

**LEONARDO MARQUES DA FONSECA**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO  
DO PAPEL FISIOLÓGICO DA  
PROTEÍNA ABCC1 NO RIM**

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



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



# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

LEONARDO MARQUES DA FONSECA

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO PAPEL  
FISIOLÓGICO DA PROTEÍNA ABCC1 NO RIM

VOLUME ÚNICO

**Dissertação submetida ao Instituto de  
Biofísica Carlos Chagas Filho da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
visando à obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Biológicas – Fisiologia.**

UFRJ – Mestrado em Ciências  
Biológicas - Fisiologia

Orientadores: Aníbal Gil Lopes  
Márcia Alves Marques Capella  
Doutores

Rio de Janeiro  
2008

Fonseca, Leonardo Marques da

Contribuição para o estudo do papel fisiológico da proteína ABCC1 no rim  
/ Leonardo Marques da Fonseca. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.

83f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Aníbal Gil Lopes e Márcia Alves Marques Capella

Dissertação (mestrado) – UFRJ/IBCCF, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, 2008.

Referências bibliográficas: f. 73-83

1. Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP - Fisiologia.  
2. Concentração Osmolar. 3. Néfrons. 4. Glutathiona. 5. Estresse Oxidativo.  
6. Linhagem Celular – classificação. 9. Imunofluorescência. 10. Trifosfato de Adenosina  
11. Hidrólise 12. Sobrevivência Celular. 13. Fisiologia – Tese. I. Lopes, Aníbal Gil. II. Capella, Márcia Alves Marques. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas. IV. Título.

**À MINHA FAMÍLIA,  
NAMORADA E AMIGOS**

## **AGRADECIMENTOS**

Dois anos e meio após o início desta jornada é chegada a hora de agradecer a todos que me ajudaram não só a começá-la, mas também a terminá-la.

A educação, tanto em minha vida quanto na de minha irmã sempre foi de grande importância para meus pais. Graças a seus sacrifícios, sempre tive acesso a boas escolas, livros e também ao exemplo da importância do estudo. Sempre serei grato aos meus pais, Anselmo e Elizabeth, pela paciência e carinho e, também, por me guiarem pelos caminhos da vida e me ensinarem a navegá-los sozinho.

Agradeço também às minhas avós Maria da Luz e Lucíola e a meu falecido avô Raimundo por tudo que sempre fizeram e ainda fazem por mim. Saibam que meu amor e respeito por vocês é tão grande quanto o que sempre tiveram por mim.

Agradeço aos amigos pelo apoio e momentos de descontração. Agradeço especialmente a meu amigo Diogo Vives pelo grande incentivo que me deu, quase três anos atrás, quando confidenciei a ele o desejo de fazer um curso de mestrado, e também pela convivência sempre alegre e pela amizade desinteressada.

Não posso deixar de citar aqui, minha namorada Ana Gabriela. Seu carinho, motivação e ajuda foram essenciais durante os passos finais, quando o cansaço atingia seus níveis mais altos e a energia se fazia faltar.

Como aluno, não posso negar a importância que meus professores, passados e presentes, tiveram não só na realização deste trabalho mas na minha própria formação como futuro cientista.

Agradeço ao professor Dr. Celso Caruso Neves, que foi capaz através da dedicação que sempre mostrou não só ao trabalho, mas a seus alunos, de me ensinar anos atrás, um pouco sobre o que é a ciência.

Agradeço também, como não poderia deixar de ser, ao professor Dr. Aníbal Gil Lopes, que me recebeu de volta em seu laboratório e que sempre foi para comigo um mestre compreensivo e aberto, capaz de ajudar não só com seus conhecimentos de fisiologia, mas também com seus conhecimentos de vida.

Agradeço também à professora Dra. Márcia Alves Marques Capella, cuja orientação foi imprescindível à realização deste trabalho. Agradeço por me ajudar a não perder o foco necessário para a realização deste trabalho, por me mostrar a importância dos resultados mais simples e por estar sempre disposta a ensinar.

Agradeço ainda ao amigo João Marcos, companheiro das alegrias e dificuldades, não só de um curso de mestrado, mas do dia a dia dentro do laboratório. Ao Shan pelo convívio alegre e pelas brincadeiras sempre bem humoradas. E também às “meninas” Adriana e Raquel pela oportunidade de transmitir parte do conhecimento que recebi ao longo de vários anos.

Obrigado.

## RESUMO

FONSECA, Leonardo Marques. **Avaliação do estudo do papel fisiológico da proteína ABCC1 no rim.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

A proteína ABCC1 foi identificada em 1992 em células de câncer de pulmão, sendo prontamente associada ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Sete anos depois foi mostrada sua presença no néfron, mais precisamente nas membranas basolaterais do túbulo distal reto e do ducto coletor, não desempenhando qualquer função na excreção de xenobióticos. Considerando a falta de correlação aparente entre: 1) sua capacidade de transportar glutatona, uma molécula importante para a manutenção do potencial redox das células, 2) a alta resistência do epitélio tubular dos segmentos do néfron onde a ABCC1 está presente, e 3) a baixa probabilidade de aí participar de processos secretórios, o presente estudo foi delineado com o objetivo de investigar o possível papel da ABCC1 nestes segmentos do néfron. Para tanto foi utilizado o modelo experimental constituído pelas células embrionárias renais de macaco da linhagem Ma104 submetidas a condições de hiperosmolaridade. A medida da atividade ATPásica da ABCC1 é reduzida pela elevação da osmolaridade do meio promovida pela adição de NaCl, uréia, NaCl + uréia e manitol (CTR  $12,4 \pm 2,1$ ; NaCl  $7,3 \pm 1,4$ ; Ureia  $6,5 \pm 2,1$  NaCl + Ureia  $5,1 \pm 2,8$ ; Manitol  $4,7 \pm 2,6$ ,  $p < 0,01$ ). Observamos que o aumento da osmolaridade, principalmente com o uso de cloretos de sódio e colina, reduz a viabilidade das células, de acordo com o ensaio de MTT (CTR  $0,76 \pm 0,01$ ; NaCl  $0,24 \pm 0,04$ ; Ureia  $0,46 \pm 0,01$ ; Manitol  $0,59 \pm 0,06$ ; Cloreto de Colina  $0,23 \pm 0,08$ ). Também foi verificado que o tratamento com BSO, conhecido inibidor da síntese de glutatona, sensibiliza as células à incubação com cloreto de sódio ou cloreto de colina (NaCl  $0,24 \pm 0,02$ ; NaCl + BSO  $0,10 \pm 0,01$ ; Cloreto de Colina  $0,25 \pm 0,05$ ; Cloreto de Colina + BSO  $0,11 \pm 0,02$ ). Os resultados sugerem um papel da ABCC1 na resistência ao dano oxidativo provocado por elevação da osmolaridade, provavelmente atuando como reguladora dos níveis de glutatona reduzida e oxidada.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq, Programa de Oncologia – FAF-ONCO II.



## ABSTRACT

FONSECA, Leonardo Marques. **Evaluation of the study of the physiological role of ABCC1 protein in the kidney.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertation (Master's in Biological Sciences - Physiology) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The ABCC1 protein was identified in 1992, in lung cancer cells, quickly being associated to the multidrug resistance phenotype. Seven years later it was shown to be present in the nephron, more precisely in the basolateral membranes of both the straight distal tubule and the collecting duct, not being responsible for xenobiotics excretion. Considering the apparent lack of correlation between: 1) it's capacity to transport glutathione, an important molecule to the maintenance of redox potential of cells, 2) the great resistance of the tubular epithelium where ABCC1 is found, and 3) the low probability of taking part in secretory mechanisms, the present study was designed with the goal of investigating the possible role of ABCC1 in these nephron segments. For this, the embryonary kidney monkey cells, Ma104 exposed to hyperosmolar conditions was used as an experimental model. ATPase activity measurement assays have shown that the raising the medium's osmolarity leads to a decrease in the ATPase activity exhibited by ABCC1 (CTR  $12,4 \pm 2,1$ ; NaCl  $7,3 \pm 1,4$ ; Urea  $6,5 \pm 2,1$  NaCl + Urea  $5,098 \pm 2,8$ ; Manitol  $4,658 \pm 2,6$ ,  $p < 0,01$ ). We also observed that raising the osmolarity, especially by the use of sodium and choline chlorides, reduced the cells' viability according to the MTT assays (CTR  $0,76 \pm 0,012$ ; NaCl  $0,24 \pm 0,04$ ; Uréia  $0,46 \pm 0,01$ ; Manitol  $0,59 \pm 0,06$ ; Choline Chloride  $0,23 \pm 0,08$ ), and also, that the pre-treatment with BSO, a known inhibitor of glutathione synthesis promoted sensitization to the incubation with sodium or choline chloride (NaCl  $0,24 \pm 0,02$ ; NaCl + BSO  $0,10 \pm 0,01$ ; Choline Chloride  $0,25 \pm 0,05$ ; Choline Chloride + BSO  $0,11 \pm 0,02$ ). Results suggest a role for ABCC1 in the resistance to the oxidative stress provoked by the rise in osmolarity, probably acting as a regulator of reduced and oxidized glutathione levels.

Financial Support: FAPERJ, CNPq, Programa de Oncologia – FAF-ONCO II.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama básico de um transportador ABC.....	4
Figura 2: Estrutura da proteína ABCC1.....	5
Figura 3: Estrutura de alguns inibidores do transportador ABCC1.....	11
Figura 4: Esquema do néfron.....	13
Figura 5: Mecanismo de reabsorção de sódio no túbulo distal reto. ....	18
Figura 6: Desenho esquemático do mecanismo de contracorrente. ....	19
Figura 7: Expressão de aquaporinas ao longo do néfron.....	21
Figura 8: Efeito da elevação da osmolaridade sobre a atividade ATPásica da ABCC1. ....	42
Figura 9: Efeito da elevação da concentração de NaCl sobre a sobrevida das células Ma104. ....	44
Figura 10: Efeito de diferentes osmólitos sobre a sobrevida das células Ma104. ....	45
Figura 11: Efeito da uréia sobre o declínio de sobrevida das células Ma104 promovido pela alta concentração de sódio. ....	46
Figura 12: Efeito da uréia sobre o declínio de sobrevida das células Ma104 promovido pela alta concentração de cloreto de colina (Col).....	47
Figura 13: Efeito de inibidores da ABCC1 na viabilidade das células Ma104. .	48
Figura 14: Efeito do BSO sobre o declínio de sobrevida das células Ma104 promovido pela alta concentração de cloreto de sódio. ....	49
Figura 15: Efeito de diferentes osmólitos sobre a expressão da ABCC1 nas células Ma104. ....	50

Figura 16: Efeito de diferentes osmólitos sobre a expressão e localização da ABCC1 nas células Ma104.....	51
Figura 17: Marcação das células MDCK-C11 e Ma104 com PNA. ....	53
Figura 18: Marcação das células MDCK-C7 e Ma104 com anticorpo anti-AQP2. .....	54
Figura 19: Expressão da AQP2 nas linhagens Ma104 e MDCK-C7.....	55
Figura 20: .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – Superfamília de Proteínas *ATP – Binding Cassete*

ABCB1 – Primeiro membro da subfamília B de proteínas ABC

ABCC1 – Primeiro membro da subfamília C de proteínas ABC

ABCG2 – Segundo membro da subfamília G de proteínas ABC

ADH – Hormônio antidiurético

AQP – Aquaporina

ATCC – *American Tissue Culture Collection*

ATP – Trifosfato de Adenosina

BCRP – Proteína de resistência do câncer de mama

BSO – Butionionina - sulfoximina

CFTR – *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

cDNA – DNA complementar

D.O. – Densidade ótica

DTT - ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético, sal dissódico

$\gamma$ -GCS – gama-glutamil- cisteína sintetase

GSH – Glutationa; forma reduzida

GSSH – Glutationa; forma oxidada

HEPES – Ácido[4-2-(hidroxietil)-1-piperrazinaetanosulfônico]

MRP1 – Proteína associada à resistência a múltiplas drogas

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NBD – Domínio de ligação a nucleotídeo

