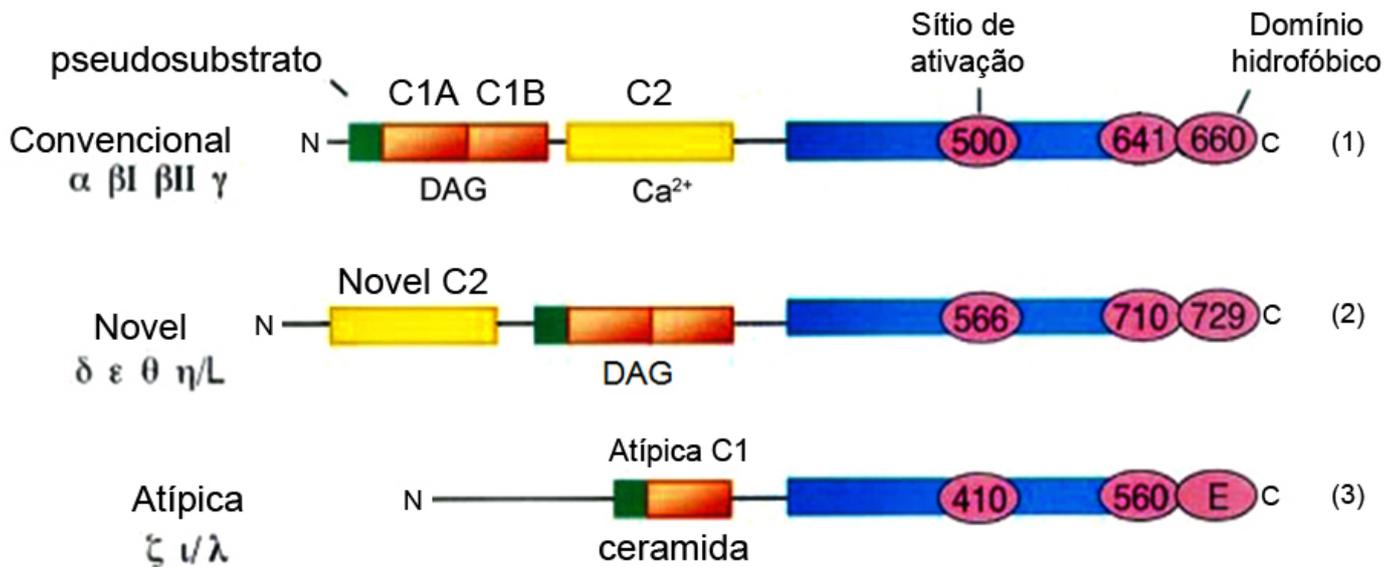


Figura 13. As diferentes famílias e isoformas de PKC.

A PKC é dividida em três famílias: (1) convencional ou clássica, que possui o domínio C1, que é o domínio de ligação ao diacilglicerol (representado em laranja), e o domínio C2, que é o domínio de ligação ao Ca^{2+} (representado em amarelo); (2) novel ou nova, que possui o domínio C1 e o domínio C2, sendo este último insensível ao Ca^{2+} ; (3) e atípica que possui o domínio C1 que é sensível a lipídios e insensível ao diacilglicerol. As três famílias da PKC possuem um domínio auto-inibitório de ligação ao pseudosubstrato (representado em verde) (modificado de PARKER & MURRAY-RUST, 2004).

Trabalhos na literatura mostram que a Cer é considerada um ativador direto da PKC ζ (zeta) atípica, sendo esta ativação envolvida na proliferação celular e na ativação de cascatas de MAPK (MULLER *et al.*, 1995; BOURBON *et al.*, 2000). Em células mesangiais renais, foi observado que a Cer pode também ativar outras isoformas de PKC, sabidamente PKC α (clássica) e PKC δ (novel) (HUWILER *et al.*, 1998), o que também confere à Cer, um papel importante na regulação de eventos mediados por PKC.

Proteínas cinases, sabidamente PKA e PKC, têm sido relacionadas com a modulação da PMCA (ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2007), da Na⁺-ATPase de túbulo proximal renal (RANGEL *et al.*, 2002, 2005; CARUSO-NEVES *et al.*, 2003; LARA *et al.*, 2008) e de outros transportadores de íons (CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; ALMEIDA- AMARAL *et al.*, 2007) a partir de diferentes estímulos em diferentes modelos biológicos, incluindo tecido renal. Além disso, dados da literatura mostraram que ceramidas podem ativar proteínas cinases levando a respostas como proliferação, apoptose, fagocitose, inflamação, etc. (GOMEZ-MUÑOZ, 2004; BAUMRUKER *et al.*, 2005). Com base nas evidências acima, decidimos investigar o papel da Cer e da C1P na modulação da PKC e PKA.

Os dados mostrados na figura 14A já foram publicados pelo nosso grupo (CABRAL *et al.*, 2007), e mostram a ativação significativa da PKA, quando as frações de membrana basolateral são tratadas com 50 nM Cer (concentração esta que promove a ativação máxima da Ca²⁺-ATPase (CABRAL *et al.*, 2007), e 200 nM Cer (faixa de concentração que promove a máxima inibição da Na⁺-ATPase da membrana basolateral – ver figura 11A). Na figura 14B, o derivado fosforilado de Cer (C1P), também promove a ativação significativa da PKA, na concentração de 100 nM (faixa de concentração que promove a maior inibição da Na⁺-ATPase – ver figura

11B). Pode-se observar nas figuras 14A e 14B, que Cer e C1P são capazes de ativar a PKA de membrana basolateral, sendo esta ativação comparada com a de seu ativador fisiológico, o AMPc (100 nM). Quando as frações de membrana são tratadas com Cer e AMPc simultaneamente (Figura 14A – última coluna), observamos um efeito aditivo na ativação da PKA, o que nos leva a postular a presença de ao menos dois “pools” de PKA associados à membrana basolateral, com ativação dependente de Cer ou de AMPc. Por outro lado, na presença de C1P mais AMPc, há a mesma atividade da Na⁺-ATPase comparado quando as frações de membrana são tratadas apenas com C1P ou com AMPc, indicando que C1P ativa o mesmo “pool” de PKA que o AMPc (Figura 14B – última coluna) (CABRAL *et al.*, 2007).

Foi também testada a capacidade de Cer e de C1P (nas mesmas concentrações utilizadas para medir a atividade da PKA) em modular a atividade da PKC. Tratando as frações de membrana com 50 nM Cer, não foi observada a modulação da cinase. Já na presença de 200 nM Cer (concentração que leva a maior inibição da Na⁺-ATPase – ver figura 11A) observamos aumento da atividade da PKC (Figura 15A) (CABRAL *et al.*, 2007).

A ativação de PKC por Cer é equivalente à observada com 1 pM PMA, que é um ativador clássico da PKC (comparar a terceira barra com a quarta barra da figura 15A). Quando adicionados juntos Cer e PMA, não é observada aditividade na atividade da cinase, levando-nos a concluir que tanto Cer quanto PMA ativam o mesmo “pool” de PKC na membrana (comparar as três últimas barras da figura 15A). Em contraste, a incubação da membrana basolateral com C1P (100 nM), levou à inibição da PKC (Figura 15B). Quando as frações de membrana são tratadas ao mesmo tempo com C1P e PMA, há o retorno ao valor controle, mostrando um

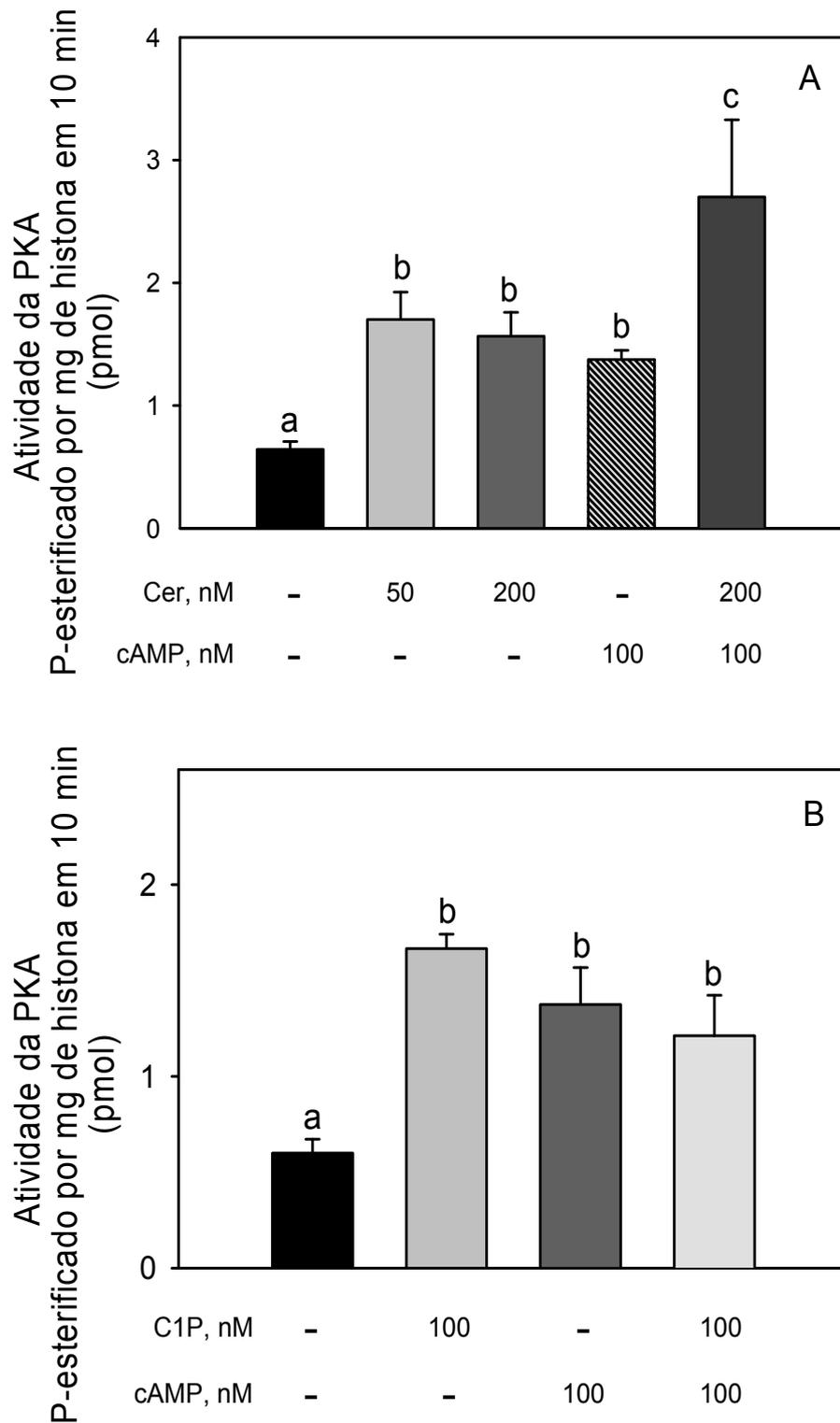


Figura 14. Ativação da PKA por Cer (A) e C1P (B).

A atividade da PKA foi determinada como descrito em Material e Métodos, na presença e na ausência de Cer, C1P e AMPc. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de cinco experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral.

a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

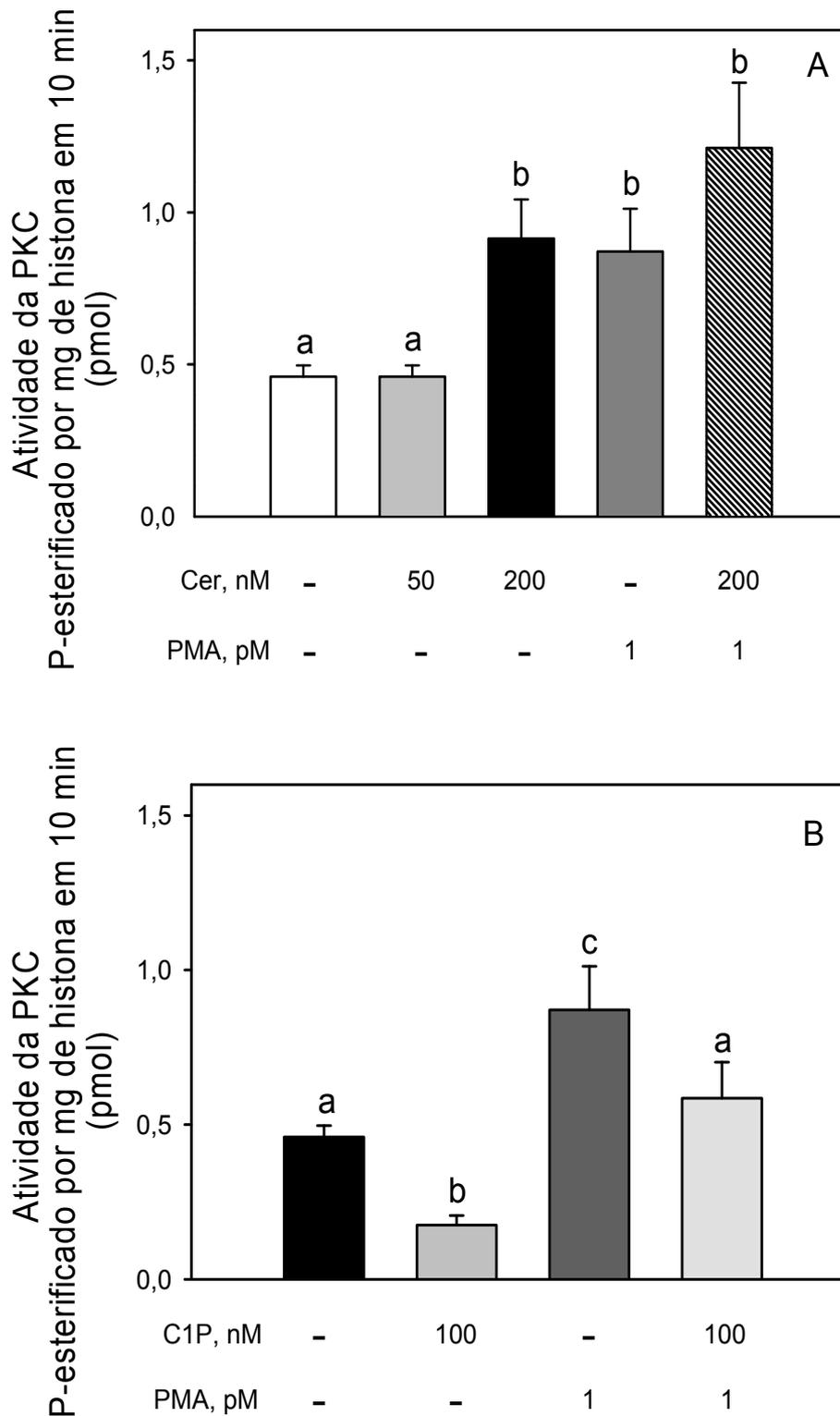


Figura 15. Efeitos antagônicos de Cer (A) e C1P (B) na modulação da PKC.

A atividade da cinase foi determinada como descrito em Material e Métodos, na presença e na ausência de Cer, C1P e PMA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de cinco experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral.

a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

balanço entre a diminuição da atividade da PKC por C1P e aumento da atividade da PKC por PMA (comparar as três últimas barras da figura 15B). Na primeira barra da figura 15A é observada uma atividade basal da PKC, que a calfofostina não é capaz de inibir, já que a calfofostina inibe PKC ativada.

Os resultados das figuras 14 e 15, mostram que em membrana basolateral, Cer medeia eventos dependentes de PKA e PKC e, C1P medeia eventos dependentes de PKA, provavelmente desencadeando uma cascata de sinalização que leva a importantes respostas celulares, já que dados da literatura mostram essas respostas celulares desencadeadas por cinases ativadas por ceramidas (GOMEZ-MUÑOZ, 2004; BAUMRUKER *et al.*, 2005).

Devido ao fato do gene da Na⁺-ATPase só ter sido identificado em organismos inferiores como, por exemplo, algas, ainda não se conhece sua estrutura, mas sabe-se que ela faz parte da família das P-ATPases (MOLLER *et al.*, 1996), que sabidamente possuem sítios de fosforilação, e de interação ou ligação a lipídios. Na figura 11, mostramos que Cer e C1P modulam a atividade da Na⁺-ATPase produzindo significativa inibição desta enzima, o que nos levou a estudar qual a via de sinalização envolvida nesta inibição. Dados da literatura mostram que, em mamíferos, a Na⁺-ATPase tem sua atividade modulada por PKA, PKC e PKG (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000, 2003; RANGEL *et al.*, 2001) e, como verificamos a modulação das cinases em questão (PKA e PKC) por Cer e C1P (Figuras 14 e 15), postulamos haver envolvimento dessas cinases moduladas por ceramidas na inibição da Na⁺-ATPase.