PBS – Tampão salina-fosfato

PKA – Proteína cinase A

P-gp – Glicoproteína P

PNA – Aglutinina do amendoim

POPOP - 1,4-bis(5-feniloxazol-2-il)benzeno

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SFB – Soro fetal bovino

SUR – Receptor sulfoniluréia

TRIS – 2-amino-2-(hidóximetil)-1,3-propanodiol

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	2
1.1.	A Superfamília ABC.....	2
1.2.	A proteína ABCC1 (MRP1).....	5
1.3.	Inibidores da ABCC1 .....	10
1.4.	O Rim – Rápida revisão de anatomia e função .....	12
1.5.	Mecanismos de Concentração Urinária.....	14
1.6.	Reabsorção de água no ducto coletor: importância da Aquaporina 2 ...	19
1.7.	A linhagem celular Ma104 .....	22
2.	JUSTIFICATIVA .....	25
3.	OBJETIVOS .....	27
3.1.	Objetivo Geral.....	27
3.2.	Objetivos específicos.....	27
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1.	Reagentes .....	29
4.2.	Soluções.....	30
4.3.	Cultura de Células .....	30
4.4.	Medida da atividade ATPásica .....	31
4.5.	Medida da Viabilidade Celular .....	34
4.6.	Imunofluorescência .....	35
4.7.	Western Blotting .....	36

4.8.	Análise estatística.....	38
5.	RESULTADOS .....	41
5.1.	Modulação da atividade ATPásica da ABCC1 por diferentes osmólitos .....	41
5.2.	Efeito da hiperosmolaridade na sobrevivência das células embrionárias Ma104.....	43
5.3.	Efeito da hiperosmolaridade na expressão e localização da ABCC1 ....	50
5.4.	Estudo de caracterização das células Ma104 .....	52
6.	DISCUSSÃO .....	58
7.	CONCLUSÃO.....	68
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	70
9.	REFERÊNCIAS.....	73

# INTRODUÇÃO

*“What we call the beginning is often the end.*

*And to make an end is to make a beginning.*

*The end is where we start from.”*

T. S. Elliot



## **1. INTRODUÇÃO**

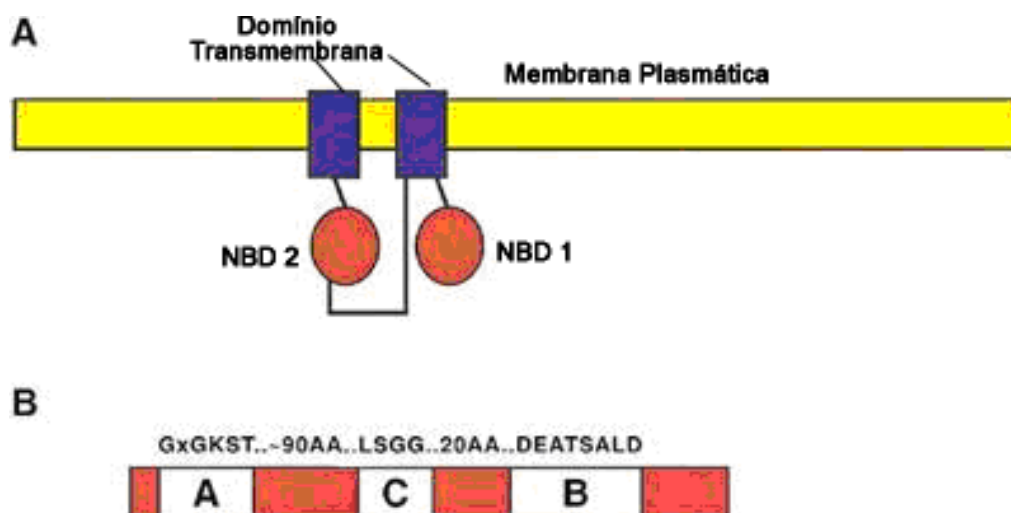
As proteínas ABCB1 (glicoproteína P), ABCG2 (BCRP) e ABCC1 (MRP1) são as principais moléculas transportadoras responsáveis pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas em células tumorais. Apesar de muito estudadas no câncer, seu papel fisiológico ainda não é bem conhecido. Logo após a descoberta da expressão dessas proteínas no rim, acreditava-se que sua principal função neste órgão fosse a secreção de xeno e endobióticos para a urina, o que se mostrou verdade para as proteínas ABCB1 e ABCG2, cujo principal sítio de expressão é a membrana apical do túbulo proximal. No entanto, a localização da proteína ABCC1 na membrana basolateral e no citoplasma de células do túbulo distal reto e do ducto coletor mostrou-se totalmente contrária à hipótese de uma atividade secretora. O presente trabalho visa a contribuir para o entendimento do papel fisiológico da proteína ABCC1 (MRP1) em células renais.

### **1.1. A Superfamília ABC**

Transportadores da superfamília ABC (ATP-binding cassette) valem-se da energia liberada pela hidrólise de ATP para bombear um grande número de compostos diferentes através de membranas biológicas. Esta superfamília começou a ser estudada na década de 70, quando transportadores dependentes de ATP responsáveis pela entrada de nutrientes no periplasma de bactérias gram-negativas foram descobertos. O termo ABC, no entanto, só foi implementado na década de 1990 (DAVIDSON, MALONEY, 2007).

A superfamília de transportadores ABC é composta por proteínas responsáveis pela translocação de uma grande variedade de moléculas através de membranas intra e extracelulares. A gama de substratos da superfamília inclui metabólitos, lipídios e drogas exógenas. A superexpressão de determinados transportadores ABC é comumente observada em tumores multiresistentes e em células tumorais em cultura. Mutações em um grande número de membros da família ABC já foram associadas a diversas doenças, incluindo fibrose cística, hiperinsulinemia, degeneração muscular e doença de Tangier (DEAN, HAMON, CHIMINI, 2001).

Os genes da superfamília ABC compõem a maior família de proteínas transmembranares. Em humanos, essa superfamília apresenta um total de 49 membros, sendo estes organizados em sete subfamílias distintas e organizadas de “A” a “G”, diferenciadas entre si através da homologia relativa entre as mesmas (COLE, DEELEY, 2006). Esses transportadores utilizam a energia liberada pela molécula do ATP para transportar várias moléculas através de membranas celulares. Os transportadores são incluídos nesta família de acordo com a seqüência e organização de seus domínios de ligação ao ATP ou de ligação a nucleotídeos (NBD, do inglês *nucleotide binding domain*). Os NBDs apresentam três seqüências conservadas, Walker A e B e uma seqüência C, de assinatura comum a todas as proteínas ABC (Figura 1) (DEAN, 2002).



**Figura 1: Diagrama básico de um transportador ABC.** Adaptada de DEAN, 2002.

O núcleo dos transportadores ABC é composto por dois pares de unidades, sendo um par de subunidades transmembranares, que forma o canal propriamente dito, e um par de subunidades periféricas, que é responsável pela ligação e hidrólise do ATP. Essas subunidades podem ser efetivamente subunidades separadas ou compor apenas domínios em um polipeptídeo maior. Em organismos procaríotos, a maior parte destes transportadores é sintetizada de forma a apresentar os quatro domínios separados, enquanto que em eucariotos é mais comum que se encontrem peptídeos compostos de um domínio transmembrana e um domínio de ligação a nucleotídeo (NBD). Assim, o transportador funcional é um homo ou heterodímero (DAVIDSON, MALONEY, 2007).

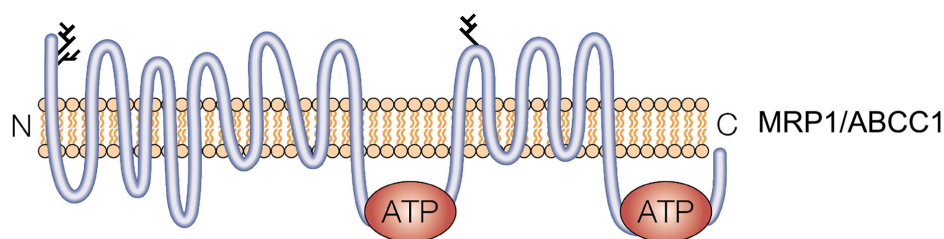
A atividade dos transportadores ABC requer cooperação entre seus dois NBDs. A ligação do ATP se dá nos sítios ativos formados entre as regiões Walker A e B de um domínio e a região C do domínio complementar. No caso de transportadores como o ABCC1 (MRP1), os dois domínios NBD são funcionalmente diferentes, sendo que o NBD 1 apresenta uma maior afinidade

por ATP, enquanto o NBD 2 possui maior capacidade de hidrólise (COLE, DEELEY, 2006). A ligação do ATP coincide com a rotação de um subdomínio helicoidal relacionado ao subdomínio de ligação de nucleotídeos, causando uma alteração conformacional que aproxima a região C do domínio de ligação de ATP da subunidade oposta. Portanto, a ligação da molécula de ATP também é responsável pela dimerização da proteína ABC (DAVIDSON, MALONEY, 2007).

Durante a última década, foi estabelecido que o efluxo ativo de moléculas conjugadas a GSH e outros metabólitos conjugados ocorreriam principalmente através de um subtipo de proteínas da família ABC, denominado ABCC.

### 1.2. A proteína ABCC1 (MRP1)

A ABCC1 (MRP1) (Figura 2), juntamente com cerca de outros 10 transportadores presentes na espécie humana, incluindo o canal de cloreto (CFTR) e os receptores de sulfoniluréia (SURs), formam a família MRP ou ABCC.



**Figura 2: Estrutura da proteína ABCC1.** Adaptada de GOTTESMAN, FOJO, BATES, 2002; MÜLLER et al., 2002.

A ABCC1 foi identificada pela primeira vez por Cole et al. em 1992, em células de carcinoma de pulmão H69AR, sendo associada a um largo espectro de resistência à terapia antitumoral apresentado por essas células, incluindo um grande número de agentes citotóxicos e oxianions de metais pesados. Um fato interessante, no entanto, é a sensibilidade apresentada pela linhagem frente à butionina sulfoximina (BSO), um inibidor da síntese de GSH (DEELEY, COLE, 2006). Inicialmente, recebeu a designação de MRP (do inglês “*multidrug resistance-related protein*”). Posteriormente, com a descoberta de outras proteínas da mesma subfamília, foi renomeada MRP1 e, mais recentemente, foi renomeada ABCC1, termo que será utilizado no decorrer do presente texto.

Apresentando um peso molecular de 190 KDa, a ABCC1 é altamente expressa em várias linhagens de células tumorais resistentes e é o único transportador da família MRP sobre o qual há evidências substanciais acerca do seu papel no insucesso da quimioterapia do câncer. A ABCC1 é expressa moderadamente em quase todos os tecidos normais com exceção do fígado, onde é pouco expressa (COLE, DEELEY, 2006). É expressa com maior intensidade em pulmão, rim, intestino, cólon, baço, testículos, células musculares e epiteliais e astrócitos (FLENS et al., 1996).

Esta proteína é também expressa em praticamente todas as células do sangue periférico, incluindo hemácias (ABRAHAM et al., 2001; LAUPÈZE et al., 2001a; LAUPÈZE et al., 2001b). Nas células do sistema imunológico, a expressão mais alta de ABCC1 foi encontrada nos linfócitos T CD3+ e CD4+ (LEGRAND et al., 1996) e já foi mostrado que sua expressão aumenta em linfócitos T ativados (LOHOFF et al., 1998). Estudos recentes sugerem que esta proteína desempenhe um papel importante no processo de maturação

tímica, pois além de ser fortemente expressa em timócitos imaturos, sua inibição induz a expressão de CD4+ e CD8+ em células indiferenciadas de timoma murino (ECHEVARRIA-LIMA et al., 2005; LEITE et al., 2006). Esta proteína parece ter uma grande importância no sistema imune, pois é capaz de secretar mediadores inflamatórios, como leucotrieno C4 e prostaglandinas A2 e J2. (EVERS et al., 1997; PAUMI et al., 2003; KARWATSKY et al., 2005; MUELLER et al., 2008).

A ABCC1 está envolvida no transporte de uma imensa gama de substratos, incluindo desde moléculas de ocorrência natural no organismo, como 17 $\beta$ -estradiol e prostaglandinas, a antibióticos, toxinas e antineoplásicos. De maneira geral, essas substâncias são transportadas conjugadas à glutathione, glucoronide e sulfato (MÜLLER et al., 1994; DEELEY, COLE, 2006; DEELEY, WESTLAKE, COLE, 2006). A tabela 1 apresenta exemplos de diversas substâncias transportadas pela ABCC1.