A atividade da Na⁺-ATPase foi medida na presença e na ausência de Cer, PMA (ativador clássico da PKC) e calfofostina (inibidor clássico da PKC), nas combinações indicadas na abscissa da figura 16. As frações de membrana

basolateral tratadas com PMA (1 μ M) mostram ativação da bomba de Na^+ (Figura 16) e o envolvimento da PKC no aumento da atividade da Na^+ -ATPase de membrana basolateral, dado este que complementaria resultados anteriores do nosso grupo, que mostram a participação da PKC na ativação da Na^+ -ATPase de membrana basolateral (RANGEL *et al.*, 2002) e a ativação da via de sinalização da PKC (fosfoinositídeo/fosfolipase C) na ativação da Na^+ -ATPase de túbulos proximais renais (LARA *et al.*, 2008). Quando adicionados Cer e PMA juntos, não há o retorno da atividade da bomba de Na^+ ao valor controle, mostrando que o potencial inibitório de Cer é maior do que o potencial estimulatório de PMA sobre a Na^+ -ATPase (comparar segunda, terceira e quarta barras da figura 16).

A calfofostina não foi capaz de reverter a inibição da Na^+ -ATPase por Cer, descartando o envolvimento da PKC nesta via de sinalização. Os dados mostrados na figura 16 condizem com dados da literatura, pois a ativação da PKC leva ao aumento da atividade da Na^+ -ATPase de membrana basolateral (RANGEL *et al.*, 2002; LARA *et al.*, 2008), e como mostrado na figura 15, PKC ativada por Cer não inibe a Na^+ -ATPase (Figura 11).

Para pesquisar o possível envolvimento da PKA na inibição da atividade da Na^+ -ATPase por Cer, incubamos a membrana basolateral com Cer (200 nM) e com o inibidor de PKA (PKAi) na concentração de 10 nM. O efeito inibitório de Cer sobre a Na^+ -ATPase de membrana plasmática não foi mais observado na presença de PKAi, sugerindo assim que a Cer iniba a atividade da Na^+ -ATPase de membrana basolateral via PKA (Figura 17). Na presença de AMPc (ativador clássico da PKA), há o aumento da atividade da Na^+ -ATPase (ver segunda barra da figura 17) mostrando ser a PKA uma ativadora da bomba de Na^+ . O retorno ao valor controle ocorre quando as frações de membrana são tratadas com Cer e AMPc juntos (ver

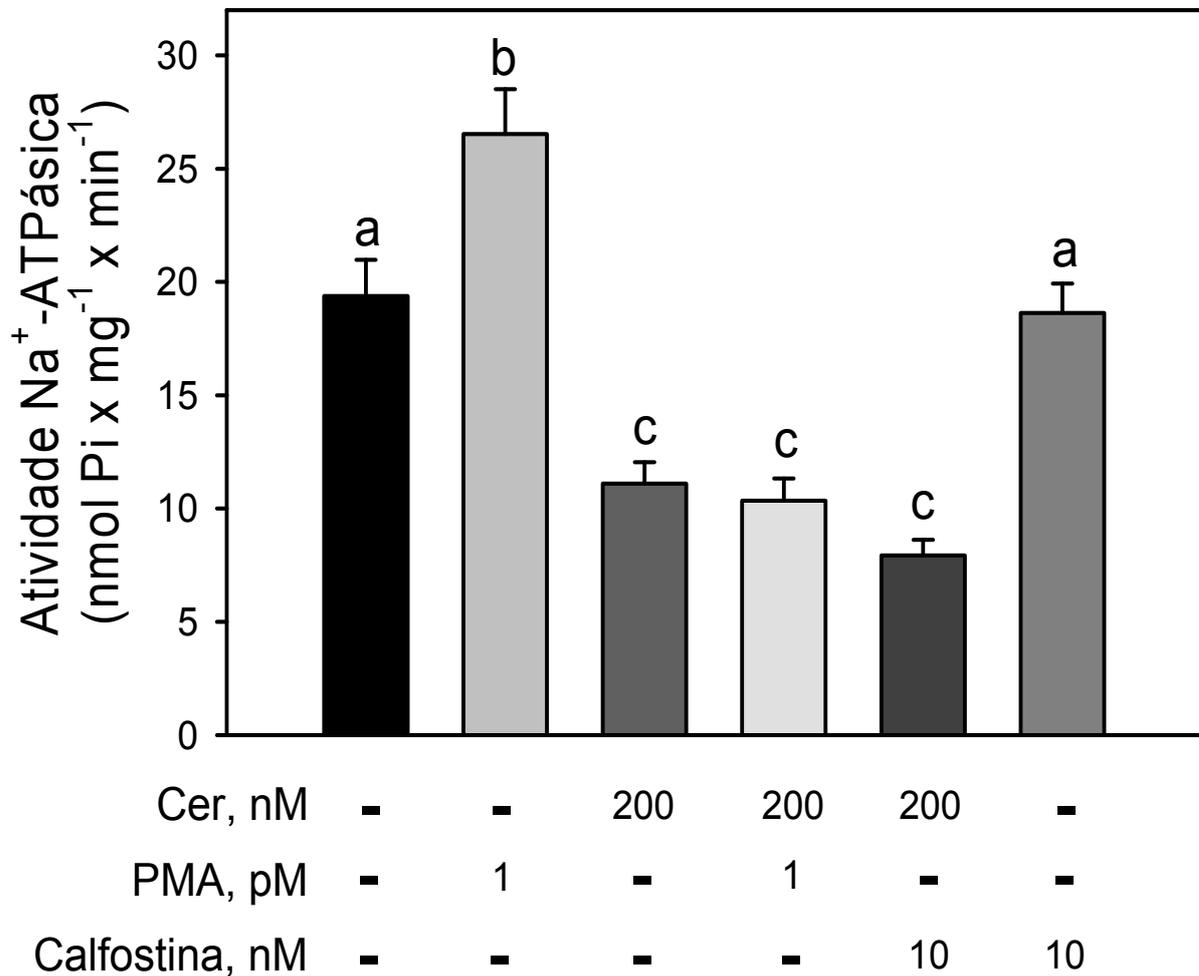


Figura 16. Cer inibe a Na⁺-ATPase de membrana plasmática por uma via independente de PKC.

A atividade da Na⁺-ATPase de membrana plasmática foi ensaiada como descrito em Material e Métodos na presença e ausência de calfofostina C (inibidor da PKC), Cer e PMA (ativador da PKC), nas combinações indicadas na abscissa. Foram realizados cinco experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

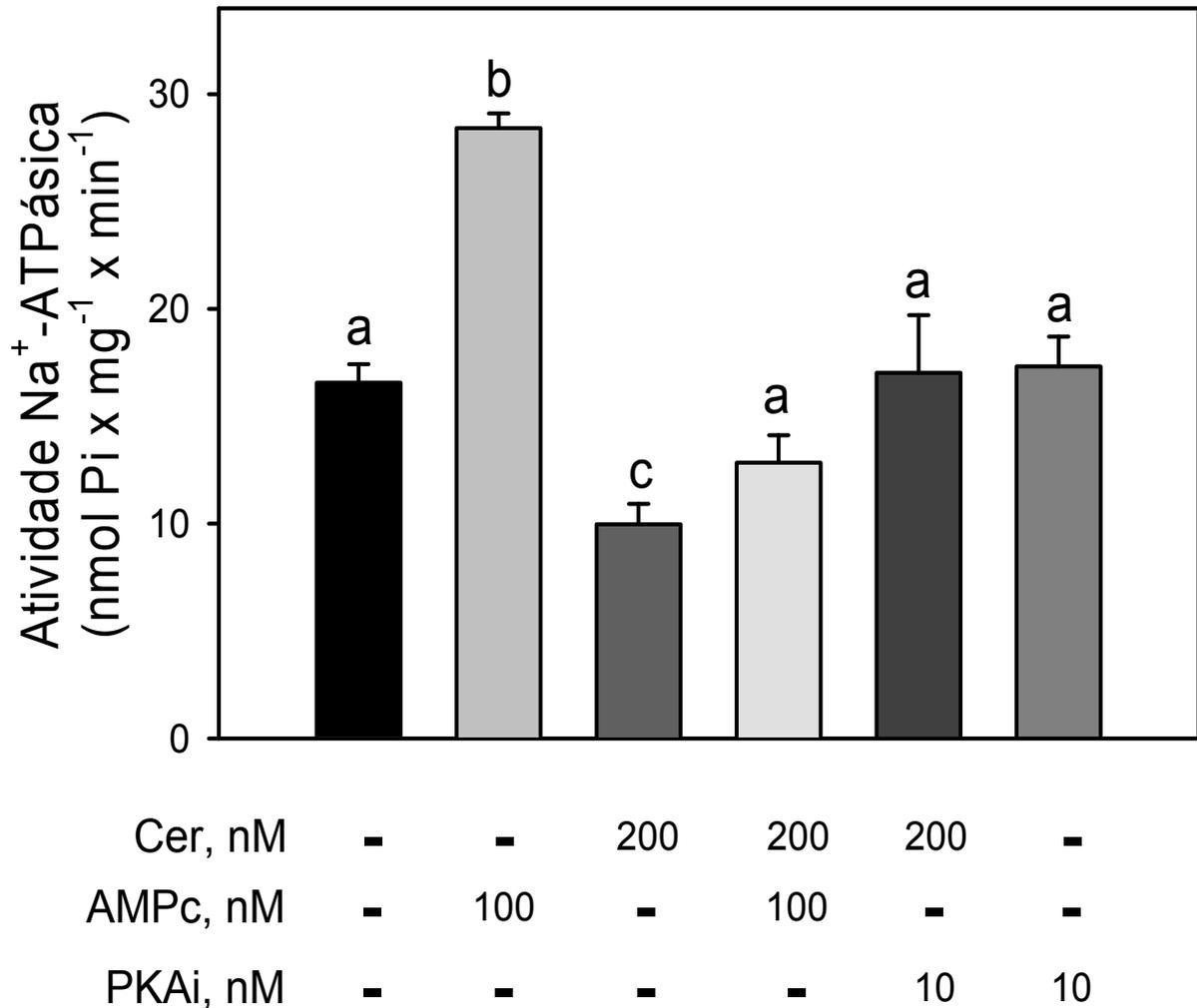


Figura 17. Cer inibe a Na⁺-ATPase de membrana plasmática via PKA.

A atividade da Na⁺-ATPase de membrana plasmática foi ensaiada como descrito em Material e Métodos na presença e ausência de PKAi (inibidor da PKA), Cer e AMPC (ativador da PKA), nas combinações indicadas na abscissa. Foram realizados cinco experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

quarta barra da figura 17), já que o potencial estimulatório promovido por AMPc sobre a atividade da Na⁺-ATPase é maior do que o potencial inibitório promovido por Cer (comparar a segunda e a terceira barra da figura 17).

Os dados da figura 17 mostram o envolvimento da PKA na inibição da Na⁺-ATPase por Cer, confirmando mais uma vez o envolvimento desta cinase na modulação da atividade da Na⁺-ATPase.

Nosso próximo passo foi investigar qual das cinases estudadas (PKA ou PKC) está envolvida na inibição da Na⁺-ATPase por C1P. Na figura 18, as frações de membrana foram tratadas com AMPc (100 nM), mostrando novamente o aumento da atividade da Na⁺-ATPase induzido por PKA (comparar segunda barra da figura 17 com a segunda barra da figura 18). Na presença de C1P (100 nM) e AMPc (100 nM), a atividade da Na⁺-ATPase continua inibida, mostrando que AMPc não é capaz de reverter a inibição da enzima por C1P, já que C1P possui um potencial inibitório sobre a bomba de Na⁺ maior do que o potencial estimulatório promovido pelo AMPc (comparar segunda, terceira e quarta barra da figura 18). Na presença de 100 nM C1P (concentração de maior inibição da Na⁺-ATPase por C1P – ver figura 11B) mais PKAi (10 nM), não houve a reversão da inibição da enzima por C1P (ver quinta barra da figura 18), nos permitindo concluir que C1P inibe a Na⁺-ATPase por uma via independente de PKA.

Para investigar o possível envolvimento da PKC na inibição da Na⁺-ATPase por C1P, tratamos frações de membrana basolateral com C1P (100 nM) e calfofostina (10 nM) juntos, e a calfofostina foi capaz de reverter a inibição da Na⁺-ATPase por C1P, evidenciando que C1P inibe a Na⁺-ATPase via PKC (Figura 19).

Na presença de PMA (1 pM), ativador clássico da PKC, a atividade da Na⁺-ATPase é aumentada, mostrando novamente o envolvimento da PKC no aumento

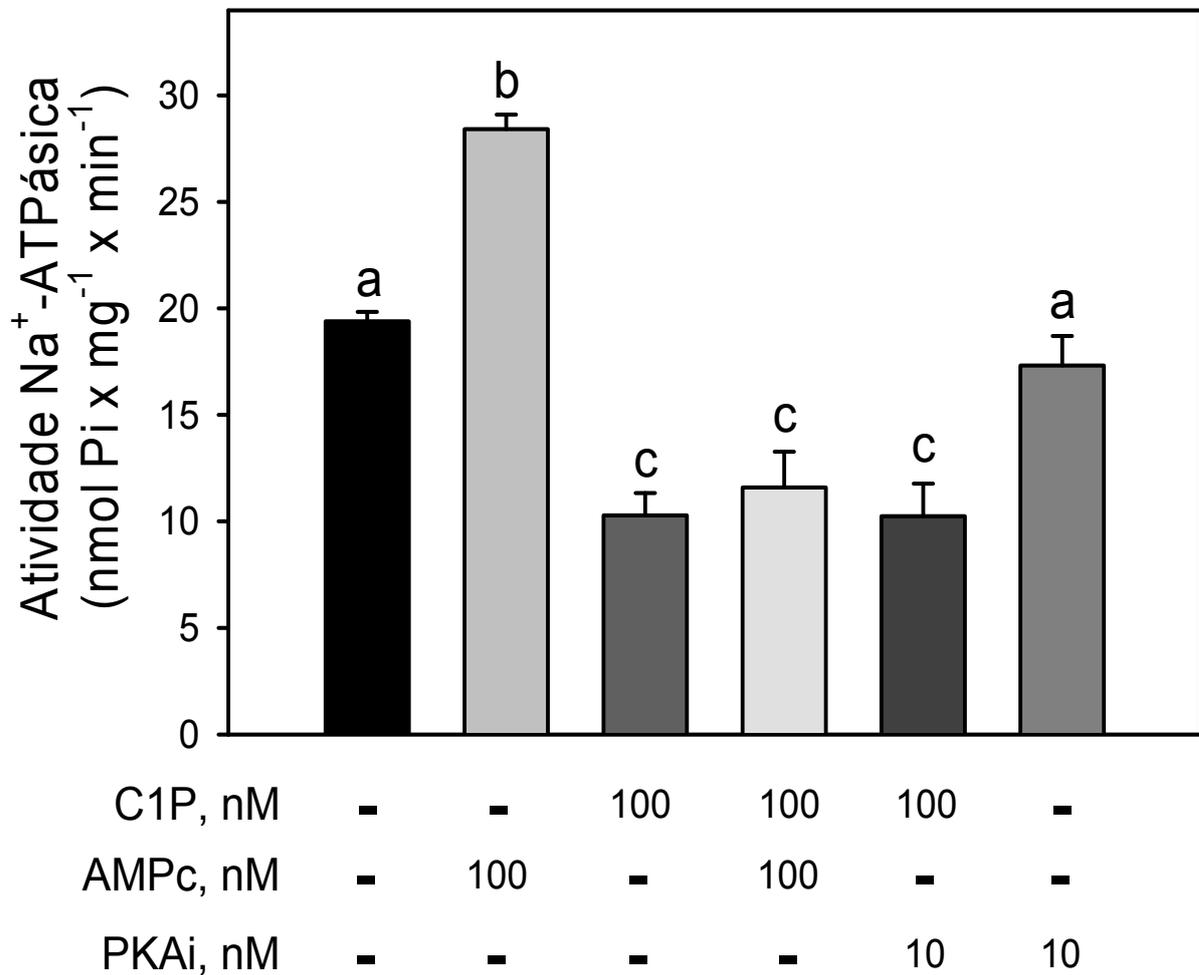


Figura 18. C1P inibe a Na⁺-ATPase de membrana plasmática por uma via independente de PKA.

A atividade da Na⁺-ATPase de membrana plasmática foi ensaiada como descrito em Material e Métodos na presença e ausência de PKAi (inibidor da PKA), Cer e AMPc (ativador da PKA), nas combinações indicadas na abscissa. Foram realizados cinco experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão.

a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

da atividade da Na⁺-ATPase (ver segunda barra das figuras 16 e 19). Quando as frações de membranas são tratadas com C1P (100 nM) mais PMA (1 pM), ocorre a reversão da inibição da Na⁺-ATPase por C1P (comparar terceira e quarta barra da figura 19).

Com os dados mostrados na figura 19, podemos concluir que C1P inibe a Na⁺-ATPase via PKC, sendo que na figura 15 é mostrado que C1P inibe a PKC, ou seja, como uma cinase inibida modula uma ATPase? Postulamos então a possível presença de dois “pools” de PKC na membrana basolateral, além da PKC clássica já descrita: um “pool” de PKC novel (dependente de diacilglicerol), e outro “pool” de PKC atípica (dependente de esfingolipídios, como ceramida), sendo o “pool” de PKC novel inibido por C1P, e o “pool” de PKC atípica ativado por C1P, levando à inibição da Na⁺-ATPase. A inibição da PKC novel por C1P é visualizada na figura 15. Uma explicação para isto seria que possivelmente existam mais isoformas da PKC novel do que da PKC atípica na membrana basolateral de células epiteliais renais, predominando então a resposta da PKC novel disparada por C1P. Não postulamos o envolvimento de uma “pool” de PKC convencional modulado por C1P, já que é descrito na literatura que PKC convencional é modulada por hormônios e autacóides que interagem com receptores acoplados à Ptn Gq, sendo que ainda não foram descritos receptores de C1P, nem usado na medida de atividade da PKC e Na⁺-ATPase, hormônios ou autacóides.

Dados da literatura mostram que PKC novel e clássica ativadas por autacóides como, por exemplo, angiotensina II e angiotensina (1-7), levam ao aumento da atividade da Na⁺-ATPase e inibição da Ca²⁺-ATPase presentes na membrana basolateral do túbulo proximal renal (RANGEL *et al.*, 2002; ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2005; LARA *et al.*, 2008), além da modulação da PKC δ (novel) por

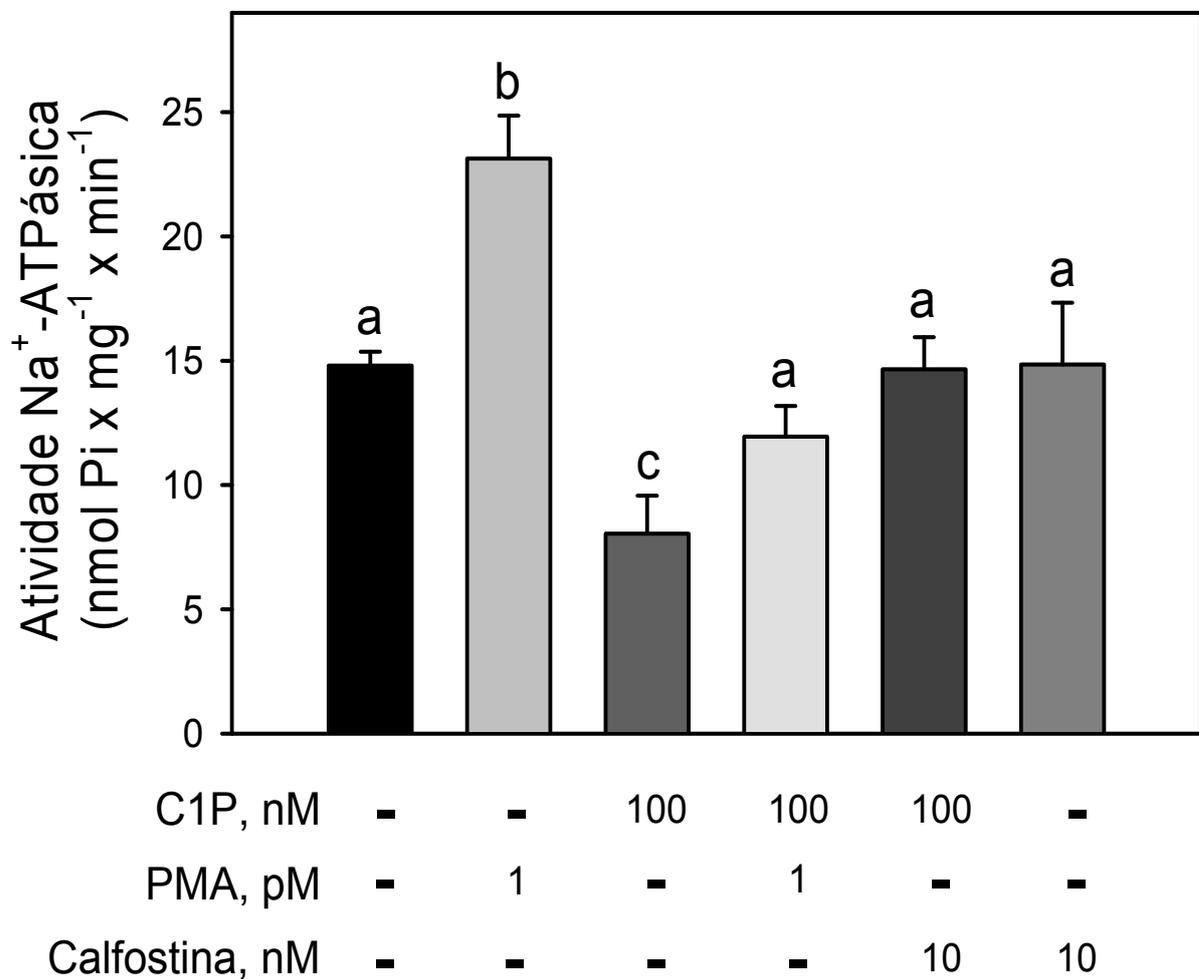


Figura 19. C1P inibe a Na⁺-ATPase de membrana plasmática via PKC.

A atividade da Na⁺-ATPase de membrana plasmática foi ensaiada como descrito em Material e Métodos na presença e ausência de calphostina C (inibidor da PKC), Cer e PMA (ativador da PKC), nas combinações indicadas na abscissa. Foram realizados cinco experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. a,b,c – mesmas letras indicam médias sem diferenças significativas entre si.

Cer em células mesangiais renais (HUWILER *et al.*, 1998). MULLER e colaboradores, em 1995, e BOURBON e colaboradores, em 2000, mostram que a Cer também é um ativador direto da PKC ζ (atípica), estando esta ativação relacionada à proliferação celular e à ativação de cascatas de MAPK. Apesar disso, estes dados da literatura não mostram a presença das isoformas da PKC na membrana basolateral. Para validar a proposta da existência de diferentes “pools” de PKC presentes na membrana basolateral, utilizamos a técnica de SDS-PAGE e imunodeteção, como descrito em Material e Métodos. Foi feito Western Blot utilizando os anticorpos contra isoformas das famílias da PKC convencional (α e β II), novel (ϵ , θ e η) e atípica (ζ) (Figura 20). Ao que sabemos esta é a primeira vez que estas isoformas de PKC são identificadas na membrana basolateral do túbulo proximal renal. A partir dos dados representados na figura 20, podemos confirmar a presença de diferentes “pools” de PKC residentes na membrana basolateral, com prováveis ações diferentes, como a desencadeada por C1P, que leva à inibição da Na⁺-ATPase.

A modulação dos esfingolípídios bioativos, Cer e C1P, sobre a atividade das ATPases transportadoras de Ca²⁺ (CABRAL *et al.*, 2007) e Na⁺, e da modulação das cinases estudadas, PKA (CABRAL *et al.*, 2007) e PKC, presentes na membrana basolateral, pode tornar nosso modelo, uma ferramenta de estudo, de algumas cascatas de sinalização celular envolvidos na regulação de eventos de transporte nos rins.

A investigação da possível presença das vias de geração de Cer (SMases) e C1P (CerK) na membrana basolateral, a identificação da maquinaria completa na geração de ceramidas no ambiente da membrana basolateral, tornou o próximo alvo de nosso estudo.

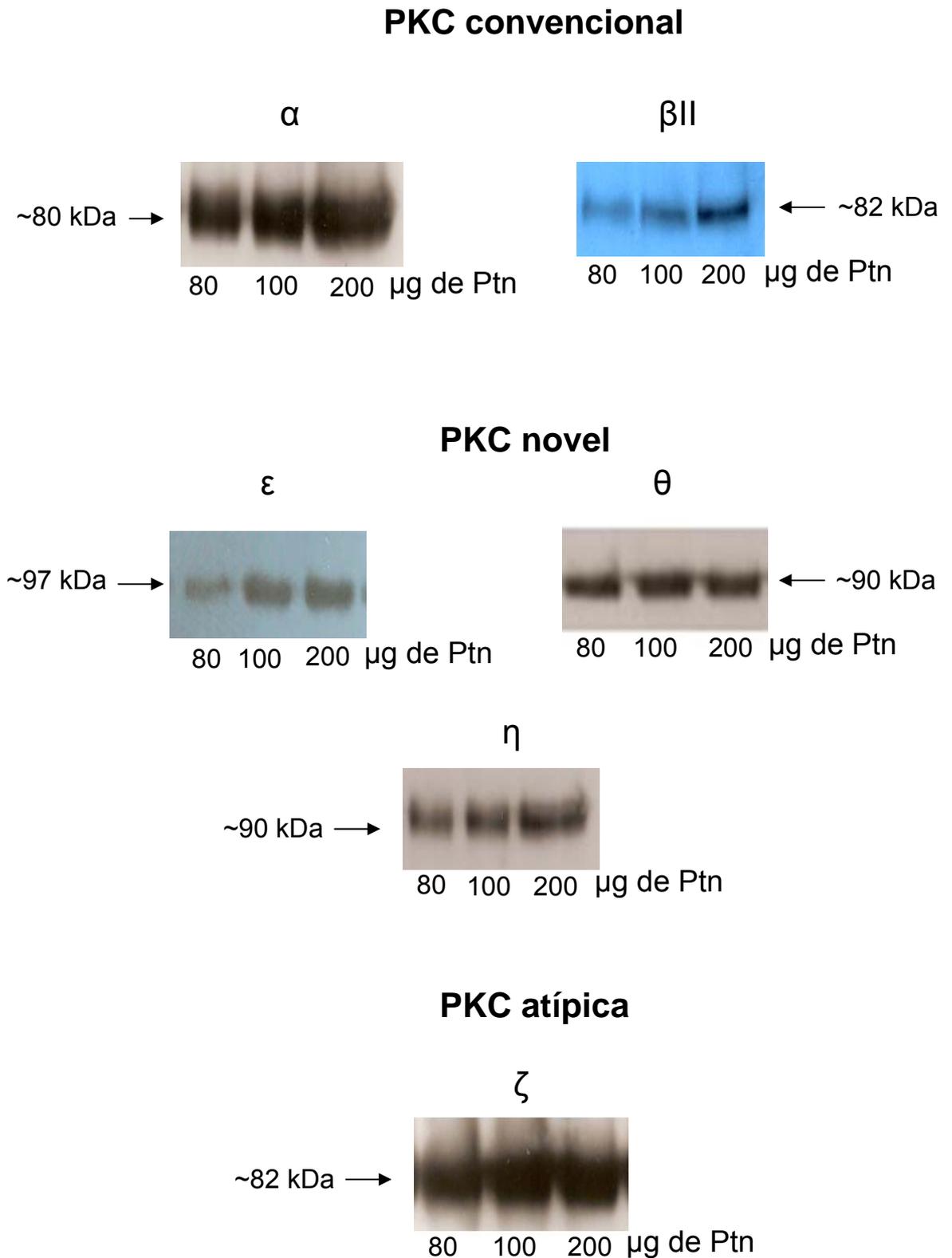


Figura 20. Presença das PKCs convencional, novel e atípica na membrana basolateral.

A imunodeteção das diferentes isoformas da PKC, foi ensaiada como descrito em Material e Métodos, na presença de 80 μ g, 100 μ g e 200 μ g de proteína de membrana basolateral.

Para entender a regulação na geração de Cer na membrana, é necessário primeiramente identificar as SMases na membrana basolateral, pois são estas as enzimas responsáveis por mediar a hidrólise de SM em fosfocolina e Cer (ver figura 9). Muitos fatores de estresse como, por exemplo, citocinas e agentes quimioterápicos, além de outras moléculas, resultam na acumulação de Cer, através da ativação de SMases (KOLESNICK & KRÖNKE, 1998; ANDRIEU-ABADIE *et al.*, 2001). Pelo menos duas SMases, neutras e ácidas, são ativadas por muitos estímulos extracelulares, como os citados acima e na seção 1.7.1.

O estudo da presença das SMases na membrana basolateral, torna-se importante por: (1) gerarem a Cer, que tem como uma de suas funções levar a mudanças significativas na organização da membrana plasmática com maior probabilidade de formação de microdomínios ricos em Cer, os quais são capazes de se unir espontaneamente a outros microdomínios, resultando assim nas chamadas plataformas sinalizadoras desencadeando diversas respostas celulares (HOLOPAINEN *et al.*, 1998; KOLESNICK *et al.*, 2000; NURMINEN *et al.*, 2002); (2) por serem responsáveis pelo acúmulo de Cer nos túbulos proximais durante os quadros de isquemia ou outro tipo de injúria renal, sendo as SMases importantes alvos farmacológicos (VRTOVNIK *et al.*, 1992; ZAGER, 2000).

Para investigar a presença de SMases na membrana basolateral, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodetectadas por anticorpos específicos, como descrito em Material e Métodos. Tanto as SMases ácidas (com peso molecular de ~ 70 kDa) quanto as SMases neutras (com peso molecular de ~ 145 kDa) estão presentes na membrana basolateral, mostrando haver um potencial gerador de Cer nesta membrana (Figura 21).

Evidenciada a presença das SMases ácidas e neutras na membrana basolateral, nosso próximo passo foi pesquisar a presença de CerK na membrana basolateral, pela fosforilação de Cer em C1P, demonstrando desta maneira a presença de uma maquinaria completa na membrana basolateral, capaz de gerar Cer e C1P. Vale ressaltar que não encontramos dados na literatura que demonstrem a presença de CerK em nosso modelo.

Para identificação da CerK, foram realizados ensaios de fosforilação de lipídios (como descrito em Material e Métodos), pelos quais verificamos a presença de CerK na membrana basolateral, pela detecção de C1P, como mostrado na figura 22. Os experimentos foram realizados na ausência e na presença de concentrações crescentes de Cer.

Foi verificado o mesmo nível de formação de C1P ($\sim 60 \text{ fmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) com todas as concentrações de Cer exógena utilizadas, o que sugere que apenas a Cer endógena seja substrato para a CerK residente na membrana basolateral. Na presença de NaF (inibidor de fosfatases), houve um aumento de aproximadamente 90 % na detecção da formação de C1P ($\sim 110 \text{ fmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), indicando a ação de uma fosfatase de C1P presente na membrana basolateral (Figura 22), levando assim a um balanço nas respostas celulares, como detalhado na introdução (GOMEZ-MUÑOZ, 2004; PETTUS *et al.*, 2004). Com base nestes dados, todos os experimentos de fosforilação de lipídios, para detecção de C1P, foram realizados na presença de NaF. Foi observada a formação de C1P de cadeia curta e C1P de cadeia longa. Como mencionado na seção 1.6 a cadeia de hidrocarboneto das ceramidas pode variar de tamanho, levando a diferentes respostas celulares dependendo do tamanho da cadeia de hidrocarboneto do esfingolipídio e tipo celular estudado.

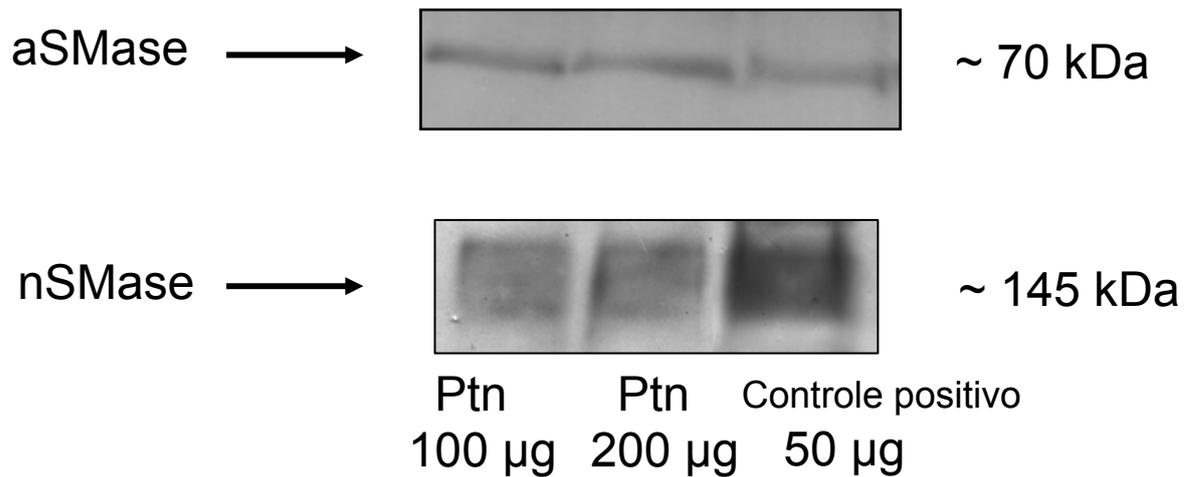


Figura 21. Presença das esfingomielinases ácidas e neutras na membrana basolateral.