A ABCC1 também aparenta ter um papel importante na manutenção do potencial de oxi-redução celular, pois é capaz de transportar tanto glutathione reduzida (GSH) como oxidada (GSSG) (YAMANE et al., 1998; HIRRLINGER et al., 2001). O transporte de glutathione parece ser de fundamental importância para a sobrevivência celular e está associado a processos de apoptose (FRANCO, CIDLOWSKI, 2006). Estudos mostraram aumento do efluxo de GSH mediado por ABCC1 em células astrocíticas em situação de estresse (HIRRLINGER et al., 2001) e, mais recentemente, que o efluxo de GSSG pela ABCC1 causa uma perturbação no estado redox que pode promover apoptose nas células endoteliais (MUELLER et al., 2005). Esses mesmos autores sugeriram que a ABCC1 tem um papel fundamental na gênese de diversas

anomalias vasculares que acompanham a hipertensão e que sua presença no endotélio é essencial para a resposta hipertensiva à angiotensina II (WIDDER et al., 2007), possivelmente devido à sua capacidade de transportar leucotrieno C4, que seria o responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio no músculo liso vascular (MUELLER et al., 2008).

Em 1996, um grupo holandês decidiu estudar as características de transporte da ABCC1 em células polarizadas usando, para tanto, células LLC-PK1, de epitélio renal de porco, transfectadas com o cDNA da ABCC1. Ao contrário do que se esperava, essa proteína foi encontrada não na membrana apical, como é o caso, por exemplo, da ABCB1, também encontrada no rim, mas sim na membrana basolateral, sendo responsável pelo transporte de substâncias para o lado intersticial, ao invés do suposto papel de secreção para a luz dos túbulos renais (EVERS et al., 1996). Esses resultados foram confirmados por estudos realizados em camundongos (PENG et al., 1999), onde foi mostrada sua presença no citoplasma e na membrana basolateral somente do túbulo distal reto e do duto coletor.

**Tabela 1: Substâncias transportadas pela MRP1 (ABCC1).** Adaptada de DEELEY, COLE, 2006.

Classe do Composto	Exemplo
<i>Drogas/Xenobióticos</i>	
Antineoplásicos	Antagonistas do ácido fólico (metotrexato, edatrexato, ZD1694), Antraciclina (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina), Alcalóides (etoposídeo, vincristina, vinblastina, paclitaxel, irinotecan, SN-38), Antiandrogênicos (flutamida, hidroxiflutamida)
Antivirais	Saquinavir, ritonavir
Antibióticos	Difloxacina, grepafloxacina
Metalóides	Arsenito sódico, Arseniato sódico, antimoniato de potássio, tartarato de antimônio e potássio

---

Sondas fluorescentes	Calceína, Fluo-3, BCECF, SNARF
Toxinas	Aflatoxina B1, methoxiclor, fenitroton, clorprofame
<i>Conjugados a drogas e xenobióticos</i>	
Conjugados a GSH	2,4-dinitrofenil-SG, bimane-SG, N-etilmaleimida-SG, doxorubicina-SG, tiotepa-SG, ciclofosfamida-SG, melfalana-SG, clorambucil-SG, ácido etacrínico-SG, metolaclor-SG, atrazina-SG, sulforafana-SG, aflatoxina B1-epóxido-SG, 4-nitroquinolina-1-oxide-SG, As(SG) <sub>3</sub>
Conjugados a glucoronide	Etoposídeo-Gluc, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1 butanol (NNAL)-3b-OGluc, SN-38-gluc, 4 metilumbeliferil $\beta$ -D-gluc, 6-hidroxi-5,7-dimetil-2-metilamino-4-(3-piridilmetil) sulfato de benzotiazol (E3040S)-Gluc
<i>Metabólitos de ocorrência natural</i>	
Conjugados a GSH	Leucotrieno C <sub>4</sub> , prostaglandina A <sub>2</sub> -SG, 15-deoxi- $\Delta$ <sup>12,14</sup> prostaglandina J <sub>2</sub> -SG, hidroxinonenal-SG
Conjugados a glucoronide	17 $\beta$ -estradiol-17 $\beta$ -D-gluc, glucoronosilbilirrubina, bis-glucoronosilbilirrubina, iodeoxicolato-6- $\alpha$ -Gluc
Conjugados a sulfato	Estrona 3-sulfato, sulfato de dehidroepiandrosterona, sulfatolitocholate
Folatos	Ácido fólico, L-leucovorina
Peptídeos	GSH, GSSH
Outros	Bilirrubina

---

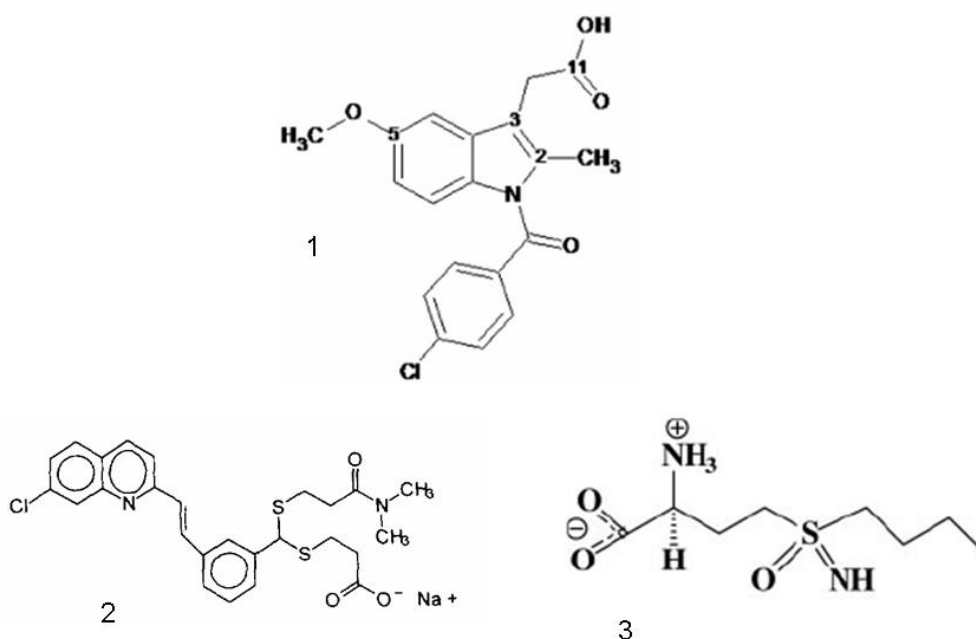
O fato da ABCC1 estar envolvida no fenótipo de resistência à múltiplas drogas em linhagens tumorais, aliado ao fato de que no rim sua localização se dá na membrana basolateral do epitélio tubular, fez com que estudos subseqüentes sobre o papel desta proteína neste órgão fossem praticamente abandonados por mais de uma década. Na realidade, tudo o que se sabe até o momento sobre sua presença no rim é que o principal sítio de expressão da ABCC1 é o segmento distal reto, juntamente com o ducto coletor, regiões onde foi confirmada a presença desta proteína no citoplasma e na membrana basolateral (PENG et al., 1999).



### 1.3. Inibidores da ABCC1

Sendo a ABCC1 intimamente associada ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas em linhagens de células tumorais, esta proteína é apontada como um dos responsáveis pelo insucesso de protocolos de quimioterapia em tratamento de tumores malignos que a super-expressam, levando esses pacientes a apresentarem prognósticos pouco encorajadores (PAJICA et al., 2005). É natural, portanto, a busca de moléculas capazes de inibir sua função, assim como o desenvolvimento de novas drogas que não sejam substrato para essa proteína. A indometacina, MK571, o benzotipeno LY329146, a quinolona difloxacina, o análogo de dihidropiridina NIK250 e os ácidos orgânicos benzobromarona (HOOIJBERG, 2004) e probenicida (LEITE, 2007) são exemplos de inibidores da ABCC1 identificados *in vitro*. Aprovada em estudos de fase I, a bisbenzilbenzoquinolona CBT-1<sup>®</sup> atua como inibidor do transporte mediado não só pela ABCC1, mas também por outros membros da superfamília ABC, como a ABCB1 (P-gp) e ABCC2 (BCRP) (OLDHAM, REID, BARNETT, 2000). Atualmente esta molécula está sendo testada em estudos de fases II e III. Experimentos realizados em células embrionárias renais humanas HEK293 transfectadas com o gene da ABCC1, mostraram que o CBT-1<sup>®</sup> inibe o transporte de calceína mediado pela ABCC1 de maneira semelhante ao MK571 (ROBEY et al., 2008).

A figura 3 mostra a estrutura dos inibidores da ABCC1 usados no presente trabalho.



**Figura 3: Estrutura de alguns inibidores do transportador ABCC1. 1 – indometacina; 2- MK571; 3- L-S-BSO. Retiradas de GEKELER et al., 1995; HAMILTON, WU, BATIST, 2007; LÚCIO et al., 2008.**

A indometacina é um antiinflamatório não esteroideal não específico (inibindo ambas as isoformas da ciclooxigenase). Desenvolvida em laboratório, começou a ser utilizada na década de 60 no tratamento da artrite reumatóide. (ROBERTS, MORROW, 2003). Ensaio realizado em células Sf9 de ovário de *Spodoptera frugiperda* (lagarta-militar) transfectadas com o gene da ABCC1 mostraram que a indometacina inibe a atividade ATPásica da ABCC1 (BAKOS et al., 2000).

Como a ABCC1 transporta moléculas conjugadas a glutathiona ou em co-transporte com a mesma, os níveis intracelulares de GSH são importantes para que a proteína consiga manter sua função. A glutathiona é sintetizada a partir de

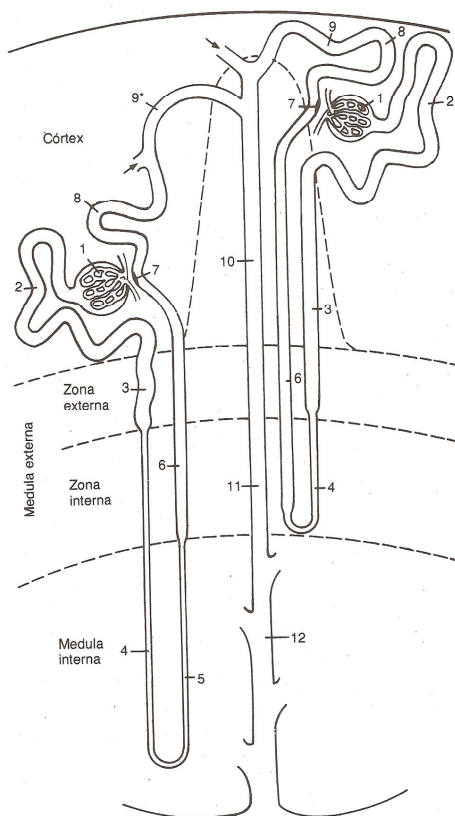
aminoácidos, através de duas reações mediadas por enzimas citosólicas: a  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS) e a GSH sintetase (GRIFFITH, 1999; RAHMAN, 2005). Na presença de  $Mg^{+2}$ -ATP, a L-butionina-S-sulfoximina (BSO) liga-se fortemente, embora não por ligação covalente, ao sítio ativo da  $\gamma$ -GCS, inibindo, portanto, a síntese de GSH (ANDERSON, 1998; FOJO, BATES, 2003). O BSO é tratado como um inibidor irreversível, já que todas as células apresentam  $Mg^{+2}$ -ATP. No entanto, o BSO eventualmente se dissocia da enzima se a exposição for descontinuada. No entanto, essa dissociação ocorre muito lentamente, a uma de cerca de 1 a 3% por hora (GRIFFITH, 1999).

O MK571 foi inicialmente descrito como um antagonista de leucotrienos D4 ( $LTD_4$ ) e C4 ( $LTC_4$ ) (JONES et al., 1989; GEKELER et al., 1995), por sua capacidade de inibir o receptor de cistenil leucotrienos do tipo I ( $cysLT_1R$ ), tendo sido inclusive usado em testes clínicos como uma potencial droga para o tratamento de asma (HARRIS et al., 1995). O  $cysLT_1R$  apresenta, no entanto uma afinidade cerca de 350 vezes maior para o  $LTD_4$  (ROVATI, CAPRA, 2007). Mais tarde, verificou-se que era um inibidor da ABCC1 (GEKELER et al., 1995). Dados obtidos a partir de experimentos realizados em astrócitos em cultura mostram que em concentrações elevadas ( $50\mu M$ ) o MK571 inibe o efluxo de GSH, enquanto que em concentrações baixas ( $1\mu M$ ) aumenta o efluxo deste tripeptídeo (MINICH et al., 2006).

#### **1.4. O Rim – Características anátomo-funcionais**

Os rins são órgãos retroperitoniais côncavos localizados em ambos os lados da parte posterior do abdômen. O rim humano pesa cerca de 125 a 170 g em um homem adulto e de 115 a 155 g em mulheres.

O néfron é a unidade funcional do rim e cada rim apresenta cerca de um milhão de néfrons. Há dois tipos principais de néfron: os corticais, que apresentam alça de Henle curta, e os justamedulares, que apresentam alça longa. Os componentes essenciais do néfron são: o corpúsculo renal (formado pela cápsula de Bowman e glomérulo), o túbulo proximal, a alça de Henle (que compreende o trecho reto do túbulo proximal, os segmentos finos e o túbulo distal reto) e os túbulos conector e coletor, sendo que este pode se dividir em cortical e medular (Figura 4).



**Figura 4: Esquema do néfron.** Adaptado de AIRES, 1999.

O glomérulo é a parte do rim responsável pela formação do ultrafiltrado plasmático. A estrutura tubular do néfron, responsável pelo processamento do filtrado, pode ser dividida em quatro porções com características histológicas

distintas: túbulos proximal, intermediário, distal e coletor (MADDOX, BRENNER, 2004; MADSEN, TISHER, 2004).

O túbulo proximal é formado por um trecho convoluto e um reto e é responsável pela reabsorção de cerca de 70% de todo o sódio filtrado. Ao final do túbulo proximal reto inicia-se o túbulo intermediário, composto pelos ramos finos da alça de Henle (descendente a ascendente), sendo seguido pelo ramo grosso ascendente, ou túbulo distal reto. A estrutura em alça, graças ao arranjo de diferentes transportadores e características variáveis de permeabilidade hidráulica ao longo de seus ramos, tem função imprescindível na geração e manutenção da hiperosmolaridade medular.

Na região onde o túbulo distal reto entra em contato com o glomérulo, encontra-se o aparelho justaglomerular. Este é formado por: 1) componente vascular: células modificadas da porção terminal da arteríola aferente, do trecho inicial da arteríola eferente e a região mesangial extraglomerular; 2) componente tubular: a mácula densa, formada por células modificadas do túbulo distal reto em contato com o componente vascular. O aparelho justaglomerular apresenta grande importância na regulação do volume extracelular, sendo responsável pela regulação da resistência das arteríolas glomerulares e da taxa de filtração, bem como pela síntese e secreção de renina (MADSEN, TISHER, 2004).

### **1.5. Mecanismos de Concentração Urinária**

A tonicidade de fluidos corporais é controlada principalmente pela regulação da excreção de água pelos rins. Diante do grande número de funções desempenhadas simultaneamente pelo rim, como regulação do

volume extracelular, balanço ácido-base e regulação de eletrólitos, é importante que o controle da excreção de água seja realizado de maneira independente, de modo a não comprometer outras funções. Os trechos tubulares envolvidos neste controle são a alça de Henle e o ducto coletor (FENTON, KNEPPER, 2007).

Como dito acima, a alça de Henle é composta de ramos finos, ascendente e descendente, e de um ramo grosso ascendente (túbulo distal reto). Os ramos finos apresentam importante contribuição para os mecanismos de concentração e diluição urinários graças às suas respectivas capacidades de transporte passivo de água e solutos.

O ramo fino descendente começa ao final do segmento S3 do túbulo proximal. O epitélio do ramo descendente apresenta baixa atividade  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPásica}$ , baixa permeabilidade a solutos de forma geral e uma abundância de aquaporinas. Desta forma, quando o fluido tubular presente neste trecho do néfron é posto em contato com o interstício medular hipertônico, ocorre a concentração do primeiro, graças à saída de água impulsionada pelo gradiente osmótico.

Ausente em néfrons de alça curta, o segmento fino ascendente segue o ramo descendente. O epitélio deste trecho é bastante uniforme e, assim como o ramo que o precede, não apresenta grande quantidade de mitocôndrias e, portanto, também possui uma baixa atividade  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPásica}$  (KONDO et al., 1992). Ao contrário do ramo descendente, no entanto, é impermeável à água, apresentando uma permeabilidade moderada à uréia e alta ao cloreto de sódio (LAYTON et al., 2004). O resultado é que, conforme o fluido sobe em direção ao córtex, sua tonicidade decresce com a saída de cloreto de sódio em

direção ao interstício. Este trecho apresenta a maior permeabilidade ao cloreto de todo o néfron (KONDO et al., 1992). Uma grande parte desta permeabilidade se dá por via transcelular, graças aos canais de cloreto CIC-K, presentes na membrana basolateral deste segmento (UCHIDA et al., 1993). Em condições de desidratação, essa proteína tem sua transcrição estimulada, contribuindo para aumento da osmolaridade medular e proporcionando uma maior capacidade de concentração urinária no ducto coletor. Estudos com animais *knock-out* verificaram que a falta deste transportador de cloreto impede que sejam atingidos níveis máximos de concentração urinária (MATSUMURA et al., 1999; AKIZUKI et al., 2000; UCHIDA, MARUMO, 2000; LIU et al., 2001). Ainda não há descrição de qualquer doença associada à perda isolada de função do canal CIC-Ka em humanos. Deficiências combinadas nos canais CIC-Ka e CIC-Kb levam a uma condição similar a da síndrome de Bartter pré-natal. A síndrome de Bartter do tipo III também está associada a mutações no canal CIC-Kb. Possíveis inibidores específicos de sua atividade são candidatos a pesquisas visando o desenvolvimento de diuréticos e anti-hipertensivos (SILE, VANOYE, GEORGE, 2006; KRÄMER et al., 2008).

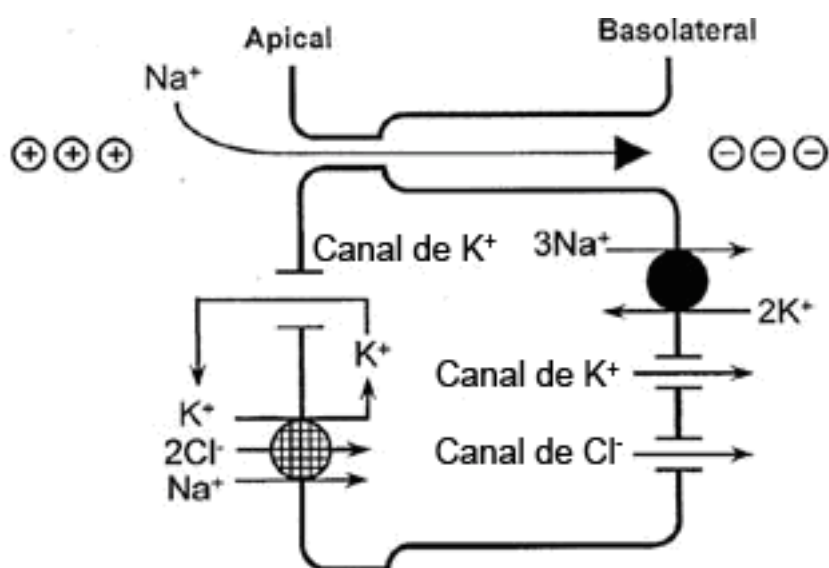
Começando logo após o ramo fino ascendente, o túbulo distal reto (ramo grosso ascendente da alça de Henle) é responsável pela reabsorção de aproximadamente 25% do sódio filtrado no glomérulo. Sendo relativamente impermeável à água, a reabsorção de sódio contribui para a gradual diluição do fluido tubular, desempenhando papel crítico não só na geração de urina diluída, mas também na gênese de um interstício medular hipertônico para a concentração de urina.

O túbulo distal reto pode ser dividido morfológica e fisiologicamente em medular e cortical. O trecho medular apresenta células com mitocôndrias orientadas em paliçada, dobras basais pronunciadas e uma alta taxa de transporte de cloreto de sódio (900 pmol/mm/min). O gradiente gerado entre o lúmen e o fluido peritubular, no entanto, é baixo (60 mM). Este trecho é primariamente responsável pelo estabelecimento de um interstício medular hipertônico, sendo crucial no mecanismo de concentração urinária. Por sua vez, o trecho cortical apresenta células com mitocôndrias sem organização aparente, dobras basais muito menos pronunciadas e uma taxa de transporte de cloreto de sódio quase dez vezes menor. O gradiente gerado entre a luz e o fluido peritubular é, no entanto, duas vezes maior. Apesar das diferenças funcionais, os mecanismos de transporte envolvidos são similares (MOE et al., 2004). O túbulo distal reto é o sítio primário da diluição urinária.

A reabsorção de sódio no túbulo distal reto ocorre através da ação orquestrada da  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$ , mecanismo ativo primário de transporte iônico presente na membrana basolateral, com o mecanismo ativo secundário, representado pelo transportador tríplice  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ , sensível à furosemida, localizado na membrana luminal (Figura 5). O transporte de sal através desse epitélio, que é impermeável à água, gera um gradiente químico importante de NaCl, o que causa um retorno de sal por via paracelular. Como a permeabilidade relativa do  $\text{Na}^+$  é maior que a do  $\text{Cl}^-$ , ocorre a formação de um potencial transepitelial lúmen positivo, característico desse segmento tubular e responsável pela reabsorção de cátions divalentes contra gradiente químico, que se dá através da paracelina, proteína de membrana que forma um canal seletivo no espaço paracelular. A recirculação de íons potássio através dos



canais ROMK é outro mecanismo de grande importância na geração desse potencial elétrico lúmen positivo. Por outro lado, como a afinidade do transportador tríplice ao  $K^+$  é baixa, a recirculação deste íon é necessária para a manutenção de sua funcionalidade (HUANG, OSSWALD, VALLON, 2000). A capacidade de reabsorver soluto desacompanhado de água faz com que, ao final deste segmento do néfron, o fluido tubular seja hipotônico em relação ao plasma.



**Figura 5: Mecanismo de reabsorção de sódio no túbulo distal reto.** Adaptado de HUANG, OSSWALD, VALLON, 2000.

Na alça de Henle e no interstício a seu redor ocorre o processo de formação de uma medula hipertônica (Figura 6), graças a um mecanismo de multiplicação em contracorrente. O conceito matemático de contracorrente envolve pequenas diferenças individuais que são multiplicadas ao longo de um sistema em alça por um fluxo contracorrente, gerando um gradiente axial muitas vezes maior que a diferença transversal entre os membros da alça. O

fluido tubular equilibra-se com o interstício, deixando esta região do néfron em um estado hipertônico.

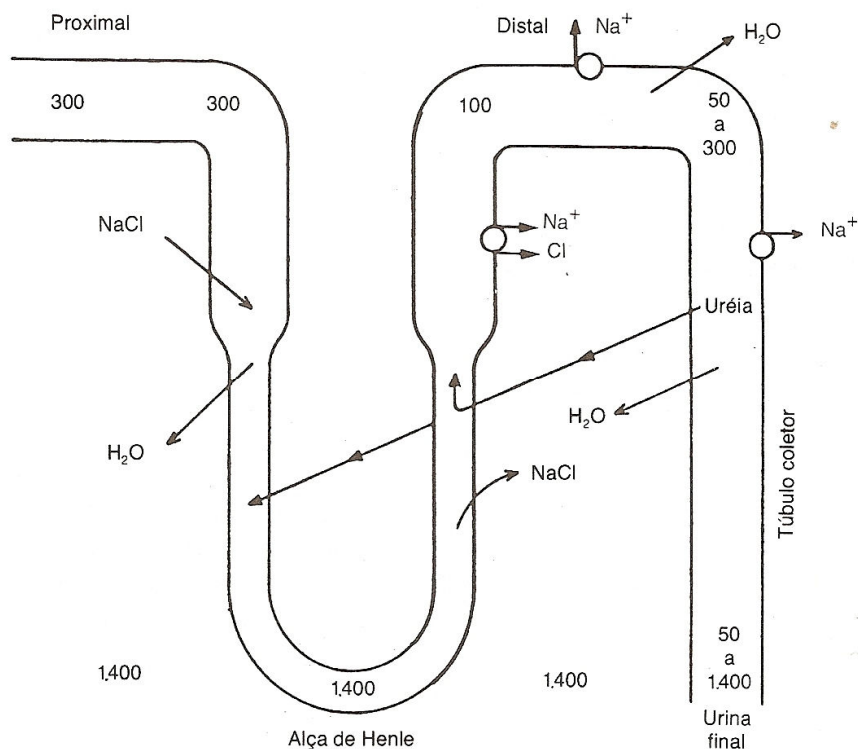


Figura 6: Desenho esquemático do mecanismo de contracorrente. Retirado de AIRES, 1999.