A imunodeteção das esfingomielinases, ácidas e neutras, foi ensaiada como descrito em Material e Métodos, na presença de 100 µg e 200 µg de proteína. Foi utilizado como controle positivo para a esfingomielinase ácidas, homogenato de rins de porco (50 µg), e para a esfingomielinase neutra, homogenato de fígado (50 µg).

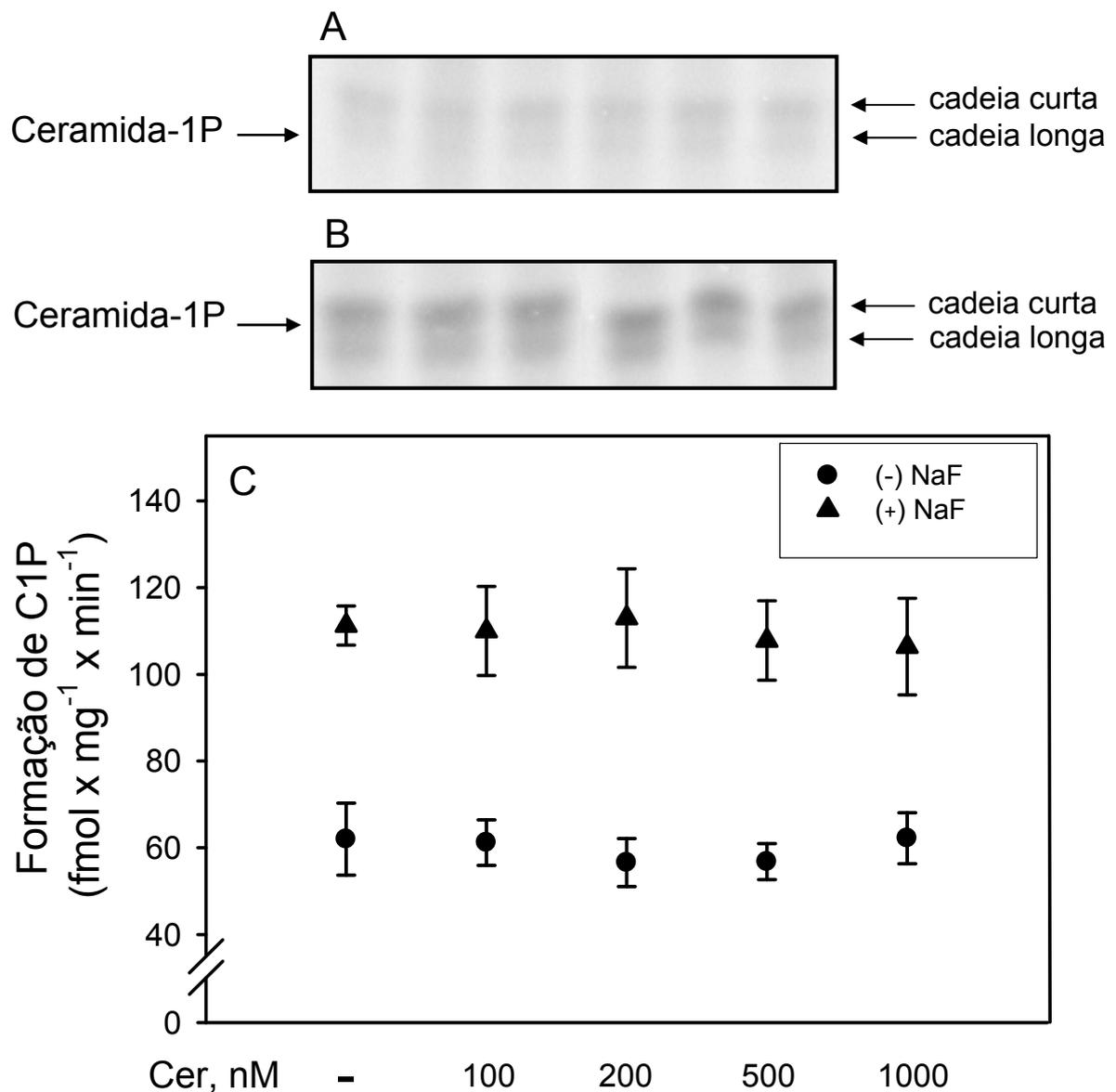


Figura 22. Formação de ceramida-1P na membrana basolateral.

O painel A e B são um autorradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC. O painel A mostra o aumento na formação de ceramida-1P quando na presença e ausência de ceramida exógena. O painel B mostra o aumento na formação de ceramida-1P quando na presença e ausência de ceramida exógena mais NaF. O painel C mostra a atividade da ceramida cinase que foi determinada como descrito em Material e Métodos, na presença e ausência de ceramida exógena e presença de ceramida exógena mais NaF. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de 5 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

No ensaio de fosforilação de lipídios, foi observada uma formação de C1P de $\sim 60 \text{ fmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ na ausência de NaF (Figura 22), sendo que apenas concentrações nanomolares de C1P exógena levaram à inibição da Na^+ -ATPase (medida realizada na ausência de NaF) (Figura 11).

É importante lembrarmos, que o aumento dos níveis de Cer endógenos se dá pela ativação de SMases ácidas e/ou neutras presentes na membrana basolateral (Figura 21), a partir daí, a CerK fosforila seu substrato Cer formado C1P. Como mencionado na seção 1.7.1, o que diferencia as SMases ácidas e neutras, é a sua localização na membrana e seu pH ótimo, sendo as SMases ácidas localizadas na face externa da bicamada lipídica com o pH ótimo de 4,5 – 5,5, e as SMases neutras localizadas na face interna da bicamada lipídica com o seu pH ótimo de 7,4.

A ação das duas SMases faz com que haja um aumento dos níveis endógenos de Cer e conseqüente aumento na formação de C1P, mas como também mencionado anteriormente, as SMases ácidas necessitam de pH ácido (entre 4,5 e 5,5) para sua plena ativação, estando provavelmente sub-ativadas nas condições do ensaio de fosforilação e extração de lipídios, que foi realizado em pH neutro (pH 7,2), ou seja, possivelmente nestas condições, não foi observada a ação das SMases ácidas na formação de C1P. As SMases neutras também estariam sub-ativadas nas condições utilizadas no ensaio, já que a enzima é inibida por Ca^{2+} e EDTA (CLARKE *et al.*, 2006), sendo tanto o Ca^{2+} quanto o EDTA utilizados para a medida da atividade de CerK, já que esta é descrita como uma enzima dependente de Ca^{2+} (BEKTAS *et al.*, 2003). As concentrações fmoles de C1P detectadas no ensaio de fosforilação e extração de lipídios, devem-se provavelmente ao fato das SMases ácidas e neutras estarem sub-ativadas nas condições de nosso ensaio de fosforilação e extração de lipídios, sendo estas condições propícias somente para o

melhor funcionamento de CerK (fosforilando Cer em C1P). Podemos então postular que a ação conjunta das SMases ácidas e neutras presentes na membrana basolateral, levam a um aumento na formação de Cer endógena e conseqüentemente a um maior aumento nos níveis de C1P, chegando até concentrações que poderiam resultar na inibição da Na^+ -ATPase.

Demonstrada a presença de uma atividade de CerK nas frações enriquecidas de membrana basolateral, passamos a investigar os requisitos necessários para a máxima atividade desta enzima, iniciando pela primeira vez sua caracterização em um compartimento bem definido das células renais. Foi realizada uma curva de concentrações crescentes de proteína que variaram de 0,05 a 0,3 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$, ensaio este realizado por 20 minutos à 37° C e pH 7,2, tempo máximo de reação, temperatura e pH utilizados nos experimentos de medida de atividade ATPásica e ativação de proteínas cinases. A fosforilação da Cer endógena, catalisada pela CerK, manteve-se linear em relação ao aumento da concentração de proteína (Figura 23), sendo então utilizada a concentração de 0,2 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ de proteína para os outros ensaios de caracterização de CerK, já que a concentração de 0,2 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ de proteína foi a concentração ótima utilizada por BEKTAS e colaboradores (2003) nos ensaios de fosforilação de lipídios, além desta concentração ser a concentração de proteína utilizada nos ensaios de medida da atividade ATPásica.

Na figura 24, foi realizado um curso temporal na presença (círculo) e na ausência (triângulo) de Cer exógena. Nos tempos de reação de 5 a 30 minutos, foi observado o mesmo nível de formação de C1P na ausência ou na presença de Cer exógena, sendo então escolhido o tempo de 20 minutos para os experimentos subseqüentes de caracterização de CerK, pois este é o tempo máximo de reação

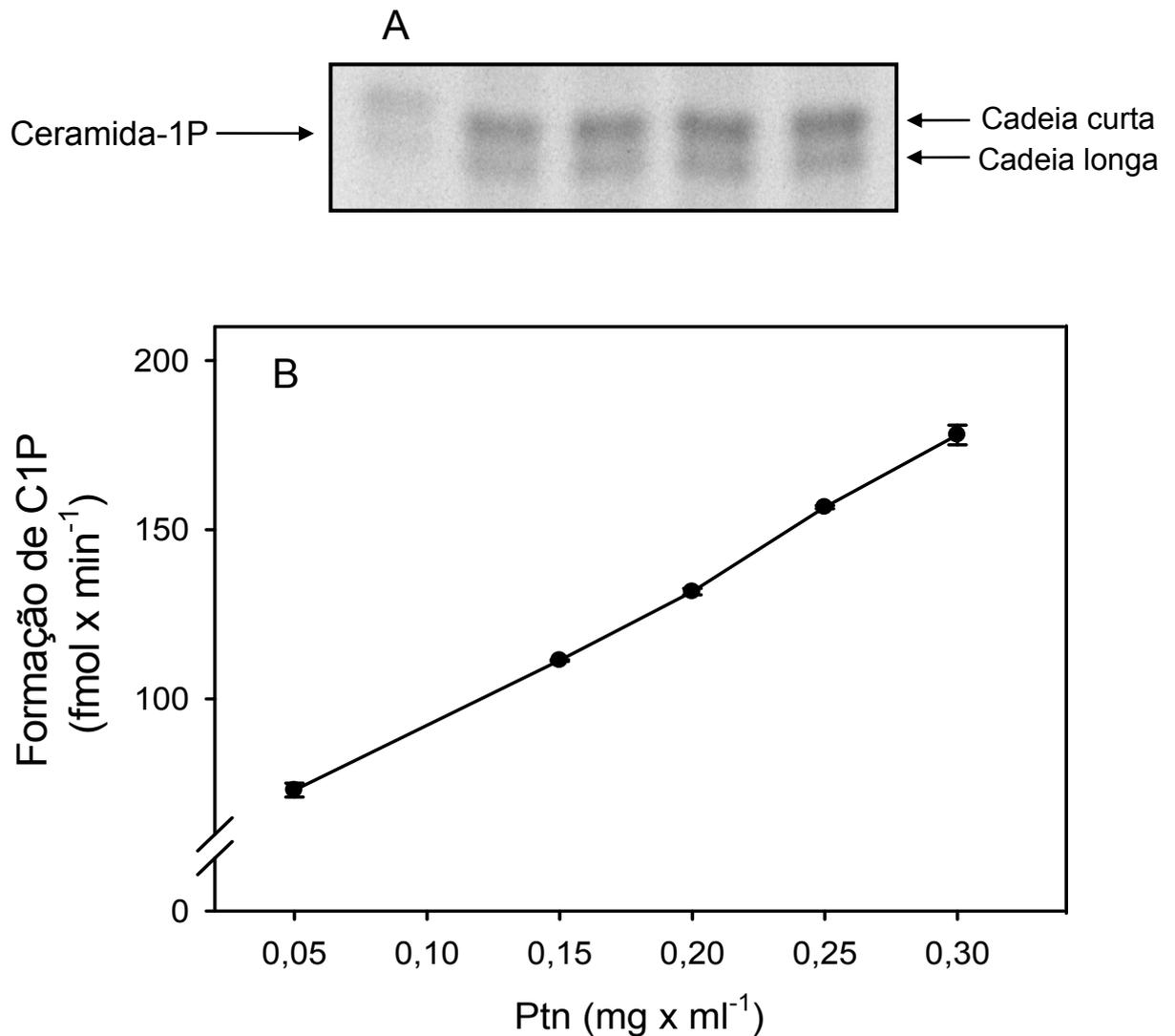


Figura 23. Dependência de proteína na atividade da CerK.

O painel A é um autoradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC, mostrando o aumento na formação de ceramida-1P, quando na presença de concentrações crescentes de proteína. O painel B mostra a atividade da ceramida cinase, quando as membranas basolaterais foram incubadas com concentrações crescentes de proteína, conforme indicado na abscissa da figura. O ensaio foi realizado na ausência de ceramida exógena e na presença de NaF (inibidor de fosfatases). A atividade da ceramida cinase foi medida no tempo de 20 min., temperatura de 37° C e pH 7,2. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão, de 6 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

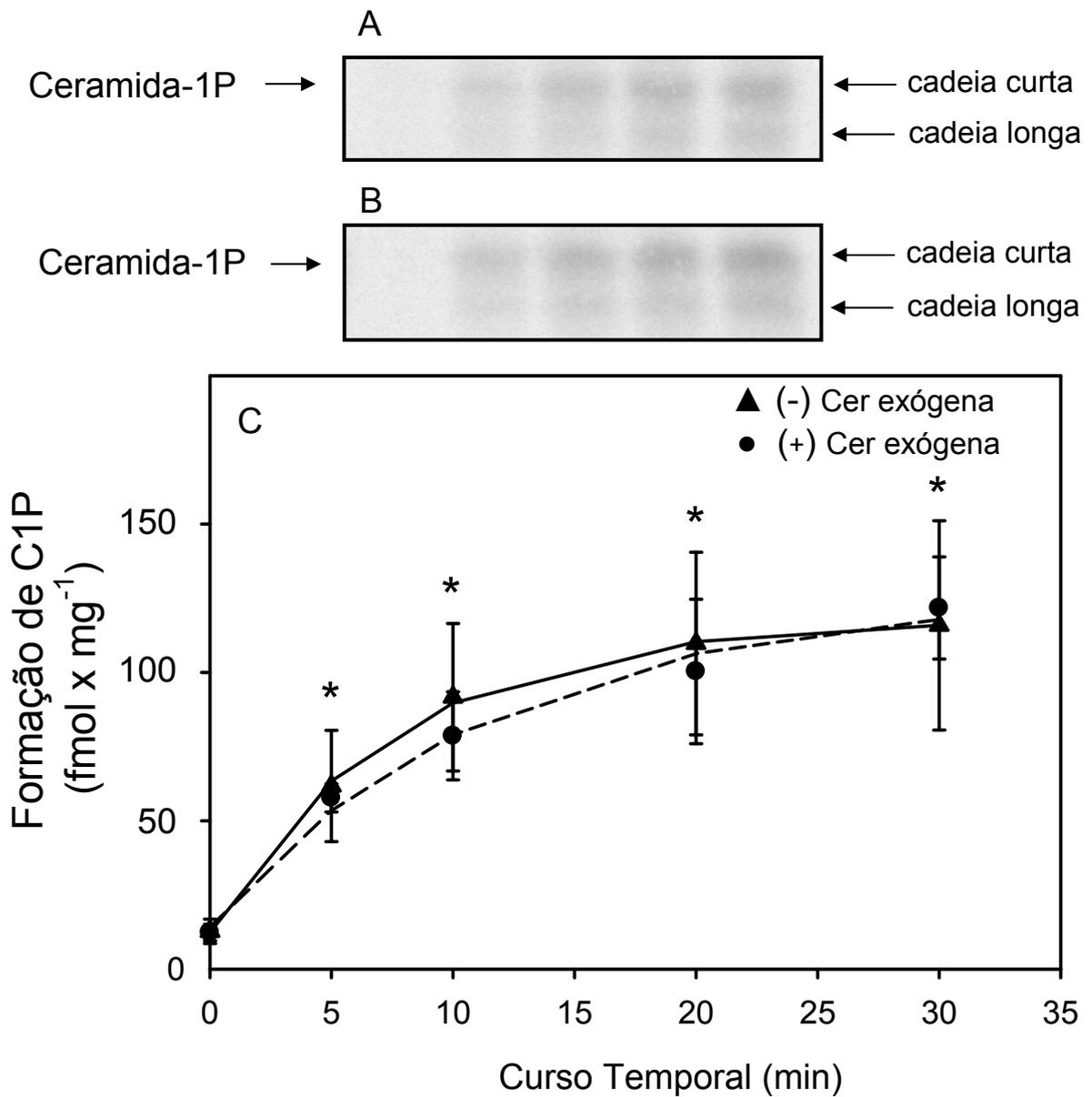


Figura 24. Curso temporal na atividade da CerK da membrana basolateral.