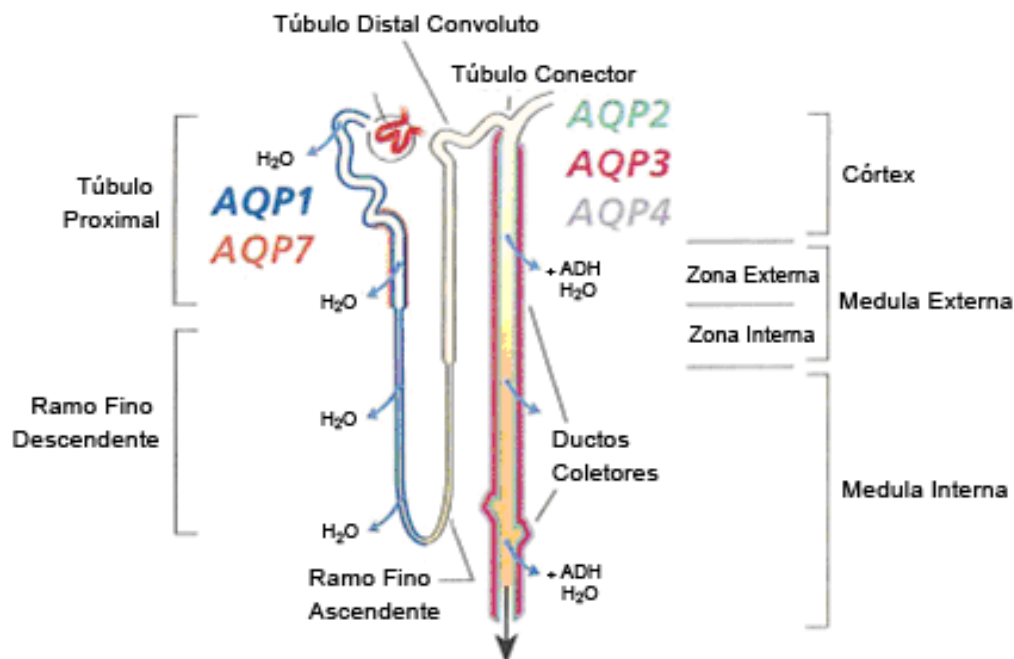
### 1.6. Reabsorção de água no ducto coletor: importância da Aquaporina 2

A descoberta das aquaporinas foi a tão esperada resposta à antiga pergunta “como uma molécula polarizada como a água é capaz de atravessar membranas biológicas”, além de ser o primeiro passo para a compreensão de distúrbios no balanço hídrico, como o *diabetes insipidus*.

O primeiro desta classe de transportadores a ser descoberto, em 1988, foi a aquaporina 1 (AQP1) (DENKER et al., 1988). Isolada a partir de eritrócitos humanos e posteriormente identificada como um canal para água em estudos

realizados em oócitos de *Xenopus*, através da injeção de RNAm, a AQP1 foi, a princípio, chamada de CHIP28 e a descoberta rendeu a Peter Agre o prêmio Nobel de química no ano de 2003. Neste ano o prêmio foi dividido com Roderick MacKinnon. A segunda aquaporina a ser identificada, através de ensaios de PCR, foi a aquaporina 2 (AQP2).

Atualmente, as aquaporinas compreendem uma grande família de proteínas, responsáveis por facilitar a passagem de água e glicerol através de membranas biológicas (BUCK et al., 2007). De 10 isoformas conhecidas, pelo menos 7 estão presentes no rim humano (Figura 7), sendo a AQP1 responsável pela reabsorção de água no túbulo proximal e no ramo fino descendente da alça de Henle, e conseqüentemente, a maior responsável pela reabsorção proximal de água. A AQP2, por sua vez, é encontrada nas células principais do ducto coletor (HARRIS, STRANGE, ZEIDEL, 1991; HASEGAWA et al., 2007; TAKATA et al., 2008), onde sua expressão é regulada pela vasopressina ou hormônio anti-diurético (ADH), um hormônio composto de apenas nove aminoácidos e sintetizado no hipotálamo (HOLMES, LANDRY, GRANTON, 2003; TRESCHAN, PETERS, 2006).



**Figura 7: Expressão de aquaporinas ao longo do néfron.** Adaptada de NIELSEN, 2002.

A AQP2 é abundante na membrana apical e em vesículas citoplasmáticas de células principais do ducto coletor. A AQP2, no entanto já foi encontrada também em membrana basolateral, principalmente no ducto coletor medular. Diversos estudos já mostraram que este é o principal alvo da vasopressina na regulação da permeabilidade do ducto coletor à água. Assim como a grande maioria dos membros desta família, a AQP2 se apresenta organizada sob a forma de tetrâmero (NIELSEN et al., 2002).

A vasopressina regula a reabsorção de água nas células principais do ducto coletor através de dois mecanismos distintos, ambos envolvendo AQP2. Em um efeito rápido, por ação de seu receptor V2, através de um mecanismo envolvendo a ativação de uma proteína cinase A (PKA), a vasopressina aumenta a permeabilidade do ducto coletor à água, promovendo a mobilização de AQP2 armazenadas em vesículas, que são, então, expressas na membrana

apical. Já o efeito de longo prazo envolve a regulação do promotor do gene da AQP2 e conseqüente aumento ou redução da quantidade de transportadores disponíveis para mobilização nas células (NIELSEN et al., 1999).

Desta forma, em situações de antidiurese ocorre grande absorção de água na porção final do ducto coletor, regulada pela vasopressina. Na ausência de vasopressina, a permeabilidade do ducto coletor à água é relativamente baixa, já que há uma pequena quantidade de AQP2 na membrana. Entretanto, na presença deste hormônio, a quantidade de transportadores na membrana apical das células principais deste segmento aumenta consideravelmente, elevando a permeabilidade à água. A água, neste caso, é reabsorvida a favor do gradiente osmótico gerado pelo interstício medular hipertônico (BERL, VERBALIS, 2004).

### **1.7. A linhagem celular Ma104**

De acordo com o *American Tissue Culture Collection* (ATCC), as células Ma104 foram originalmente descritas como provenientes de rim de embrião de macaco *Rhesus*. Estudos posteriores mostraram que, de fato, elas são originárias do rim de embrião de macaco verde africano (WHITAKER, HAYWARD, 1985). Essas células possuem morfologia epitelial e sua resistência transepitelial varia de acordo com a idade da cultura (CIARLET, CRAWFORD, ESTES, 2001; MITCHELL, BALL, 2004).

Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que essa linhagem celular expressa tanto a ABCC1 quanto a ABCB1 (CAPELLA et al., 1999; CAPELLA et al., 2001; VALENTE et al., 2007). Como as duas únicas regiões tubulares que expressam simultaneamente essas duas proteínas são o

túbulo distal reto e o ducto coletor, existe a possibilidade da linhagem Ma104 ser proveniente de uma dessas duas regiões do néfron. A alta resistência dessa linhagem à hiperosmolaridade (dados não publicados), bem como a alta expressão da ABCC1, em comparação com outras duas linhagens celulares de ducto coletor (MDCK-C7 e MDCK-C11, dados não publicados) também sugere que as células Ma104 sejam provenientes de uma dessas regiões. Neste trabalho, portanto, utilizamos a linhagem Ma104 para estudar os efeitos da hiperosmolaridade na expressão e atividade da proteína ABCC1 e iniciamos a tentativa de caracterização desta linhagem celular.

## JUSTIFICATIVA

*“The major reason for setting a goal  
is for what it makes of you to accomplish it.  
What it makes of you will always be the  
far greater value than what you get.”*

Jim Rohn

## 2. JUSTIFICATIVA

Estando a porção final do néfron envolvida nos mecanismos de concentração e diluição da urina, é de se esperar que a proteína ABCC1, expressa somente nos segmentos finais, também tenha um papel nesses mecanismos. Estudos sugerem que o túbulo distal reto é altamente sensível à depleção de glutathione (TORRES, RODRIGUEZ, ELIAS, 1987), um dos principais substratos endógenos dessa proteína, e que algumas drogas anti-câncerígenas podem induzir poliúria em animais *knock-out* para esta proteína (WIJNHOLDS et al., 1998). Uma possibilidade não explorada é que a ABCC1 tenha um papel protetor contra a hiperosmolaridade em si ou contra danos oxidativos provocados por altas concentrações de NaCl ou de uréia, comuns nessa região do néfron.



## OBJETIVOS

*“The most important thing about  
having goals is having one.”*

Albert F. Geoffrey

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar possíveis alterações na expressão ou atividade da ABCC1 em células Ma104 submetidas a hiperosmolaridade gerada por altas concentrações de uréia, NaCl ou manitol.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Investigar o impacto do aumento da osmolaridade por uréia, sódio, cloreto ou manitol na expressão e atividade da ABCC1 em células embrionárias de epitélio renal.
- Investigar o papel da ABCC1 na sobrevivência destas células quando submetidas às condições acima.
- Investigar a expressão da aquaporina-2, característica de células principais do ducto coletor, nas células Ma104.
- Iniciar a determinação da região do néfron da qual as células Ma104 são derivadas através do uso de marcadores celulares característicos, tais como aquaporina 2 e PNA.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*“Method is not less requisite in conversation  
than in writing, provided a man  
would talk to make himself understood.”*

Joseph Addison

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes e equipamentos

Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino, tripsina-EDTA, penicilina e estreptomicina foram obtidos da Invitrogen do Brasil (São Paulo, Brasil). FACS™ Lysing Solution e tubos Falcon foram comprados da BD Biosciences (San Jose, California, EUA).

O anticorpo policlonal primário contra MRP-1, A23 (coelho) e o anticorpo policlonal anti P-gP, C219 (camundongo) foram comprados da AXXORA (Bioagency, São Paulo, Brasil); os anticorpos secundários fluorescentes: Alexa 488 (camundongo e coelho), padrão de peso molecular *Full-Range Rainbow*, MK571 e membrana de nitrocelulose Immobilon-P Millipore foram comprados da Invitrogen (São Paulo, Brasil). O anticorpo policlonal contra aquaporina 2 (H-40, coelho) foi adquirido junto à Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, California, USA).

O kit para montagem, corrida e transferências de eletroforese, Mini-PROTEAN III foi comprado de Bio Rad (Hercules, California, USA). As membranas de nitrocelulose Immobilon-P foram compradas da Millipore (Billerica, Massachussets, USA).

Azul de Tiazol (MTT), trizma base, HEPES, dodecil sulfato de sódio (SDS),  $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol, ouabaína e bicarbonato de sódio foram adquiridos junto à Sigma (St Louis, Missouri, USA).

Cloretos de sódio e potássio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, manitol e hidróxido de sódio foram comprados de Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). A

uréia foi comprada de Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil). O cloreto de colina foi adquirido junto à Merck (Frankfurt, Darmstadt, Alemanha). A DL-butionina-sulfoximina (BSO) foi comprada de Flucka Biochemika (Buchs, Suíça).

A linhagem celular Ma104 foi obtida junto ao Rio de Janeiro Cell Bank (RJCB).

#### **4.2. Soluções**

Ao meio de cultura de células (DMEM, baixa glicose) foram adicionados penicilina (100 unidades/mL), estreptomicinina (100 µg/mL), HEPES (3 g/L) e bicarbonato de sódio (0,4 g/L) e o pH foi ajustado para 7,4 com o uso de uma solução de NaOH 1N. O meio foi preparado em água ultra pura (miliQ), sendo posteriormente filtrado através de membranas de 0,2 µm. Soro fetal bovino foi adicionado em concentração final de 10% na hora do uso.

A solução salina com tampão fosfato PBS (NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; KCl 2,7 mM) foi preparada em água MiliQ e esterilizada em autoclave.

A solução de solubilização de células foi preparada em água deionizada (EDTA 10mM; Deoxicolato 0,01 g%; Hepes-tris 20 mM pH 7,0; Sacarose 250 mM).

#### **4.3. Cultura de Células**

As células Ma104 foram cultivadas em DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% em presença de penicilina e estreptomicinina a 37°C. Antes

da adição ao meio, o soro foi submetido uma temperatura de 56°C durante 30 minutos para inativação de proteínas do sistema complemento.

As passagens foram realizadas a cada dois ou três dias ou assim que as células atingissem a confluência. Para os procedimentos de subcultivo, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas duas vezes com 5 mL de PBS estéril para retirada de proteínas e células mortas. Em seguida fez-se adição de 1 mL de tripsina 0,5g/L (diluída em PBS). As células eram então incubadas em estufa por cerca de 10 minutos, tempo suficiente para que as células se soltassem da garrafa. O processo era então interrompido com adição de um volume equivalente de meio de cultura com soro. Após dissociação mecânica de quaisquer grumos de células remanescentes, aproximadamente 3/4 da suspensão de células era transferida para um tubo do tipo Falcon, enquanto o restante era usado na manutenção da garrafa de cultura.

As células eram, então, contadas em microscópio invertido, com o uso de uma câmara de Neubauer para que a quantidade apropriada de células fosse destinada à cultura em placas, de acordo com o experimento planejado. As placas eram incubadas no interior de uma cuba umidificada (Fanem) na estufa de cultura.

#### **4.4. Medida da atividade ATPásica**

A medida da atividade ATPásica foi realizada com o objetivo de avaliar a atividade de transporte exibida pela ABCC1, já que sua atividade depende da hidrólise de ATP.

Para estes experimentos as células Ma104 foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço e incubadas a 37°C em DMEM suplementado com SFB 10%.

Após uma incubação de 24 horas para garantir a adesão das células, o meio de cada poço foi trocado e foram feitos acréscimos graduais à osmolaridade do meio (50 mOsm por adição), durante o curso de 3 dias, com o uso de soluções de NaCl, uréia e manitol com o intuito de adaptar as células ao meio de cultura hiperosmolar. Ao fim do quarto dia de cultura os poços apresentavam as concentrações<sup>1</sup> de 100 mM de NaCl, 200 mM de uréia e manitol e 50/ 100 mM de NaCl/ uréia. Essas concentrações elevavam a osmolaridade do meio em aproximadamente 150 mM (experimentos prévios mostraram que cada 50 mM de NaCl ou 100 mM de uréia aumentavam a osmolaridade do meio em 75 mOsm/L).

Ao fim de um total de 96 horas de incubação, o meio de cultura foi retirado e após lavagem com solução de PBS acrescida do devido osmólito, de modo a evitar um choque osmótico, as células foram raspadas enquanto na solução modificada de PBS, recolhidas em microtubos e centrifugadas a 510 g durante 5 minutos.

Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em 100 µL de uma solução de solubilização (EDTA 10 mM; Deoxicolato 0,01 g%; Hepes-Tris 20 mM pH 7,0; Sacarose 205 mM e água deionizada) e homogeneizado através da passagem pela agulha de uma seringa de insulina (12,7 mm - comprimento, 0,165 mm – diâmetro interno). Os homogenatos eram incubados nesta solução em temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos (e não

---

<sup>1</sup> Estes valores referem-se apenas aos osmólitos adicionados ao meio de cultura, não levando em conta as concentrações de sódio e cloreto presentes na mistura de DMEM.

mais do que 1 hora) antes de serem usados no experimento. A dosagem da concentração de proteína foi realizada segundo o método colorimétrico de Lowry (LOWRY et al., 1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

A metodologia empregada foi adaptada do método descrito por Grubmeyer e Penefsky em 1981 (GRUBMEYER, PENFSKY, 1981). A reação foi iniciada com a adição ao meio do homogenato obtido através das células em cultivo. A reação foi realizada em tubo de ensaio, usando um meio composto de:  $MgCl_2$  4 mM;  $[\gamma\text{-}^{32}\text{Pi}]\text{ATP}$  3000 cpm/nmol; Tris-HCl pH 7,0 100 mM;  $\text{ATP-Na}^+$  3 mM, pH 7,0; EGTA 1 mM; KCl 20 mM; ouabaína 1mM e azida sódica 2 mM. O homogenato de proteína foi diluído de tal forma que a adição de 10  $\mu\text{L}$  ao meio reacional levariam a uma concentração final de 0,3 mg/mL. Após 20 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de carvão ativado (0,25 mg/mL) com HCl 0,1 N. Assim, o  $[\gamma\text{-}^{32}\text{Pi}]\text{ATP}$  não hidrolisado é retirado do meio pelo adsorção ao carvão. Os microtubos contendo o meio reacional e o carvão foram, então, centrifugados durante 10 minutos a 1900 rpm. Foram retiradas alíquotas do sobrenadante contendo o Pi marcado com radioisótopo e as alíquotas foram transferidas para tiras de papel de filtro que, após serem secas, foram colocadas em frascos de vidro contendo solução de cintilação (200 mg/L de POPOP em tolueno). A radiação foi medida usando um contador de cintilação líquida Packard Tricarb A2100 TR (Illinois, USA).

O cálculo da atividade foi realizado através da diferença de  $^{32}\text{Pi}$  resultante da hidrólise do ATP marcado com radioisótopo pelas ATPases na presença e ausência de indometacina 100 mM, usada como inibidor da atividade da ABCC1 (BAKOS et al., 2000; LEITE et al., 2007).



#### 4.5. Medida da Viabilidade Celular

Para a avaliação da viabilidade celular, utilizamos um ensaio que se baseia na redução de um sal de tetrazólio (3-(4-,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – MTT) e conseqüente formação de cristais de formazana no interior de mitocôndrias de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Tanto a densidade do plaqueamento como a concentração de MTT a ser empregada foram determinadas inicialmente através de experimentos específicos nos quais as células foram semeadas em uma placa de 96 poços em densidades de  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$  e  $5 \times 10^4$  células por poço e utilizadas concentrações de MTT de 5 e 10 mg/mL. Assim foi verificado que as condições ideais para o ensaio incluíam o plaqueamento de  $2 \times 10^4$  células por poço e o uso de uma solução de MTT a 10 mg/mL diluída em PBS estéril.

Após as etapas de tripsinização e contagem a suspensão de células foi diluída para uma concentração de  $2 \times 10^5$  células. Com o auxílio de um suporte plástico (esterilizado por radiação ultravioleta) e uma pipeta multicanal, a cada poço foram adicionados 100  $\mu$ L de DMEM<sup>2</sup> com SFB 10% e em seguida outros 100  $\mu$ L da suspensão de células. Para cada experimento foram usadas 3 placas de 96 poços, a fim de se testar diferentes tempos de incubação.

Após as primeiras 24 horas de incubação foram adicionados 2 mM de BSO (inibidor da síntese de GSH) nos poços onde se fez necessário, de modo a garantir que o BSO tivesse tempo de agir, esgotando as reservas celulares

---

<sup>2</sup> Nos poços onde foram adicionados BSO, uma quantidade menor de meio foi adicionada a princípio, de modo a não afetar a concentração final das substâncias supracitadas.

de glutationa. Ao fim de 48 horas de incubação o meio da placa foi trocado, ocasião em que foram adicionados BSO e os osmólitos a serem estudados, elevando então a osmolaridade do meio. Vale salientar, que para a realização dos ensaios de viabilidade (e também de localização), ao contrário dos experimentos de medida de atividade ATPásica, as células não foram adaptadas ao meio hiperosmolar, sendo submetidas a um choque osmótico. Seguiram-se, então, incubações por 24, 48 ou 72 horas em estufa, ao final das quais a respectiva placa era retirada da estufa e eram adicionados ao meio 20  $\mu$ L de MTT. As placas foram incubadas a 37°C e protegidas da luz durante 3 horas, para permitir a formação dos cristais, responsáveis pela cor violácea característica do teste. O meio foi, então, retirado e os cristais de formazana formados foram dissolvidos juntamente com as membranas celulares em 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO). A densidade ótica de cada poço foi medida em leitor de ELISA (Benchmark, BioRad), a 595 nm, usando o filtro de 655 como referência. Todos os pontos foram avaliados em triplicata.

#### **4.6. Imunofluorescência**

Experimentos de imunofluorescência foram utilizados para avaliar a expressão e localização das proteínas ABCC1, aquaporina-2 e da subunidade alfa da  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase.

Para estes experimentos, as células foram cultivadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço e incubadas em estufa a 37°C durante 48 horas, em DMEM suplementado com SFB 10 %. Ao fim do período inicial de incubação, o meio dos poços foi trocado e diferentes osmólitos (cloreto de sódio 175 mM, uréia 350 mM, cloreto de

sódio/ uréia 150 mM/ 50 mM, cloreto de colina 175 mM, cloreto de colina/ uréia 150 mM/ 50mM e manitol 350mM), foram adicionados ao meio de cultura, elevando a osmolaridade do meio em aproximadamente 260 mOsm. As placas foram, então, retornadas à estufa por mais 48 horas.

Ao fim da incubação, o meio foi retirado dos poços, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com 100 µL da solução de fixação FACS Lysing solution durante 20 minutos e durante três minutos com uma mistura 1:1 de metanol e acetona. As células fixadas foram, então, novamente lavadas com PBS (3X) e incubadas por 30 minutos com uma solução de bloqueio (SFB 10% em PBS). As lamínulas foram incubadas durante a noite com 100 µL de uma solução 1:50 em PBS + SFB 2% contendo os anticorpos primários para as proteínas estudadas. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e submetidas a uma hora de incubação com anticorpo secundário conjugado a fluorocromo (Alexa 546). Após nova lavagem com PBS e água deionizada, as lamínulas foram por fim retiradas das placas, montadas em uma lâmina limpa sobre uma gota de glicerol e fechadas com esmalte base.

As lâminas foram, então, observadas em um microscópio de fluorescência (Axiovert, Zeiss) com objetiva de imersão e fotografadas por uma câmera digital (Zeiss AxioCam). Todos os experimentos foram acompanhados de respectivo controle para o anticorpo secundário.

#### **4.7. Western Blotting**

Para verificar a presença de ABCC1, AQP2 e (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase nas células Ma104, bem como as alterações na expressão dessas proteínas

causadas pelo aumento da osmolaridade, foi empregada a técnica de western blotting.

Para verificar a expressão de ABCC1 e da subunidade alfa da  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ , as células Ma104 foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em DMEM + SFB 10% durante 48 horas. Após este tempo o meio foi trocado e osmólitos foram adicionados aos respectivos poços para uma concentração final de 175 mM de NaCl e cloreto de colina, 350 mM de uréia e manitol e 150/ 50 mM de cloreto de sódio/ uréia. As placas foram então incubadas durante outras 48 horas.

Nos experimentos realizados para aquaporina 2 também foram empregadas as linhagens MDCK-C7 (como controle positivo) e MCF7. Os demais procedimentos foram iguais.

Após o fim da incubação, os poços foram lavados com PBS e as células raspadas, centrifugadas e ressuspendidas em 50  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra sem azul de bromofenol e homogeneizadas através da passagem pela agulha de uma seringa de insulina (12,7 mm - comprimento, 0,165 mm – diâmetro interno). A dosagem da proteína foi realizada de acordo com o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Depois de retirada a alíquota para dosagem protéica, o tampão da amostra foi complementado com  $\beta$ -mercaptoetanol, DTT e azul de bromofenol.

As corridas foram realizadas em gel desnaturante de acrilamida/ bis-acrilamida 7%, aplicando-se 50  $\mu\text{g}$  de cada amostra. Foi utilizado o padrão de peso molecular *Full-range Rainbow* da Invitrogen e o kit Mini-PROTEAN Bio-Rad foi empregado para a corrida e transferência. A corrida foi iniciada à voltagem constante de 40 mV, até que as amostras atingissem o final do

*stacking* gel. A voltagem foi então aumentada para 120 mV para o restante da corrida. Esta etapa foi realizada a temperatura ambiente e durou cerca de 80 a 90 minutos.

Ao final da corrida, as amostras já separadas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. O aparato de transferência foi submetido a uma corrente constante de 350 mA durante 2 horas a uma temperatura de -20 °C.

Ao fim da etapa de transferência foi realizada a revelação usando o kit de fosfatase alcalina *Western Breeze* (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As membranas foram então incubadas com uma solução de bloqueio durante 30 minutos a temperatura ambiente e em seguida incubadas por duas horas com a solução apropriada de anticorpo primário diluído 1:500 durante duas horas (A23 para ABCC1, C219 para a P-gP, C464.6 para a (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase (subunidade alfa) e H-40 para a AQP2. As membranas foram, então, lavadas com a solução de lavagem de anticorpo fornecida pelo kit (3x durante 5 minutos). Em seguida procedeu-se à incubação com as soluções de anticorpos secundários durante uma hora. Os anticorpos, fornecidos com o kit de revelação, são conjugados à fosfatase alcalina. Após novas lavagens com solução de lavagem de anticorpo e água deionizada, as membranas foram incubadas em solução de cromógeno até que a visualização fosse possível.

#### **4.8. Análise estatística**

Os experimentos foram analisados através do teste de análise de variância (*one-way* ANOVA), usando intervalo de confiança de 95%. A

magnitude das diferenças foi verificada com os pós-testes de Dunnet e Bonferroni. Para cada experimento foi realizado um mínimo de três ensaios.