O painel A e B são um autoradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC. O painel A mostra o aumento na formação de ceramida-1P quando na ausência de ceramida exógena. O painel B mostra o aumento na formação de ceramida-1P quando na presença de ceramida exógena. O painel C mostra a atividade da ceramida cinase que foi determinada como descrito em Material e Métodos, na presença de NaF e na presença e ausência de ceramida exógena. Foi utilizado $0,2 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$, temperatura de 37°C e pH 7,2. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de 6 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

* indica os diferentes níveis de formação de C1P em relação ao tempo zero.

utilizado nos experimentos de medida de atividade ATPásica e de proteínas cinases. A observação do mesmo nível de formação de C1P na presença e na ausência de Cer exógena (Figura 24), confirma dados anteriores que mostram que a CerK residente na membrana basolateral fosforila apenas Cer endógena (Figura 22).

A atividade de CerK exibe um pH ótimo entre 6,5 e 7,2, levando a uma atividade máxima da enzima e formação de C1P ($\sim 120 \text{ fmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (Figura 25). É importante observarmos que na faixa de pH 5 – 5,5 (pH ótimo para a atividade das SMases ácidas), houve uma pequena formação de C1P, mostrando assim, uma pequena contribuição das SMases ácidas na formação de C1P.

O estudo da dependência da temperatura, mostra uma atividade baixa da CerK na temperatura de 25 °C, havendo acentuado aumento nas temperaturas entre 30 a 37 °C, como observado na Figura 26. Já na temperatura de 42 °C, observa-se uma diminuição significativa na atividade de CerK.

Ainda com o objetivo de investigar as funções ideais para a atividade de CerK, nosso próximo passo foi pesquisar quais moléculas, de sabida ação renal, possuem ação sobre o sistema de geração de ceramidas na membrana basolateral. Inicialmente, incubamos as membranas com concentrações circulantes de angiotensina II (100 pM), já que este autacóide tem, além de sua sabida ação renal, ação no aumento dos níveis de Cer em linhagem de células de feocromocitoma de ratos (LEHTONEN *et al.*, 1999). No entanto, não foi verificado qualquer incremento na formação de C1P, quando as membranas basolaterais foram incubadas com 100 pM angiotensina II isoladamente (ver terceira barra da figura 27) ou na presença de 200 nM Cer exógena (concentração de Cer que ativa a Ca^{2+} -ATPase (CABRAL *et al.*, 2007) e inibe a Na^{+} -ATPase (Figura 11A)) (ver quarta barra da figura 27).

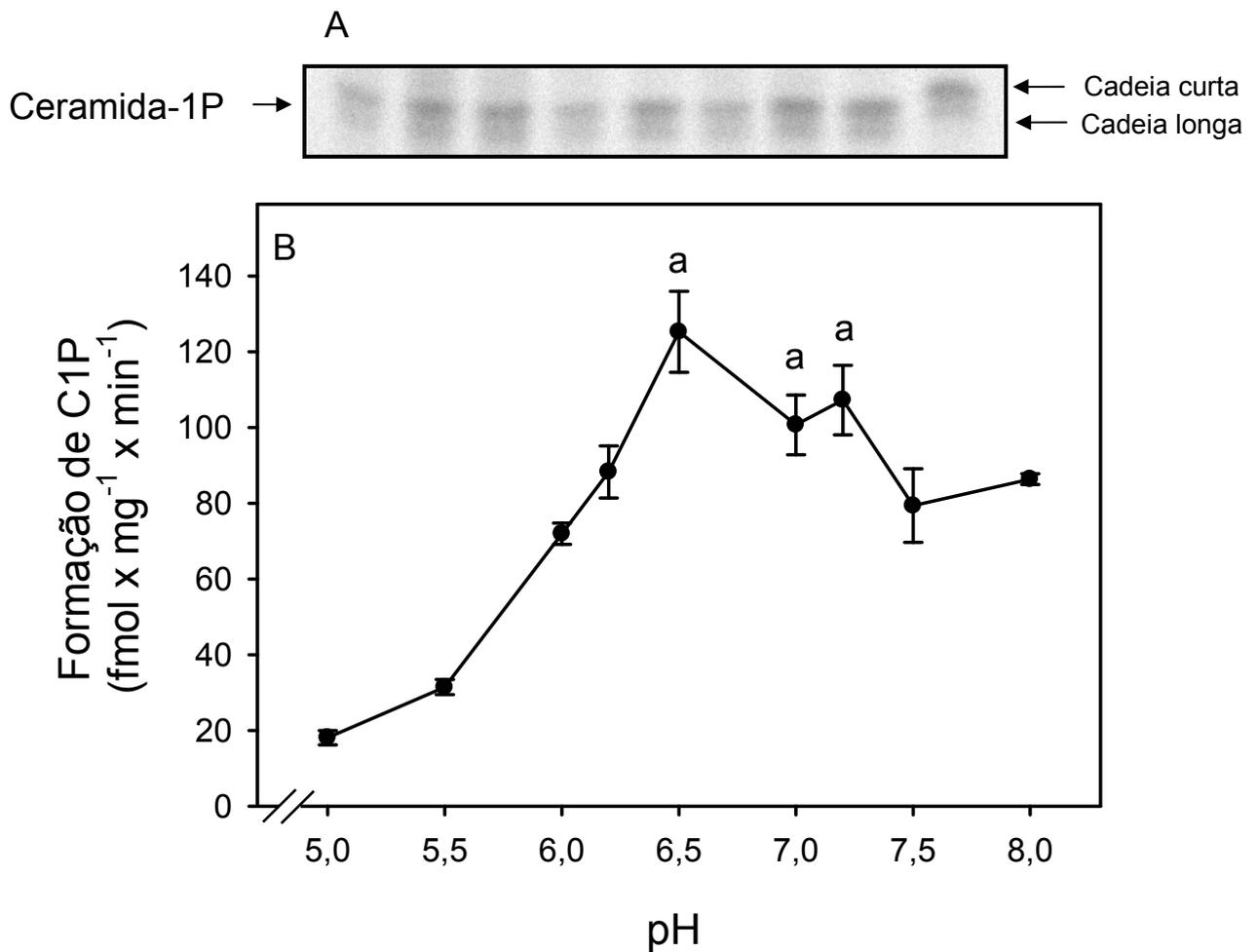


Figura 25. pH na atividade da CerK na membrana basolateral.

O painel A é um autorradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC, mostrando o aumento na formação de ceramida-1P quando na presença de diferentes faixas de pH (5 - 8). O painel B mostra a atividade da ceramida cinase que foi determinada como descrito em Material e Métodos, na ausência de ceramida exógena, presença de NaF (inibidor de fosfatase) e diferentes faixas de pH, como indicado na abscissa da figura. A atividade da ceramida cinase foi medida no tempo de 20 min., temperatura de 37° C e proteína 0,2 mg x ml⁻¹. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão, de 5 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

a – indica médias sem diferenças significativas entre si.

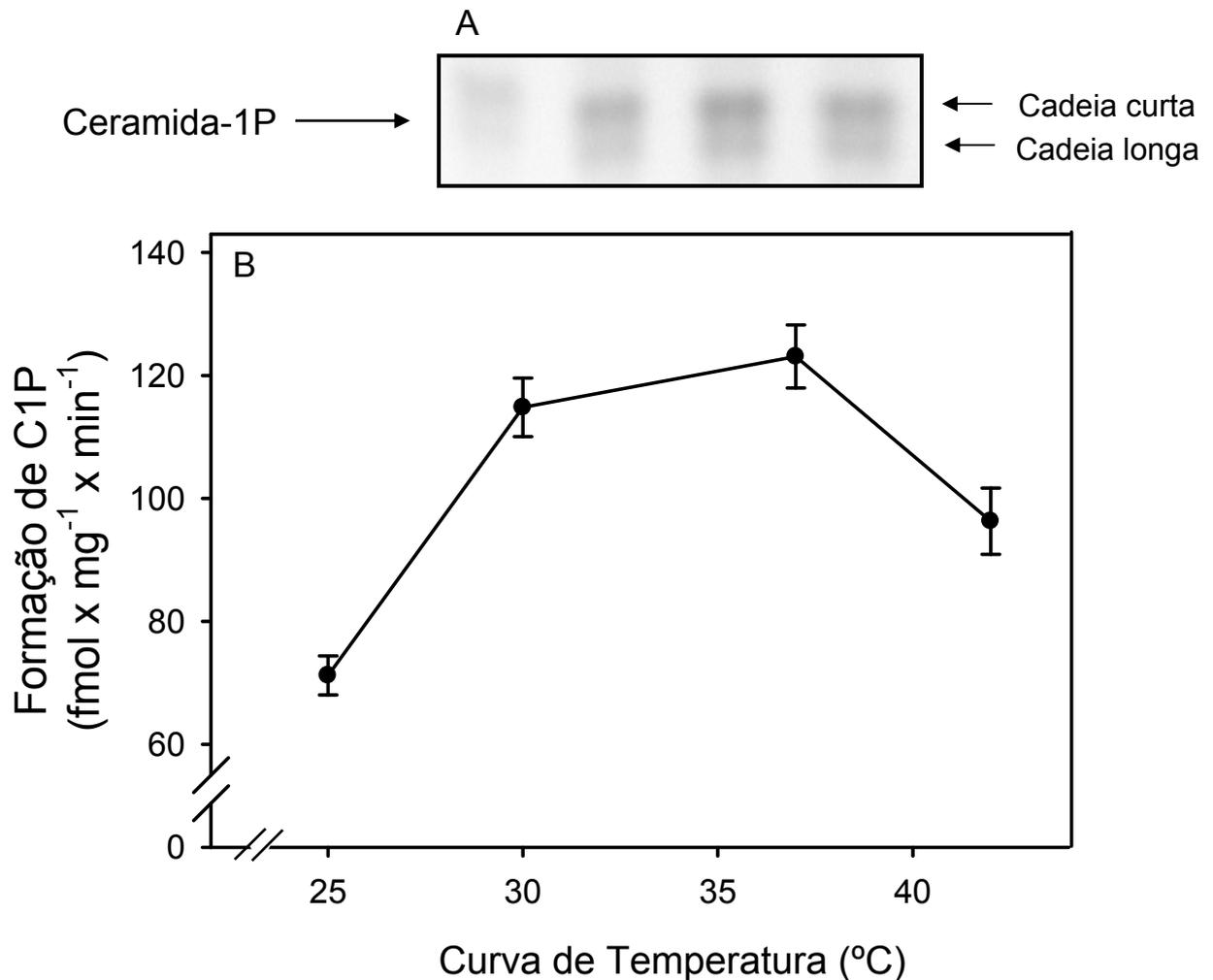


Figura 26. Temperatura na atividade da CerK na membrana basolateral.

O painel A é um autoradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC, mostrando o aumento na formação de ceramida-1P quando na presença de diferentes temperaturas (25 – 42 °C). O painel B mostra a atividade da ceramida cinase que foi determinada como descrito em Material e Métodos, na ausência de ceramida exógena, presença de NaF (inibidor de fosfatase) e diferentes temperaturas, como indicado na abscissa da figura. A atividade da ceramida cinase foi medida no tempo de 20 min., proteína 0,2 mg x ml⁻¹ e pH 7,2. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão, de 6 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

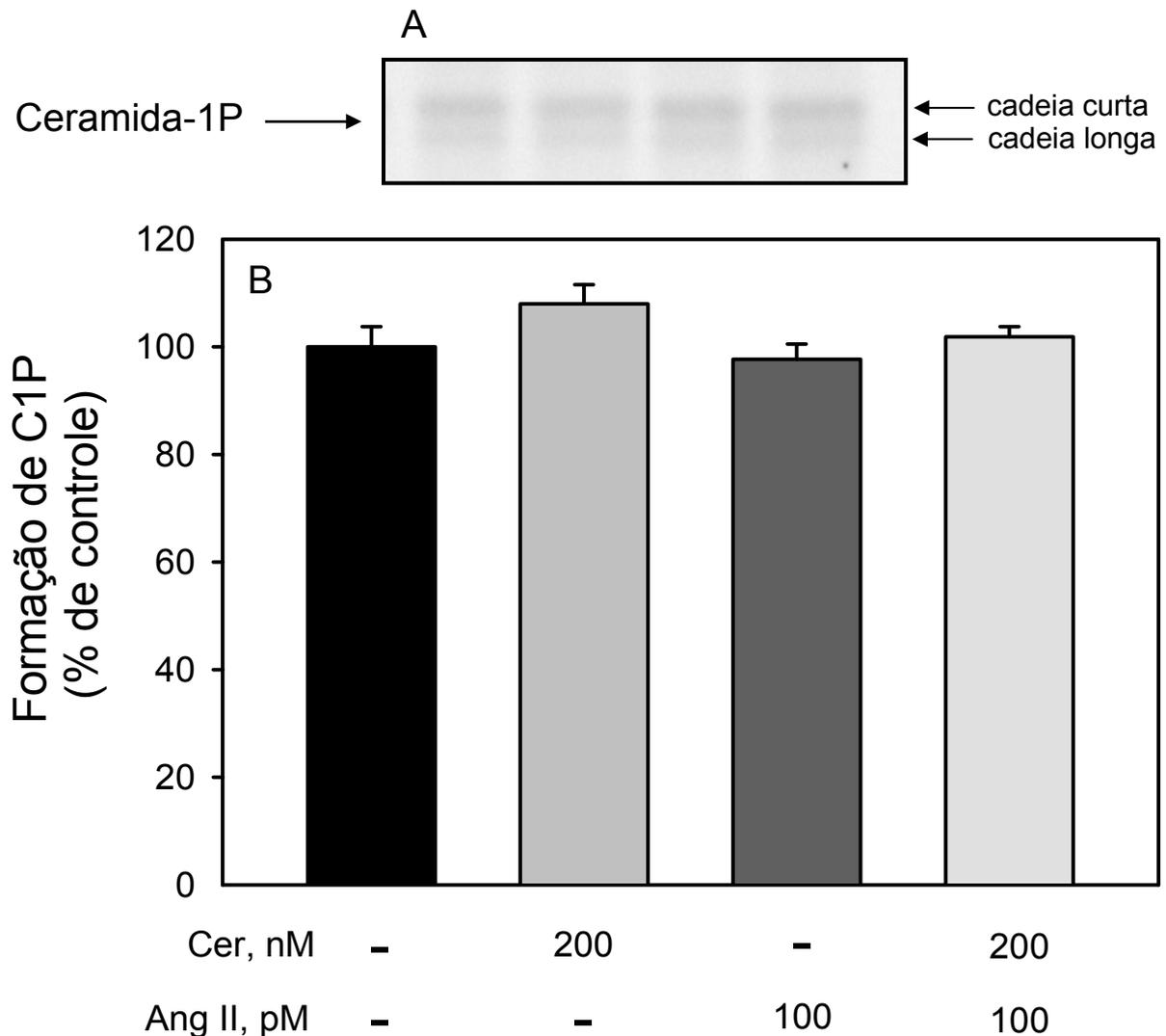


Figura 27. Angiotensina II (100 pM) não aumenta a formação de ceramida-1P na membrana basolateral.

O painel A é um autorradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC, mostrando a formação de ceramida-1P. O painel B mostra a atividade da ceramida cinase determinada como descrito em Material e Métodos, quando as membranas basolaterais foram incubadas com concentração de angiotensina II, nas combinações indicadas na abscissa da figura. O ensaio foi realizado na presença de NaF (inibidor de fosfatases). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de 6 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

A capacidade dos rins em reter angiotensina II na medula renal, pode levar a uma concentração local de angiotensina II em níveis bem altos (100 nM) (LEHTONEN *et al.*, 1999), o que nos levou a verificar o efeito desta concentração no aumento da formação de C1P. Para tanto, as membranas foram incubadas com 100 nM angiotensina II, como descrito em Material e Métodos. No entanto, não foi observado qualquer efeito desta concentração de angiotensina II na formação de C1P (ver terceira barra da figura 28), ausência de efeito também observada quando as frações de membranas foram tratadas com 200 nM Cer exógena mais 100 nM angiotensina II (ver quarta barra da figura 28).

Com o objetivo de encontrar um ativador fisiológico envolvido na via de sinalização de SMases e CerK na membrana basolateral, buscamos na literatura um hormônio modulador da via de sinalização envolvendo ceramidas. Dados da literatura mostram que: (1) o hormônio paratireoideano (PTH) leva à ativação da adenilato ciclase e formação de AMPc (MOREL & DOUCET, 1986); (2) o PTH, em células endoteliais, leva ao aumento das concentrações de Cer e estimula o influxo de Ca^{2+} (THROCKMORTON *et al.*, 2002); (3) a Cer estimula a reabsorção de Ca^{2+} em membrana basolateral através da ativação da PKA e conseqüente ativação da PMCA (CABRAL *et al.*, 2007). Baseado nestes dados, resolvemos avaliar o envolvimento da via de AMPc/PKA no aumento da formação de C1P.