## RESULTADOS

*“Wisdom is not acquired  
save as the result of investigation.”*

Sara Teasdale

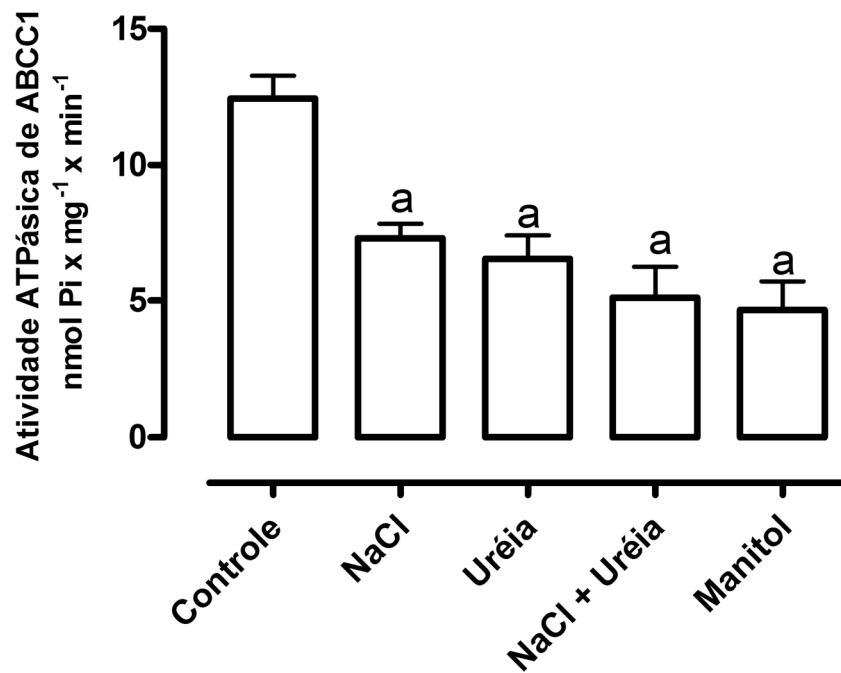
## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Modulação da atividade ATPásica da ABCC1 por diferentes osmólitos em células previamente adaptadas**

Para avaliar a influência de diferentes osmólitos sobre o transportador ABCC1, foi realizada a medição da atividade ATPásica. Os osmólitos foram adicionados às células em cultura de modo progressivo ao longo do experimento.

Os dados obtidos (Figura 8) mostram que a elevação da osmolaridade reduziu a atividade ATPásica exibida pela ABCC1 e que essa redução não dependeu da natureza do osmólito adicionado ao meio. Como as células cresciam e estavam viáveis nesses meios, a redução da atividade não está relacionada à morte celular.

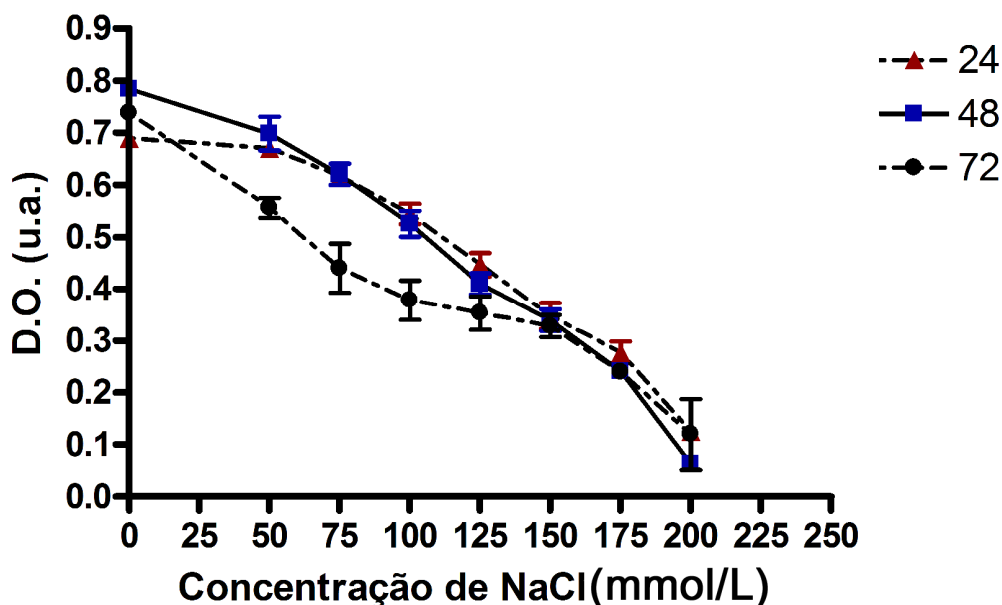




**Figura 8: Efeito da elevação da osmolaridade sobre a atividade ATPásica da ABCC1 medida por sensibilidade à indometacina.** As células Ma104 foram incubadas durante 96 horas em estufa a 37°C, tendo a osmolaridade do meio gradualmente elevada pela adição de NaCl, Uréia, NaCl + Uréia e Manitol, levando a um aumento final da osmolaridade da ordem de 150 mOsm/L em cada caso. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). a – diferente em relação ao controle (p<0,01).

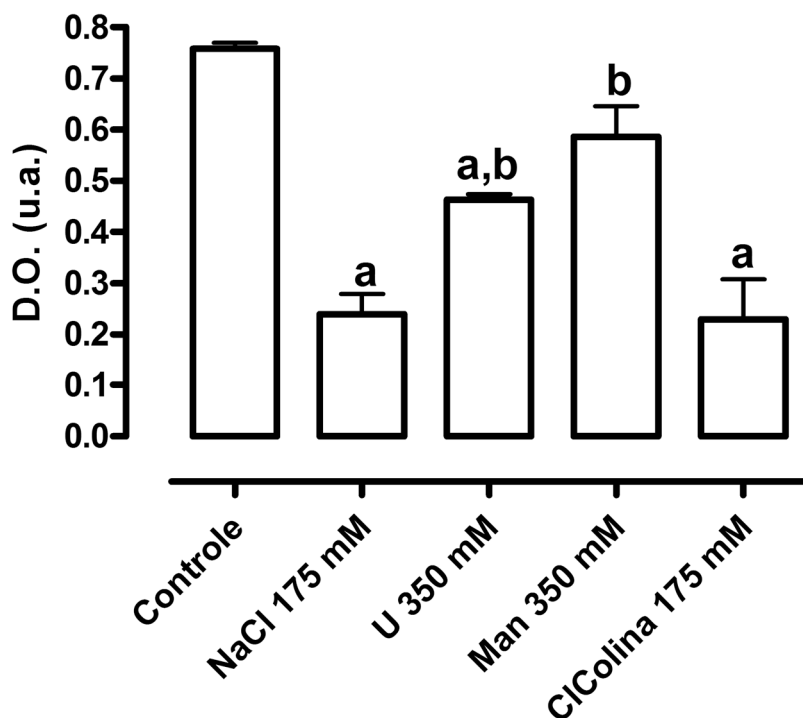
## **5.2. Efeito da hiperosmolaridade na sobrevivência das células embrionárias Ma104**

O resultado apresentado na Figura 8 sugere que a inibição da ABCC1 é uma adaptação à hiperosmolaridade, mas não sabemos se essa adaptação está relacionada à sobrevivência celular ou se são dois fenômenos distintos. Nosso próximo passo, então, foi verificar o efeito do aumento da osmolaridade na sobrevivência das células Ma104. De início, estudamos apenas o aumento de osmolaridade causada pelo NaCl. Para esse experimento, incubamos as células por 24, 48 e 72 h com diferentes concentrações de NaCl e avaliamos a sobrevivência celular pelo ensaio de MTT. Como pode ser visto na Figura 9, as células resistiram bem a concentrações de NaCl até 100 mM, por até 48 h. Para concentrações maiores, a queda de viabilidade foi praticamente linear. Células incubadas com 150 mM de cloreto de sódio já apresentam cerca de 50% da densidade ótica (D.O.) observada nos controles ao fim do experimento. Em 72 h de incubação ocorreu uma ou inflexão na curva, sugerindo a existência de duas populações com sensibilidades diferentes. No entanto, como nesse tempo de incubação o meio já se apresentava mais ácido, e mesmo o controle apresentava uma D.O. menor do que em 48h. Sendo assim, optamos por não utilizar esse tempo de incubação nos próximos experimentos.



**Figura 9: Efeito da elevação da concentração de NaCl sobre a sobrevivência das células Ma104.** Após uma incubação inicial de 24 horas em meio normal, as células Ma104 foram incubadas em DMEM acrescido de diferentes concentrações de NaCl por 24, 48 e 72 horas em estufa a 37°C. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=3).

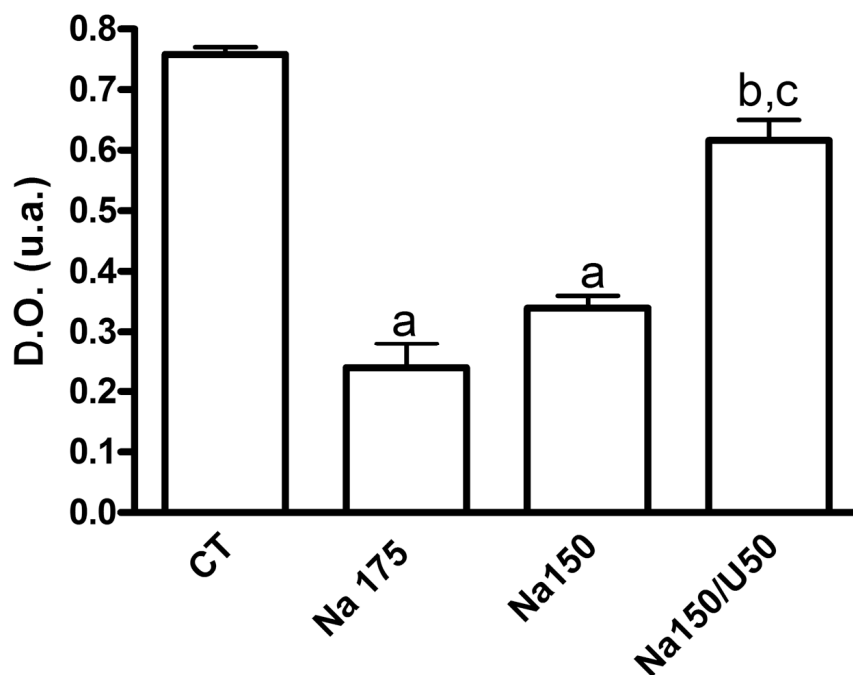
Para avaliarmos se o efeito observado seria do NaCl ou da hiperosmolaridade, foi feita uma comparação entre a viabilidade de células incubadas com NaCl e diversos osmólitos por 48 h. Os osmólitos foram adicionados ao meio inicial (com osmolaridade aproximada de 300 mOsm/L) de forma a obtermos uma osmolaridade final de cerca de 560 mOsm/L (ou seja, um aumento de osmolaridade próximo a 260 mOsm/L). Na Figura 10 pode ser visto que somente quando as células foram incubadas com cloreto de colina foi observado efeito semelhante ao do NaCl. As células foram muito mais resistentes à incubação com uréia, apesar de também terem sua viabilidade reduzida. Com relação ao manitol, apesar de observamos uma redução na D.O., não houve diferença significativa em relação ao controle.



**Figura 10: Efeito de diferentes osmólitos sobre a sobrevivência das células Ma104.** Após uma incubação inicial por 48 horas em meio isosmótico a 37°C, as células Ma104 foram submetidas à incubação por 48 horas, igualmente a 37°C, em meio com osmolaridade elevada pela adição de diferentes osmólitos, de forma a gerar um aumento da osmolaridade da ordem de 260 mOsm. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=3). a – diferente em relação ao controle ( $p < 0,01$ ); b – diferente em relação ao NaCl ( $p < 0,01$ ).