O aumento dos níveis de AMPc leva à ativação da PKA, com provável ativação das SMases ácidas e neutras, o que aumentaria os níveis de Cer endógena, levando à ativação da CerK e aumento na formação de C1P. Para testar esta hipótese, incubamos as membranas basolaterais com 100 nM AMPc (clássico ativador da PKA), e em seguida realizamos ensaio de fosforilação e extração de lipídios. Foi observado um aumento na formação de C1P na presença de AMPc (ver

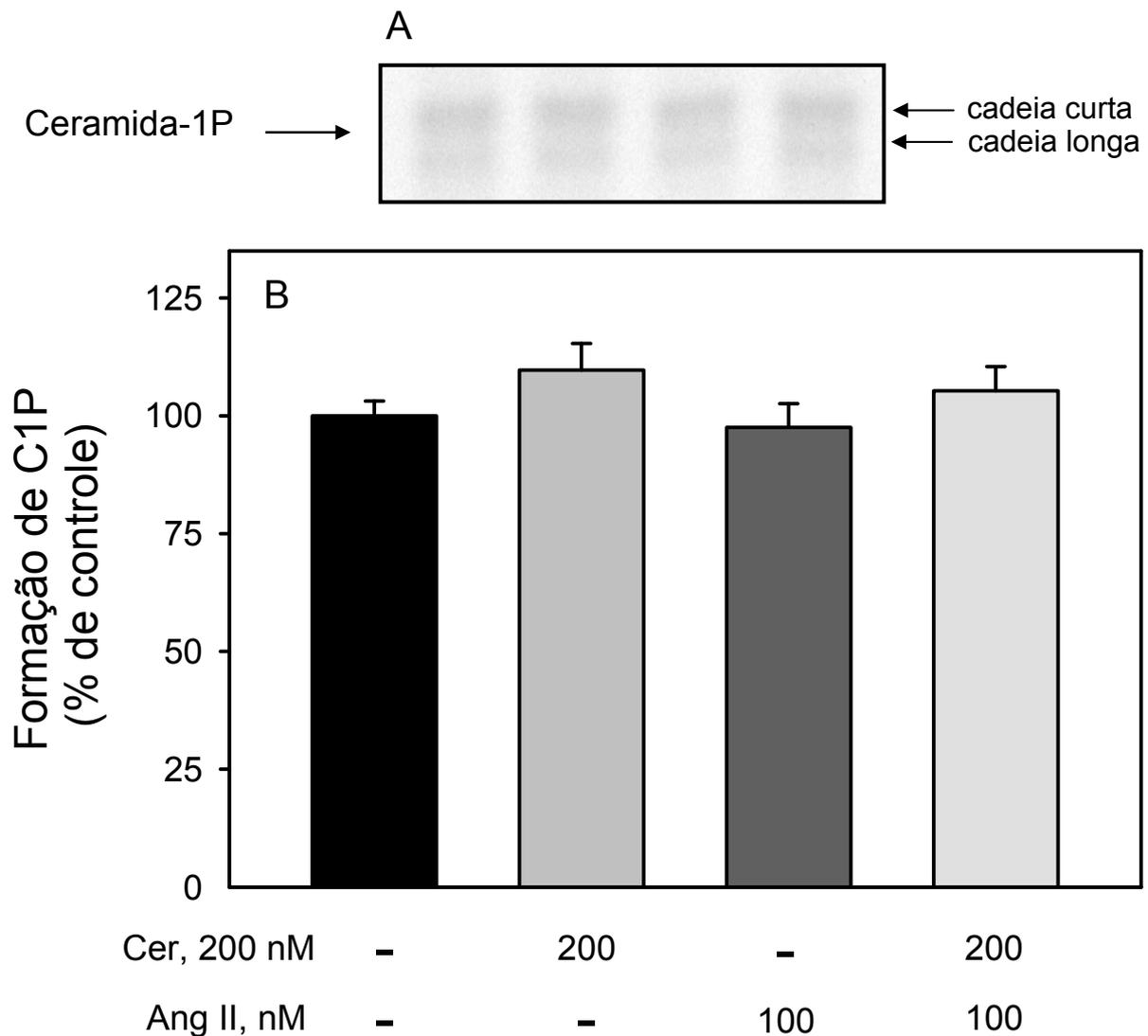


Figura 28. Angiotensina II (100 nM) não aumenta a formação de ceramida-1P na membrana basolateral.

O painel A é um autoradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC, mostrando a formação de ceramida-1P. O painel B mostra a atividade da ceramida cinase determinada como descrito em Material e Métodos, quando as membranas basolaterais foram incubadas com concentração de angiotensina II, nas combinações indicadas na abscissa da figura. O ensaio foi realizado na presença de NaF (inibidor de fosfatases). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de 6 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

segunda barra da figura 29), sendo esta ativação revertida quando as frações de membrana basolateral foram pré-tratadas com 10 nM PKAi (inibidor de PKA) antes da adição de AMPc (ver terceira barra da figura 29). Os resultados mostrados na figura 29, mostram o envolvimento da PKA (via aumento de AMPc), na via de geração de ceramidas presente em membrana basolateral. Este resultado indica que diferentes hormônios e autacóides com ação renal via ativação de PKA, poderiam ser potenciais ativadores da via de geração de ceramidas na membrana basolateral. Dentre estes possíveis moduladores, podemos sugerir não apenas o PTH, já comprovadamente relacionado ao aumento de Cer em outros tipos celulares, bem como angiotensina (1-7), que sabidamente modula processos na membrana basolateral via PKA (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000).

Assim ficamos com duas possibilidades: (1) a PKA ativaria a SMase aumentando assim os níveis de Cer endógena, o que possibilitaria a maior formação de C1P pela CerK, ou (2) a PKA fosforilaria a CerK promovendo sua maior ativação e aumento da formação de C1P. Nossos resultados ainda não nos permitem optar por uma destas alternativas, embora a primeira pareça ter a seu favor os dados reportados por HOLOPAINEM e colaboradores, em 1998, que mostram uma ativação preferencial de receptores acoplados à proteína Gs na ativação de SMases, conversão de SM em Cer e conseqüente formação de rafts.

A importância fisiológica deste trabalho é que a modulação do transporte de Na⁺ por ATPases presentes na membrana basolateral das células epiteliais renais, está diretamente relacionado a eventos de reabsorção e/ou secreção de solutos, participando assim da regulação do volume extracelular. Torna-se então importante, o estudo da modulação dessas ATPases, por Cer e C1P, que são esfingolipídios, envolvidos em processos de lesão e reparo tecidual, respectivamente.

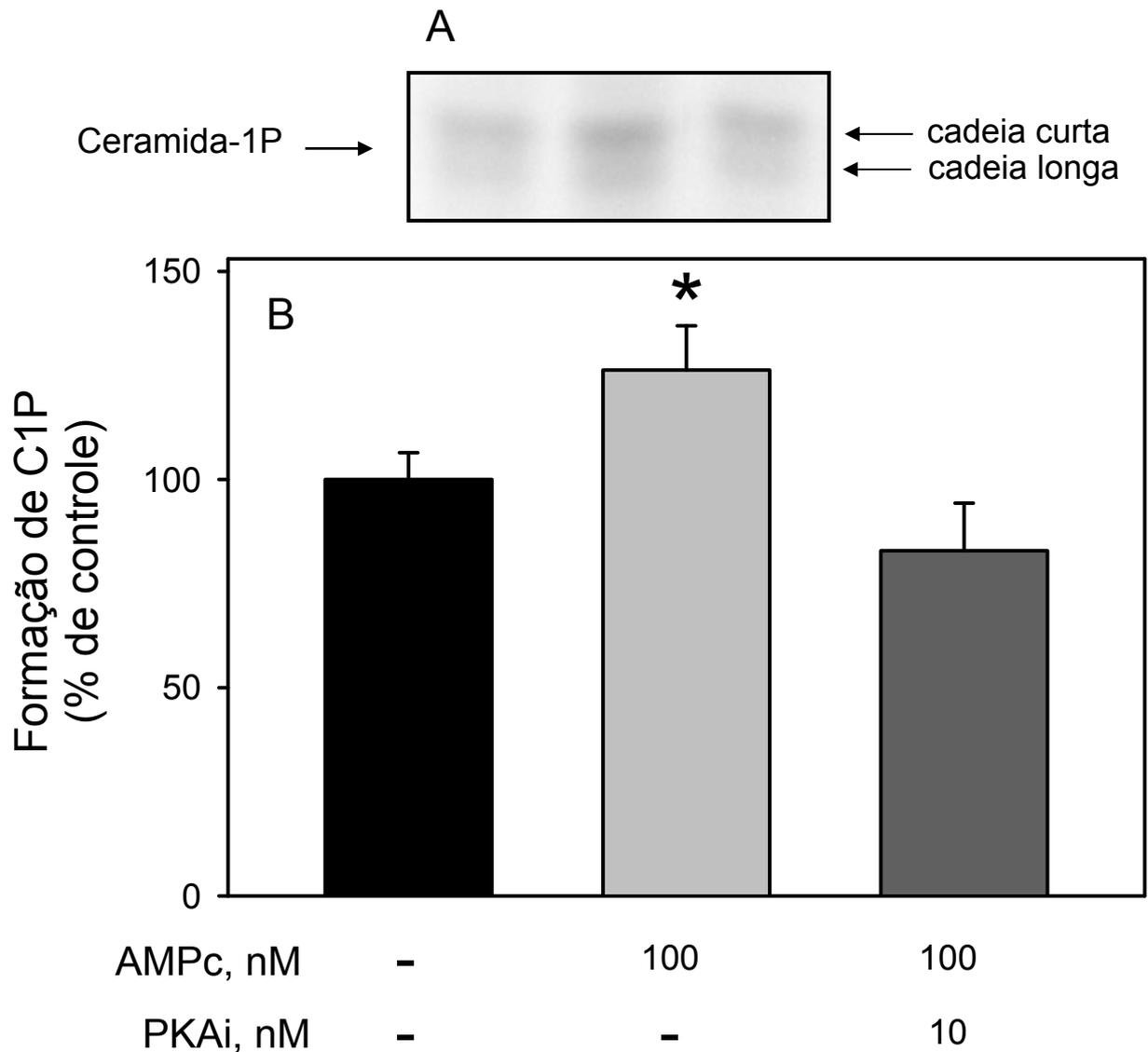


Figura 29. Aumento na formação de ceramida-1P na presença de AMPc.

O painel A é um autoradiograma representativo em “phosphor screen” de TLC, mostrando o aumento na formação de ceramida-1P. A medida da atividade da ceramida cinase foi determinada como descrito em Material e Métodos. Os experimentos foram realizados na presença e na ausência de AMPc e PKAi, nas combinações indicadas na abscissa da figura (Painel B). O ensaio foi realizado na presença de NaF (inibidor de fosfatases). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de 6 experimentos diferentes feitos, com diferentes preparações de membrana basolateral.

* indica o diferente nível de formação de C1P em relação ao controle.

5 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos nesta tese chegamos às seguintes conclusões, posteriormente esquematizadas nas figuras 30, 31 e 32:

1- Nem a Cer e nem a C1P exógenas são capazes de modular a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em nosso modelo biológico.

2- A Cer exógena ativa a PKC atípica (dependente de esfingolipídios) (PKC1) e/ou a PKC novel (dependente de diacilglicerol) (PKC2) presentes na membrana basolateral, mas estas parecem não influenciar a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$.

3- A Cer exógena ativa a PKA1 (PKA não ativada por AMPc) e esta ativação leva à inibição da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$.

4- A C1P exógena ativa a PKA2 (PKA ativada por AMPc), mas esta parece não influenciar a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$.

5- A C1P exógena inibe a PKC novel (dependente de diacilglicerol) (PKC2), e possivelmente ativa a PKC atípica (dependente de esfingolipídios) (PKC1), sendo a resposta da inibição da PKC novel pela C1P maior do que a ativação da PKC atípica pela C1P, devido possivelmente, ao maior número de isoformas de PKC novel do que PKC atípica presentes na membrana basolateral. A possível ativação da PKC1 por C1P leva à inibição da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$.

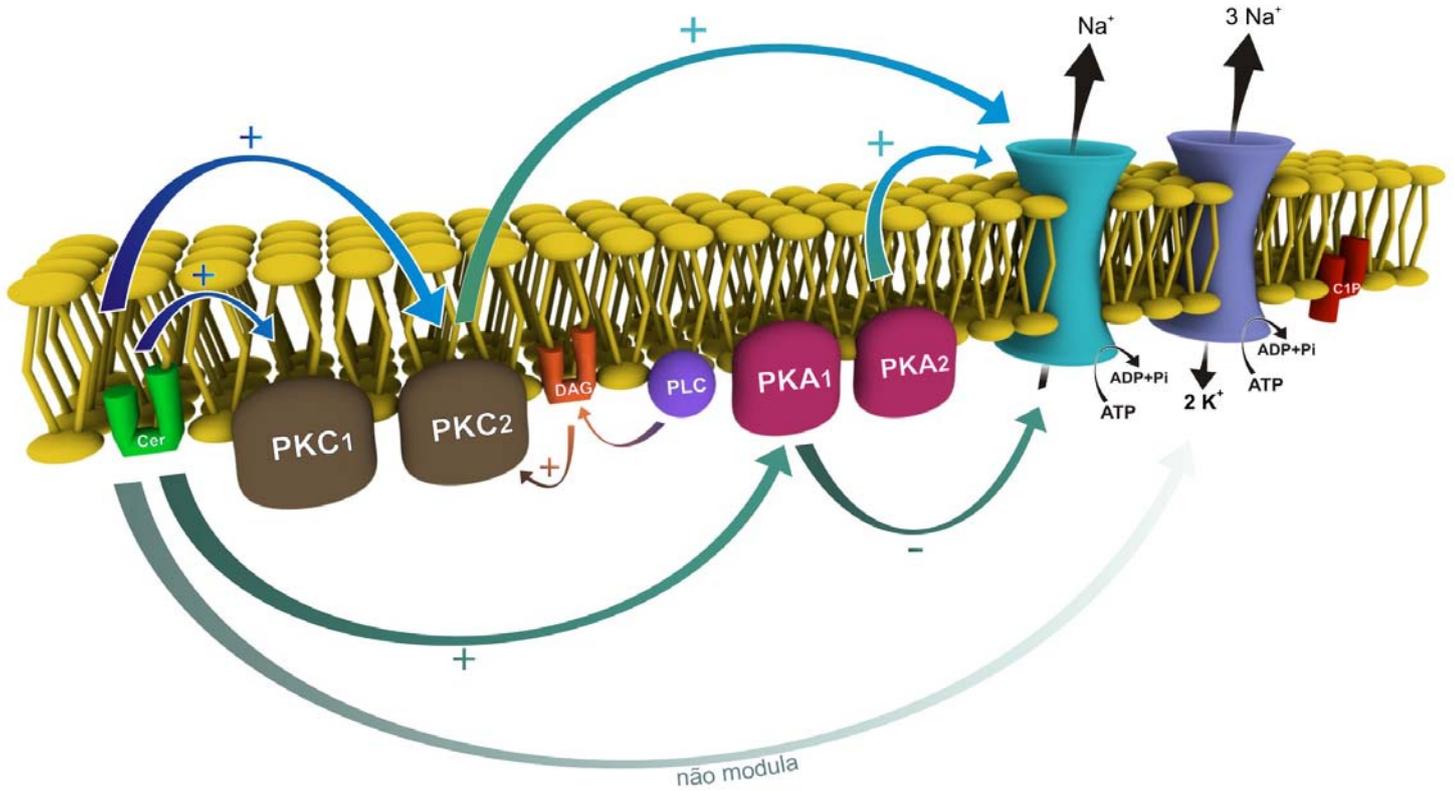
6- Na membrana basolateral há a presença das SMases ácidas (localizadas na face externa da bicamada lipídica, com o pH ótimo entre 4,5 – 5,5), das SMases neutras (localizadas na face interna da bicamada lipídica, com o pH ótimo de 7,4),

da CerK (fosforilando Cer em C1P) e, de fosfatases ativas (defosforilando C1P em Cer).

7- Ativadores da via de sinalização do AMPc, levam ao aumento na formação de C1P por ativação das SMases ou por ativação da CerK.

A partir dos dados da literatura e daqueles obtidos neste trabalho, podemos apresentar a membrana basolateral como um modelo biológico dotado de sistemas de respostas fisiológicas rápidas, pois nela se encontram todos os componentes envolvidos em importantes vias de sinalização celular, modulando por exemplo, Ca^{2+} -ATPase, Na^{+} -ATPase, PKC, PKA, PKB, dentre outros, além de uma maquinaria completa na geração dos esfingolipídios bioativos, Cer (SMases) e C1P (CerK). É importante ressaltar que, ao que nos foi possível verificar, esta é a primeira vez que é mostrada a modulação da Na^{+} -ATPase por ceramidas e a presença das diferentes isoformas de PKC na membrana basolateral das células epiteliais renais, além da formação de C1P pela PKA.

Meio extracelular

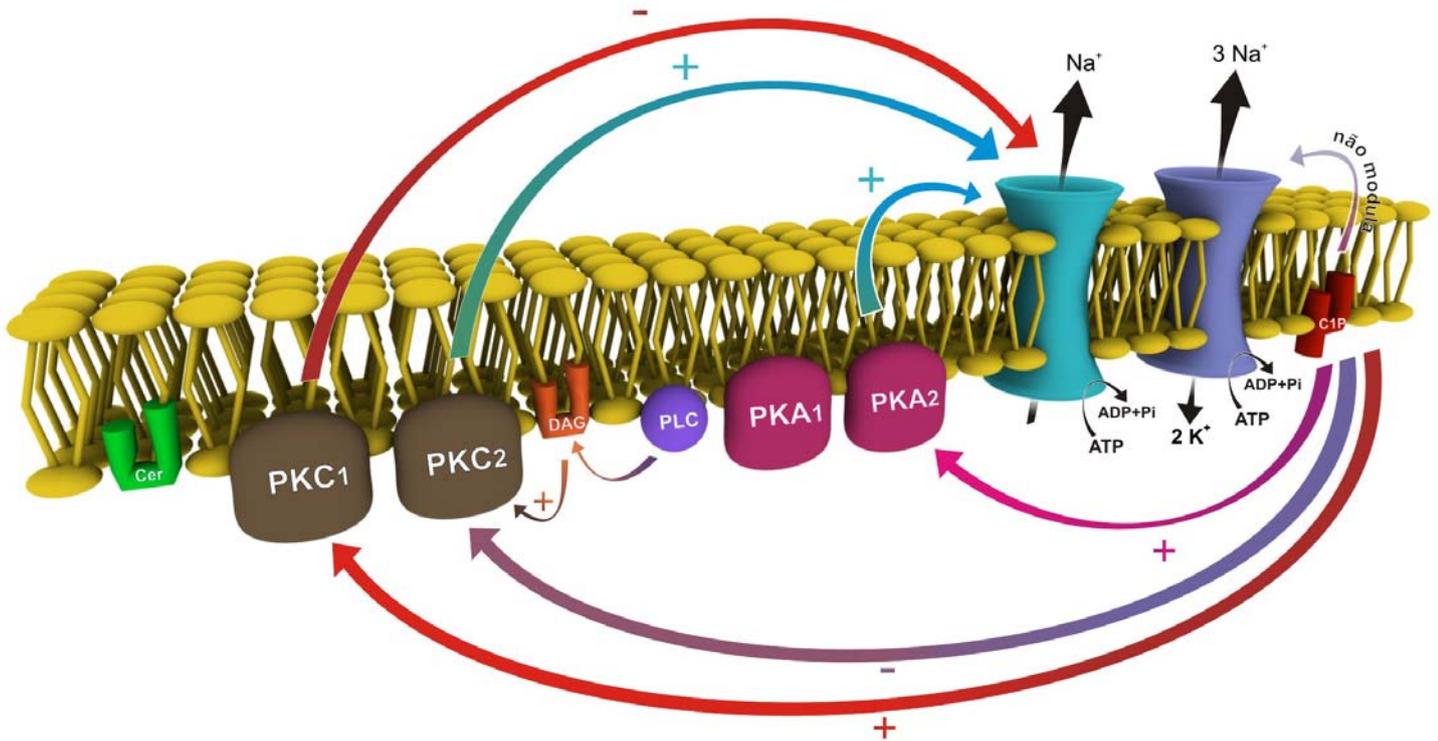


Meio intracelular

Figura 30. Modelo proposto para a modulação da atividade da Na⁺-ATPase de membrana basolateral por Ceramida.

A ceramida (U) ativa PKA independente de AMPc e PKCs novel e atípica. PKA ativada por ceramida inibe a Na⁺-ATPase de membrana basolateral. A (Na⁺/K⁺)ATPase presente na membrana basolateral não é modulada por ceramida (desenhado por Daniel Viégas).

Meio extracelular

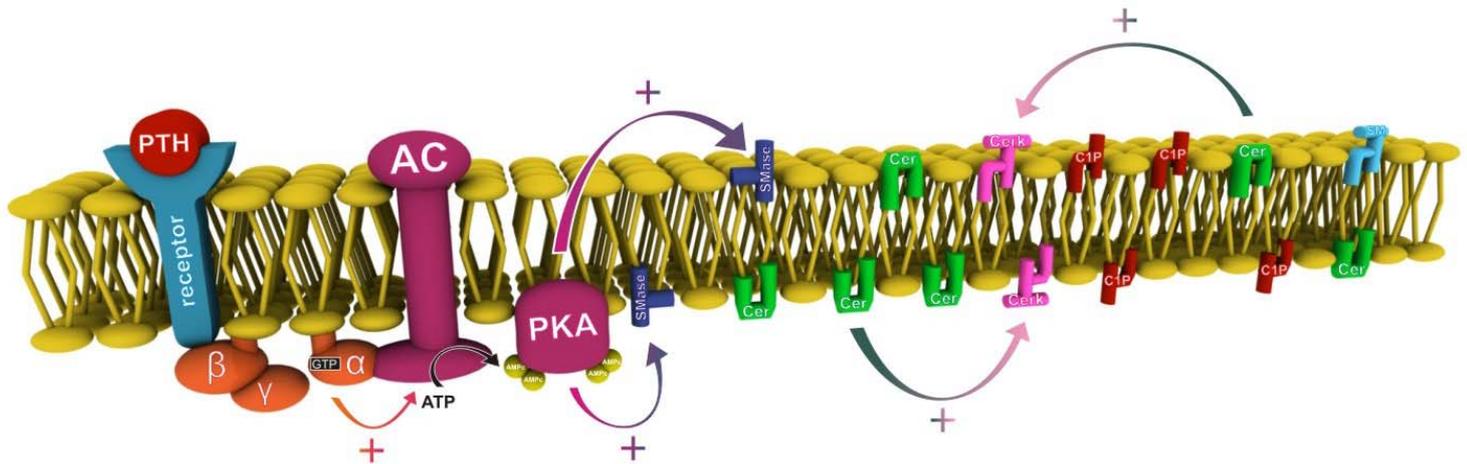


Meio intracelular

Figura 31. Modelo proposto para a modulação da atividade da Na^+ -ATPase de membrana basolateral por ceramida-1P.

A ceramida-1P (P) ativa PKA dependente de AMPc e modula PKCs novel e atípica. A ceramida-1P inibe a Na^+ -ATPase via PKC atípica. A $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ presente na membrana basolateral não é modulada por ceramida-1P (desenhado por Daniel Viégas).

Meio extracelular



Meio intracelular

Figura 32. Modelo proposto para a geração de ceramidas na membrana basolateral.

Há a presença tanto das SMases ácidas e neutras () quanto da CerK () na membrana basolateral de túbulos proximais renais. Dados de Holopainem e colaboradores (1998), nos permite postular que a ativação da PKA estaria levando à ativação das SMases ácidas e neutras, convertendo SM em Cer (), e o aumento dos níveis de Cer estaria levando à ativação da CerK, que fosforilaria a Cer em C1P () (desenhado por Daniel Viégas).

REFERÊNCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. p.1294.
- Almeida-Amaral, E.E., Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Pinheiro, C.M., Meyer-Fernandes, J.R. (2007) *Leishmania amazonensis*: PKC-like protein kinase modulates the (Na⁺+K⁺)ATPase activity. *Exp. Parasitol.* **116**: 419-426.
- Andrieu-Abadie, N., Gouazé, V., Salvayre, R., Levade, T. (2001) Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med.* **31**: 717-728.
- Aperia, A. (2007) New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J. Intern. Med.* **261**: 44-52.
- Aperia, A., Holtback, U., Syren, M.L., Svensson, L.B., Fryckstedt, J., Greengard, P. (1994) Activation/deactivation of renal Na⁺+K⁺-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J.* **8**: 436-439.
- Arystarkhova, E. & Sweadner, K.J. (2005) Splice Variants of the Gamma Subunit (FXD2) and Their Significance in Regulation of the Na,K-ATPase in Kidney. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**: 381-386.
- Assunção-Miranda, I., Guilherme, A.L., Reis-Silva, C., Costa-Sarmiento, G., Oliveira, M.M., Vieyra, A. (2005) Protein Kinase C-mediated inhibition of renal Ca²⁺-ATPase by physiological concentrations of angiotensin II is reversed by AT1- and AT2- receptor antagonists. *Regul. Pept.* **127**: 151-157.
- Barenholz, Y., Roitman, A., Gatt, S. (1966) Enzymatic Hydrolysis of Sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. *J. Biol. Chem.* **241**: 3731-3737.
- Baumruker, T., Bornancin, F., Billich, A. (2005) The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses. *Immunol. Lett.* **96**: 175-185.
- Bektas, M., Jolly, P.S., Milstien, S., Spiegel, S. (2003) A specific ceramide kinase assay to measure cellular levels of ceramide. *Analytic. Biochem.* **320**: 259-265.
- Benito, B., Quintero, F.J., Rodriguez-Navarro, A. (1997) Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. *Biochim. Biophys. Acta.* **1328**: 214-226.
- Bollinger, C.R., Teichgräber, V., Gulbins, E. (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1746**: 284-294.

- Borgatti, A.R., Trigari, G., Pagliarani, A., Varella, V. (1985) Ouabaininsensitive Na⁺ stimulation of a microsomal Mg²⁺-ATPase in gills of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **81**: 127–135.
- Borioli, G.A., Fanani, M.L., Caputto, B.L., Maggio, B. (2002) c-fos is a surface pressure-dependent diverter of phospholipase activity. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **295**: 964-969.
- Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Stora, S., Graf, C., Wlachos, A., Dévay, P., Urtz, N., Baumruker, T., Billich, A. (2005) Characterization of a ceramide kinase-like protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1687**: 31– 43.
- Boumendil-Podevin, E. F. & Podevin, R. A. (1983) Isolation of basolateral and brush-border membranes from the rabbit kidney cortex: vesicles integrity and membrane sidedness of the basolateral fraction. *Biochim. Biophys. Acta* **735**: 86–94.
- Bourbon, N.A., Yun, J., Kester, M. (2000) Ceramide directly activates protein kinase C ζ to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 35617-35623.
- Brenner, B.M. & Rector, F.C. The kidney. 1 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 586-647.
- Cabral, L.M., Wengert, M., Da Ressurreição, A.A., Feres-Elias, P.H., Almeida, F.G., Vieyra, A., Caruso-Neves, C., Einicker-Lamas, M. (2007) Ceramide is a potent activator of plasma membrane Ca²⁺-ATPase from kidney-proximal tubule cells with protein kinase A as an intermediate. *J. Biol. Chem.* **282**: 24599-24606.
- Canaves, J.M. & Taylor, S.S. (2002) Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J. Mol. Evol.* **54**: 17-29.
- Caputto, R., Maccioni, A.H.R., Caputto, B.L. (1977) Activation of deoxycholate solubilized adenosine triphosphatase by ganglioside and asialoganglioside preparations. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **74**: 1046-1053.
- Caruso-Neves, C., Francisco-Pedro, L.G., Souza, L.P., Chagas, C., Lopes, A.G. (1997) Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1329**: 336-344.
- Caruso-Neves, C., Meyer-Fernandes, J.R., Saad-Nehme, J., Proverbio, F., Marín, R., Lopes, A.G. (1998) Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **119**: 807–811.

- Caruso-Neves, C., Siqueira, A.S.E., Iso-Cohen, G., Lopes, A.G. (1999a) Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1431**: 483-491.
- Caruso-Neves, C., Einicker-Lamas, M., Chagas, C., Oliveira, M.M., Vieyra, A., Lopes, A.G. (1999b) Ouabain-insensitive Na⁽⁺⁾-ATPase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Z. Naturforsch [C]*. **54**: 100-104.
- Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Rangel, L.B., Grossi, A.L., Lopes, A.G. (2000) Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1467**: 189-197.
- Caruso-Neves, C., Silva, I.V., Morales, M.M., Lopes, A.G. (2001) Cytoskeleton elements mediate the inhibition of the (Na⁺⁺K⁺)atpase activity by PKC in *Rhodnius prolixus* malpighian tubules during hyperosmotic shock. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **48**: 81-88.
- Caruso-Neves, C., Coelho-Souza, S.A., Vives, D., Goes, G., Lara, L.S., Lopes, A.G. (2002) Modulation of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg²⁺, Mg.ATP and furosemide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **4**: 1586-1593.
- Caruso-Neves, C., Malaquias, A.T., Loss, F.F., Corea Da Costa, V.M., Gomes, V.O., Lopes, A.G. (2003) Bradykinin B₁ receptor stimulates the proximal tubule Na⁺-ATPase activity through protein kinase C pathway. *Regul. Pept.* **115**: 195-201.
- Caruso-Neves, C., Kwon, S.H., Guggino, W.B. (2005) Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT₂ receptor-mediated protein kinase B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**: 17513-17518.
- Caruso-Neves, C., Pinheiro, A.A.S., Cai, H., Souza-Menezes, J., Guggino, W.B. (2006) PKB and megalin determine the survival or death of renal proximal tubule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**: 18810-18815.
- Catty, P. & Goffeau, A. (1996) Identification and phylogenetic classification of eleven putative P-type calcium transport ATPase genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Rep.***16**: 75-85.
- Chalfant, C.E., Kishikawa, K., Mumby, M.C., Kamibayashi, C., Bielawska, A., Hannun, Y.A. (1999) Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **274**: 20313-20317.
- Clarke, C.J., Snook, C.F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., Hannun, Y.A. (2006) The Extended Family of Neutral Sphingomyelinases. *Biochemistry*. **Vol. 45, Nº 38**: 11247-11256.

- Colina, C., Cervino, V., Benaim, G. (2002) Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane Ca²⁺-ATPase from human erythrocytes. *Biochem J.* **362**: 247-251.
- Colombaioni, L. & Garcia-Gil, M. (2004) Sphingolipid metabolites in neural signaling and function. *Brain Res. Rev.* **46**: 328-355.
- Cornelius, F. (2001) Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase Activity by Phospholipids and Cholesterol. I. Steady-State Kinetics. *Biochemistry.* **40**: 8842-8851.
- Cornelius, F. (2008) Cholesterol-Dependent Interaction of Polyunsaturated Phospholipids with Na,K-ATPase. *Biochem.* **47**: 1652-1658.
- Cornelius, F., Turner, N., Christensen, H.R. (2003) Modulation of Na,K-ATPase by phospholipids and cholesterol. II. Steady-state and presteady-state kinetics. *Biochemistry.* **42**: 8541-8549.
- Cortes, V.F., Veiga-Lopes, F.E., Barrabin, H., Alves-Ferreira, M., Fontes, C.F. (2006) The gamma subunit of Na⁺, K⁺-ATPase: role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**: 1901-1913.
- Costa, C.J., Gatto, C., Kaplan, J.H. (2003) Interactions between Na,K-ATPase alpha subunit ATP-binding domains. *J. Biol. Chem.* **278**: 9176-9184.
- Danielli, J.F. & Davson, H. (1935) A contribution to the theory of permeability of thin film. *J. Cell Physiol.* **5**: 495-508.
- De Souza, A.M., Batista, E.J., Pinheiro, A.A., Carvalhaes, M., Lopes, A.G., De Souza, W., Caruso-Neves, C. (2007a) Entamoeba histolytica: ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity. *Exp. Parasitol.* **117**: 195-200.
- De Souza, A.M., Carvalho, T.L., Sabino, P.M., Vives, D., Fontes, C.F., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2007b) Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase in MDCK I cells. *Biochimie.* **89**: 1425-1432.
- Del Castillo, J.R., Marín, R., Proverbio, T., Proverbio, F. (1982) Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **692**: 61-68.
- Einicker-Lamas, M., Wenceslau, L.D., Bernardo, R.R., Nogaroli, L., Guilherme, A., Oliveira, M.M., Vieyra, A. (2003) Sphingosine-1-phosphate formation activates phosphatidylinositol-4 kinase in basolateral membranes from kidney cells: crosstalk in cell signaling through sphingolipids and phospholipids. *J. Biochem. (Tokyo)* **134**: 529-536.
- Férraille, E. & Doucet, A. (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* **81**: 345-418.

- Futerman, A. & Hannun, Y.A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**: 777-782.
- Geering, K., Theulaz, I., Verrey, F., Häuptle, M.T., Rossier, B.C. (1989) A role for the β -subunit in the expression of functional Na-K-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **257**: 851-858.
- Geering, K., Beggah, A., Good, P., Girardet, S., Roy, S., Schaer, D., Jaunin, P. (1996) Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: function interaction of the cytoplasmic NH₂ terminus of the b subunit with the a subunit. *J. Cell Biol.* **133**: 1193-1204.
- Gimmler, H. (2000) Primary sodium plasma membrane ATPases in salt-tolerant algae: facts and fictions. *J. Exp. Bot.* **51**: 1171-1178.
- Gomez-Muñoz, A. (2004) Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett.* **562**: 5-10.
- Gofi, F.M. & Alonso, A. (2002) Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Letters.* **531**: 38-46.
- Gorter, E. & Grendel, F. (1925) On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* **41**: 439-443.
- Grubmeyer, C. & Penefsky, H.S. (1981) The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatic. *J. Biol. Chem.* **256**: 3718-3727.
- Guilherme, A., Reis-Silva, C., Moraes-Albuquerque, J.H., Oliveira, M.M., Vieyra, A. (1998) A novel phosphorylated lipid counteracts activation of the renal plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)ATPase by endogenous phosphatidylinositol-4-phosphate. *Biosci. Rep.* **18**: 79-89.
- Holopainen, J.M., Subramanian, M., Kimmunen, P.K. (1998) Sphingomyelinase induces lipid microdomains formation in a fluid phosphatidylcholine-sphingomyelin membrane. *Biochemistry.* **37**: 17562-17570.
- Holthuis, J.G.M., Pomorski, T., Raggars, J.R., Sprong, H., Meer, G.V. (2001) The organizing potencial of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol. Rev.* **81**: 1689-1723.
- Horisberger, J.D. (2004) Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium pump. *Physiol.* **19**: 377-387.
- Huwiler, A., Fabbro, J., Pfeilshifter, J. (1998) Selective ceramide binding to protein kinase C-alpha and -delta isoenzymes in renal mesangial cells. *Biochemistry* **37**: 14556-14562.

- Jorgensen, P., Hakansson, K., Karlsh, S. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**: 817–849.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 511-535.
- Kolesnick, R.N. & Krönke, M. (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Ann. Rev. Physiol.* **60**:643-665.
- Kolesnick, R.N., Goni, F.M, Alonso, A. (2000) Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell Physiol.* **184**: 285-300.
- Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 282-295.
- Lara, L.S., De Carvalho, T., Leão-Ferreira, L. R., Lopes, A.G, Caruso-Neves, C. (2005) Modulation of the (Na(+)+K+)ATPase activity by Angiotensin-(1-7) in MDCK cells. *Regul. Pept.* **129**: 221-226.
- Lara, L.S., Correa, J.S., Lavelle, A.B., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2008) The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidyl inositol phospholipase C β -protein kinase C pathway is involved in activation of proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1-7) in pig kidneys. *Exp. Physiol.* **93**: 639-647.
- Lehtonen, J.Y., Horiuchi, M., Daviet, L., Akishita, M., Dzau, V.J. (1999) Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 16901-16906.
- Leon, A., Facci, L., Toffano, G., Sonnino, S., Tettamanti, G. (1981) Activation of (Na⁺,K⁺)-ATPase by nanomolar concentrations of GM1 ganglioside. *J. Neurochem.* **37**: 350-357.
- Levade, T. & Jaffrézou, J.P. (1999) Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim. Biophys. Acta.* **1438**: 1-17.
- Líbano-Soares, J.D., Gomes-Quintana, E., Melo, H.K., Queiroz-Madeira, E.P., Roubach, R.G., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2008) B(2) receptor-mediated dual effect of bradykinin on proximal tubule Na⁺-ATPase: Sequential activation of the phosphoinositide-specific phospholipase C β /protein kinase C and Ca²⁺-independent phospholipase A(2) pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**: 1316-23.
- Liu, L., Mohammadi, K., Aynafshar, B., Wang, H., Li, D., Liu, J., Ivanov, A.V., Xie, Z., and Askari, A. (2003) Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**: 1550-1560.

- Lopina, O.D. (2001) Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc)*. **66**: 1122-1131.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.I., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- Ma, Y., Pitson, S., Hercus, T., Murphy, J., Lopez, A., Woodcock, J. (2005) Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **280**: 26011-26017.
- Maggio, B. (1994) The surface behavior of glycosphingolipids in Biomembranes. A new frontier of molecular ecology. *Progr. Biophys. and Molec. Biol.* **62**: 55-117.
- Maggio, B., Fanani, M.L., Oliveira, R.G (2002) Biochemical and structural information transduction at the mesoscopic level in bio-interfaces containing sphingolipids. *Neurochem. Res.* **27**: 547-557.
- Maggio, B., Fanani, M.L., Rosetti, C.M., Wilke, N. (2006) Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: an assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**: 1922-1944.
- Maia, J.C.C., Gomes, S.L., Juliani, M.H. Preparation of (γ - ^{32}P) and (α - ^{32}P) nucleoside triphosphates with high specific activity. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Fundação Oswaldo Cruz, 1983. p. 146–167.
- Malnic, G., Enokibara, H., Aires, M.M., Vieira, F.L. (1969) Effect of furosemide and NaCl-loading on chloride excretion in single nephrons of rat kidneys. *Pflugers. Arch.* **309**: 21-37.
- Marchesini, N. & Hannun, Y.A. (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* **82**: 27–44.
- Marín, R., Proverbio, T., Proverbio, F. (1985) Active sodium transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **814**: 363-373.
- Marín, R., Obando, M.A., Proverbio, T., Proverbio, F. (1986) Effect of a high NaCl diet on the active mechanisms of a Na^+ extrusion in rat kidney. *Kidney Int.* **30**: 518-523.
- Martin, D.W. (2005) Structure-function relationships in the Na^+ , K^+ -pump. *Semin. Nephrol.* **25**: 282-291.
- Mello-Aires, M. Fisiologia. 2 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 1999. p. 561-569.

- Mimura, K., Matsui, H., Takagi, T., Hayashi, Y. (1993) Change in oligomeric structure of solubilized Na⁺/K⁺-ATPase induced by octaethylene glycol dodecyl ether, phosphatidylserine and ATP. *Biochim. Biophys. Acta.* **1145**: 63-74.
- Mitsutake, S., Kim, T.J., Inagaki, Y., Kato, M., Yamashita, T., Igarashi, Y. (2004) Ceramide kinase is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 17570-17577.
- Mitsutake, S. & Igarashi, Y. (2005) Calmodulin is involved in the Ca²⁺-dependent activation of ceramide kinase as a calcium sensor. *J. Biol. Chem.* **280**: 40436–40441.
- Moller, J.V., Juul, B., Le Maire, M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**: 1-51.
- Morel, F. & Doucet, A. (1986) Hormonal control of kidney functions at the cell level. *Physiol. Rev.* **Vol. 66, Nº 2**: 377-468.
- Moretti, R, Martín, M., Proverbio, T., Proverbio, F., Marín, R. (1991) Ouabain insensitive Na⁺-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **98**: 623-626.
- Movsesian, M.A. (2003) Altered cAMP-mediated signaling and its role in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* **62**: 450-459.
- Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., Pfizenmaier, K. (1995) PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* **14**: 1961-1969.
- Mullins, L.J., Bailey, M.A., Mullins, J.J. (2006) Hypertension, Kidney, and Transgenics: A Fresh Perspective. *Physiol. Rev.* **86**: 709–746.
- Newton, A.C. (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* **370**: 361-371.
- Nolan, V., Perduca, M., Monaco, H.L., Maggio, B. and Montich, G.G. (2003) Interactions of chicken liver basic fatty acid-binding protein with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **78445**: 1-9.
- Nurminen, T.A., Holopainen, J.M., Zhao, H., Kimmunen, P.K. (2002) Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 12129-12134.
- Overton E. (1899) The probable origin and physiological significance of cellular osmotic properties. *Vierteljahrschrift der Naturforschende Gessellschaft (Zurich)*. **44**: 88–135 in Edidin, M. (2003) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature*. **Vol. 4**: 414-418.

- Panayiotidis, M.I., Bortner, C.D., Cidlowski, J.A. (2006) On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na⁺/K⁺-ATPase please stand up? *Acta Physiol. (Oxf)*. **187**: 205-215.
- Parker, P.J. & Murray-Rust, J. (2004) PKC at a glance. *J. Cell Sci*. **117**: 131-2.
- Paulusma, C.C. & Oude Elferink, R.P. (2005) The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease. *Biochim. Biophys. Acta*. **1741**: 11-24.
- Pettus, B.J., Bielawska, A., Spiegel, S., Roddy, P., Hannun, Y.A., Chalfant, C.E. (2003) Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *J. Biol. Chem*. **278**: 38206-38213.
- Pettus, B.J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Leslie, C.C., Evans, J.H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y.A., Chalfant, C.E. (2004) Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem*. **279**: 11320-11326.
- Pihakaski-Maunsbach, K., Tokonabe, S., Vorum, H., Rivard, C.J., Capasso, J.M., Berl, T., Maunsbach, A.B. (2005) The gamma-subunit of Na-K-ATPase is incorporated into plasma membranes of mouse IMCD3 cells in response to hypertonicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. **288**: 650-657.
- Proverbio, F., Proverbio, T., Marin, R. (1986) Na⁺-ATPase is a different entity from the (Na⁺ K⁺)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **858**: 202-205.
- Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. (1989) The "second" sodium pump and cell volume. *Curr. Top. Membr. Transp*. **34**: 105-120.
- Proverbio, F., Condrescu-Guidi, M., Whitttembury, G. (1975) Ouabain-insensitive Na⁺ stimulation of an Mg²⁺-dependent ATPase in kidney tissue. *Biochim. Biophys. Acta*. **394**: 281-292.
- Pu, H.X., Cluzeaud, F., Goldshlegger, R., Karlsh, S.J.D., Farman, N., Blostein, R. (2001) Functional role and immunocytochemical localization of the gamma a and gamma b forms of the Na, K-ATPase gamma subunit. *J. Biol. Chem*. **276**: 20370- 20378.
- Rangel, L.B.A., Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Brasil, F.L., Lopes, A.G. (1999) Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. *Biochim. Biophys. Acta*. **1416**: 309-319.
- Rangel, L.B.A., Malaquias, A.T., Lara, L.S., Silva, I.V., De Souza, A.M., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2001) Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na(+)-ATPase activity from proximal tubules. *Biochim. Biophys. Acta*. **1512**: 90-97.

- Rangel, L.B., Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Lopes, A.G. (2002) Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na⁺-ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1564**: 310-316.
- Rangel, L.B., Lopes, A.G., Lara, L.S., Carvalho, T.L., Silva, I.V., Oliveira, M.M., Einicker-Lamas, M., Vieyra, A., Nogaroli, L., Caruso-Neves, C. (2005) PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. *Regul. Pept.* **127**: 177-82.
- Riccardi, D., Lee, W.S., Lee, K., Segre, G.V., Brown, E.M., Hebert, S.C. (1996) Localization of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **271**: 951–956.
- Riccardi, D., Hall, A.E., Chattopadhyay, N., Xu, J.Z., Brown, E.M., Hebert, S.C. (1998) Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **274**: 611–622.
- Ruvolo, PP. (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.* **47**: 383-392.
- Sacktor, B., Roseblom, I.L., Liang, C.T., Cheng, L. (1981) Sodium gradient- and sodium plus potassium gradient-dependent glutamate uptake in renal basolateral membrane vesicles. *J. Membr. Biol.* **60**: 63-71.
- Schauf, C., Moffet, D., Moffet, S. *Fisiologia Humana*. 2 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 1993. 581.
- Schenk, P.W. & Snaar-Jagalska, B.E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1449**: 1-24.
- Schnermann, J.B. & Sayegh, S.I. *Kidney Physiology*. 1 ed. Lippincott: Raven Press, 1998. p. 659.
- Schwartz, I.L., Schlatz, L.J., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. (1974) Target cell polarity and membrane phosphorylation in relation to the mechanism of action of antidiuretic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 2595-2599.
- Seldin, D.W. & Geibisch, G. *The Kidney (Physiology and Pathophysiology)*. 2 ed. New York: Raven Press, 1992. p. 875.
- Shayman, J.A. (2000) Sphingolipids. *Kidney Int.* **58**: 11-26.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.

- Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. **175**: 720-731.
- Skalhegg, B.S. & Tasken, K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci.* **51**: 678-693.
- Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* **23**: 394-401.
- Snook, C.F., Jones, J.A., Hannun, Y.A (2006) Sphingolipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761**: 927-946.
- Starling, A.P., East, J.M., Lee, A.G. (1995) Phosphatidylinositol 4-phosphate increases the rate of dephosphorylation of the phosphorylated Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* **Vol. 270, Nº 24**: 14467-14470.
- Sugiura, M., Kono, K., Lui, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S., Kohama, T. (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. *Biochem. J.* **277**: 23294-23300.
- Sweadner, K.J. & Rael, E. (2000) The FXD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics.* **68**: 41-56.
- Sweadner, K.J. & Donnet, C. (2001) Structural similarities of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ and SERCA, the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Bioch. J.* **356**: 685-704.
- Tasken, K. & Aandahl, E.M. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* **84**: 137-167.
- Tausky, H.H. & Shorr, E. (1952) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* **202**: 675-682.
- The McGraw-Hill Companies, Inc. **Imagem néfron**. Disponível em: http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P2%20urinary_system.htm. Acesso em: Março de 2008.
- Throckmorton, D., Kurscheid-Reich, D., Rosales, O.R., Rodriguez-Combes, J., Lopez, R., Sumpio, B., Zhong, Q., Ding, K.H., McCarthy, R., Barrett, P.Q., Isales, C.M. (2002) Parathyroid hormone effects on signaling pathways in endothelial cells vary with peptide concentration. *Peptides.* **23**: 79-85.
- Thudichum, J.L.W. (1884) A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain, Bailliere, Tindall and Cox, London. in Snook, C.F., Jones, J.A., Hannun, Y.A (2006) Sphingolipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761**: 927-946.

- Tortelote, G.G., Valverde, R.H., Lemos, T., Guilherme, A., Einicker-Lamas, M., Vieyra, A. (2004) The plasma membrane Ca^{2+} pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae. *FEBS Lett.* **576**: 31-35.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H, Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* **405**: 647-655.
- Ueno, S., Takeda, K., Noguchi, S., Kawamura, M. (1997) Significance of the b-subunit in the biogenesis of Na^+/K^+ -ATPase. *Biosci. Rep.* **17**: 173-188.
- Valverde, R.H., Tortelote, G.G., Lemos, T., Mintz, E., Vieyra, A. (2005) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca^{2+} -ATPase by calmodulin and protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **280**: 30611-30618.
- Vasilets, L.A. & Schwarz, W. (1993) Structure-function relationships of cation binding in the Na^+/K^+ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1154**: 201-222.
- Vieyra, A. (1996) Catalytic and structural modifications of sarcoplasmic reticulum and plasma membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) ATPases induced by organic solutes that accumulate in living systems. *Biosci. Rep.* **16**: 115-127.
- Vrtovsni, F., El Yandouzi, E.H., Le Grimellec, C., Friedlander, G. (1992) Sphingomyelin and cholesterol modulate sodium coupled uptakes in proximal tubular cells. *Kidney Int.* **4**: 983-991.
- Wengert, M., Adão-Novaes, J., Assaife-Lopes, N., Leão-Ferreira, L.R., Caruso-Neves, C. (2007) Adenine-induced inhibition of Na^{+} -ATPase activity: Evidence for involvement of the Gi protein-coupled receptor in the cAMP signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**: 261-267.
- Whittembury, G. & Fishman, J. (1969) Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused toad kidney: the effect of K, ouabain and ethacrynic acid. *Pflügers Arch.* **307**: 138-153.
- Whittembury, G. & Proverbio, F. (1970) Two models of Na extrusion in cells from guinea-pig kidney cortex slices. *Pflügers Arch.* **316**: 1-25.
- Xie, Z. & Cai, T. (2003) Na^{+} - K^{+} -ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* **3**: 157-168.
- Zager, R.A. (2000) Sphingomyelinase and Membrane Sphingomyelin Content: Determinants of Proximal Tubule Cell Susceptibility to Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**: 894-902.
- Zager, R.A., Conrad, S., Lochhead, K., Sweeney, E.A., Igarashi, Y. (1998) Burkhart KM: Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Kidney Int.* **53**: 573-582.

Zouzoulas, A., Therien, A.G., Scanzano, R., Deber, C., Blostein, R. (2003) Modulation of Na, K-ATPase by the gamma subunit: Studies with transfected cells and transmembrane mimetic peptides. *J. Biol. Chem.* **278**: 40437–40441.

7 ANEXOS

ANEXO 1

Resultados originários do Mestrado publicados no “*The Journal of Biological Chemistry*”

Cabral, L.M., Wengert, M., Da Ressurreição, A.A., Feres-Elias, P.H., Almeida, F.G., Vieyra, A., Caruso-Neves, C., Einicker-Lamas, M. (2007) Ceramide is a potent activator of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from kidney-proximal tubule cells with protein kinase A as an intermediate. *J. Biol. Chem.* **282**: 24599-24606.

ANEXO 2

Manuscrito a ser submetido ao "*The Journal of Biological Chemistry*"

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](#)