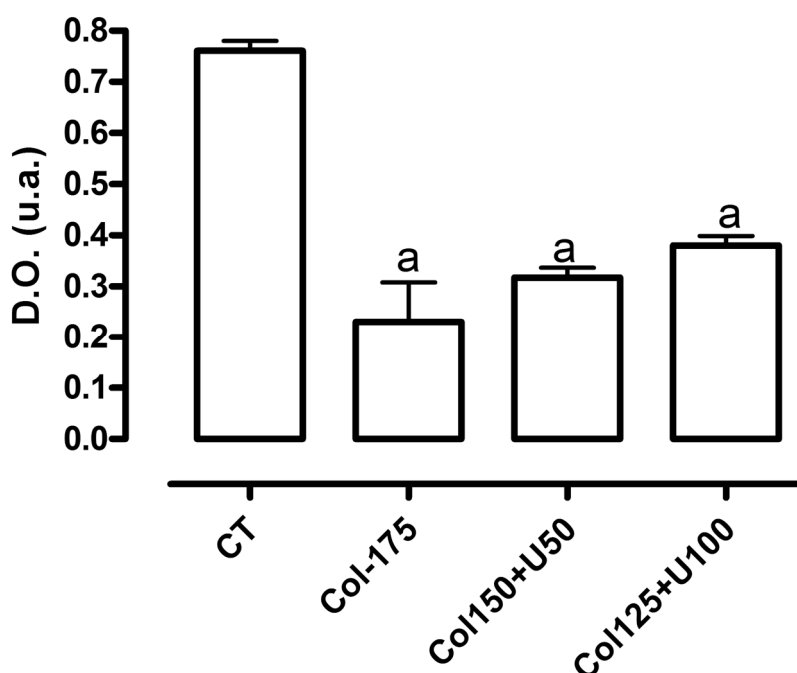
Como os resultados com NaCl e cloreto de colina foram muito semelhantes, parece-nos razoável aceitar que o aumento na concentração de íons  $\text{Cl}^-$  é tóxico para as células, e não necessariamente a hiperosmolaridade. Dados anteriores (ZHANG, TIAN, COHEN, 2000) sugeriram que a uréia desempenha um papel de proteção contra os danos causados pelo NaCl. Porém, outros estudos sugerem o inverso (NEUHOFER et al., 1998; NEUHOFER et al., 2005). Como a hiperosmolaridade medular é gerada basicamente por esses dois osmólitos, resolvemos avaliar a viabilidade das células Ma104 submetidas ao estresse osmótico com NaCl+Uréia. Para isso, incubamos as células com NaCl 175 mM e com Uréia 50 mM + NaCl 150 mM,

de forma a manter a mesma osmolaridade final. Como comparação, incubamos também as células com NaCl 150 mM. Na Figura 11 podemos ver que a D.O. das células incubadas com NaCl+Uréia foi maior do que a da incubação com NaCl somente.



**Figura 11: Efeito da uréia sobre o declínio de sobrevivência das células Ma104 promovido pela alta concentração de sódio.** Após uma incubação inicial por 48 horas em meio isomótico a 37°C, as células Ma104 foram submetidas à incubação por 48 horas, igualmente a 37°C, em meio com osmolaridade elevada pela adição de diferentes concentrações de NaCl e Uréia de forma a atingir um aumento máximo de osmolaridade da ordem de 260 mOsm/L. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=3). a – diferente em relação ao controle ( $p < 0,001$ ); b – diferente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ); c – diferente em relação ao NaCl 150 mM ( $p < 0,001$ ).

Para verificar se o efeito protetor da uréia era dependente do íon  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$ , fizemos o mesmo tratamento utilizando cloreto de colina. Neste caso, não foi possível observar nenhum efeito protetor (Figura 12), sugerindo que a proteção observada na Figura 11 está relacionada ao íon  $\text{Na}^+$ .

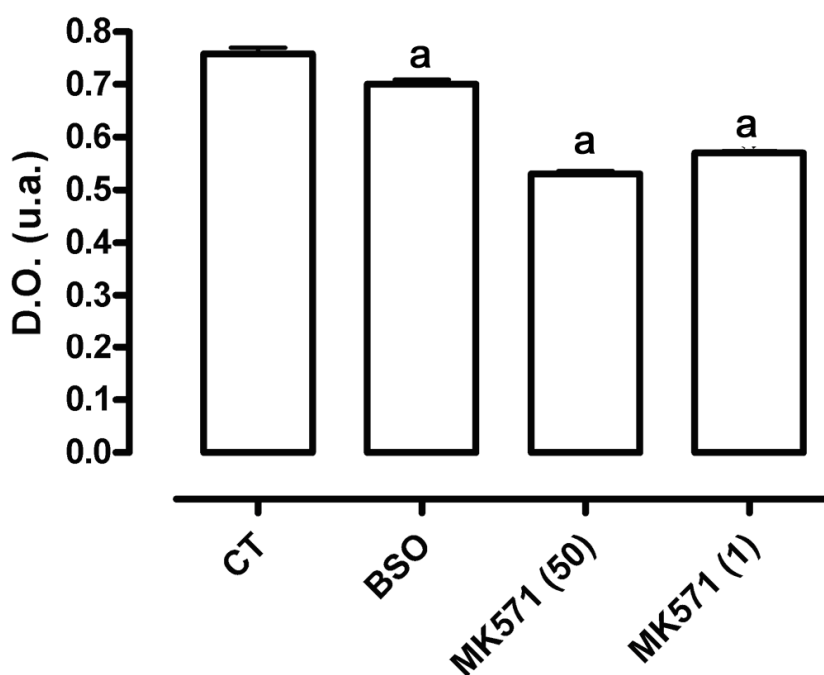


**Figura 12: Efeito da uréia sobre o declínio de sobrevivência das células Ma104 promovido pela alta concentração de cloreto de colina (Col).** Após uma incubação inicial por 48 horas em meio isosmótico a 37°C, as células Ma104 foram submetidas à incubação por 48 horas, igualmente a 37°C, em meio com osmolaridade elevada pela adição de diferentes concentrações de cloreto de colina e Uréia, de forma a gerar um aumento máximo de osmolaridade da ordem de 260 mOsm. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=3). a - diferente em relação ao controle ( $p < 0,001$ ).

De posse destes resultados, iniciamos a verificação do envolvimento da ABCC1 na resistência das células Ma104 à hiperosmolaridade. Para isso, escolhemos inicialmente dois inibidores largamente utilizados na literatura, o MK571 e a butionina-sulfoximina (BSO). Como a proteína ABCC1 transporta GSH, GSSG, ou substratos conjugados a GSH ou em co-transporte com GSH, a ausência deste tripeptídeo, seja pelo efluxo aumentado, seja pela inibição de sua síntese, impede o funcionamento da bomba em qualquer situação.

O próximo passo foi, então, verificar o efeito desses dois inibidores nas células Ma104 controle, para avaliar uma possível toxicidade associada ao tratamento. Como pode ser visto na Figura 13, o MK571 foi tóxico para as

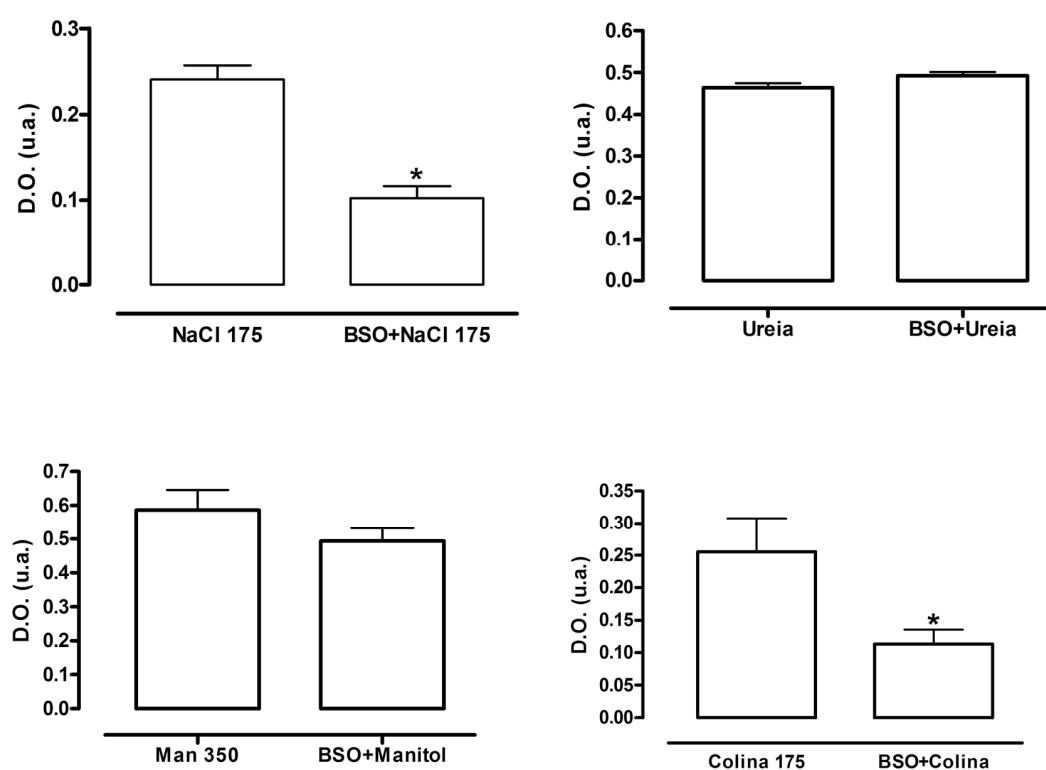
células, nas duas concentrações utilizadas. Já o efeito do BSO foi bem menor, comparativamente, apesar de também ter diminuído significativamente a viabilidade celular. Por essa razão, utilizamos somente o BSO para estudar o efeito da inibição da ABCC1 na viabilidade de células submetidas à hiperosmolaridade.



**Figura 13: Efeito de inibidores da ABCC1 na viabilidade das células Ma104.** As células foram repicadas em uma concentração de  $2 \times 10^4$  cel/poço e, após incubação por 24h para atingir completa adesão, foram adicionados ao meio de cultura MK571 (50  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M) ou BSO (1mM). As células permaneceram por 72h nesse meio. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=3). a - diferente em relação ao controle (p<0,01).

Para o estudo do efeito do BSO na viabilidade de células submetidas à hiperosmolaridade gerada por diferentes osmólitos, as células Ma104 foram submetidas ao tratamento com BSO durante 24 horas antes do aumento da osmolaridade e durante a incubação subsequente. Ao estudarmos o efeito do BSO na hiperosmolaridade gerada por diferentes osmólitos, notamos que a

sensibilização ocorreu somente para a incubação com NaCl ou cloreto de colina, mas não foi significativa para uréia ou manitol (Figura 14). Os resultados obtidos sugerem, mais uma vez, que os efeitos observados não são devido à hiperosmolaridade em si, mas ao aumento da concentração de NaCl no meio. Aparentemente, a diminuição da síntese de GSH sensibiliza as células Ma104 ao NaCl e ao cloreto de colina, ainda que não altere a viabilidade das células tratadas com uréia ou manitol.

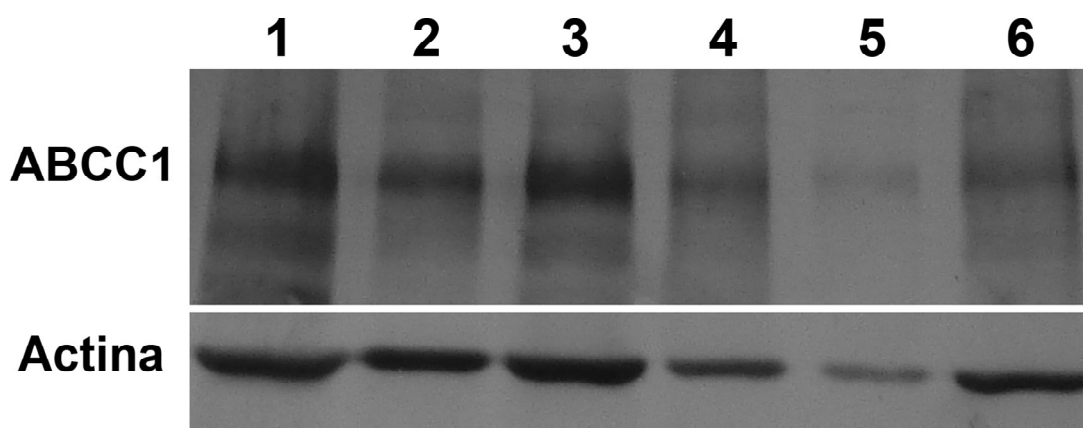


**Figura 14: Efeito do BSO sobre o declínio de sobrevivência das células Ma104 promovido pela alta concentração de cloreto de sódio.** Após uma incubação inicial por 24 horas a 37°C, foi adicionado BSO ao meio de cultura, em concentração final de 1mM, e após nova incubação por 24 horas, foi adicionado aos poços cloretos de sódio e colina nas concentrações finais de 175 mM e manitol e uréia 350 mM elevando a osmolaridade do meio em cerca de 260 mOsm/L, seguindo incubação de 48 horas a 37°C. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=3).



### 5.3. Efeito da hiperosmolaridade na expressão e localização da ABCC1

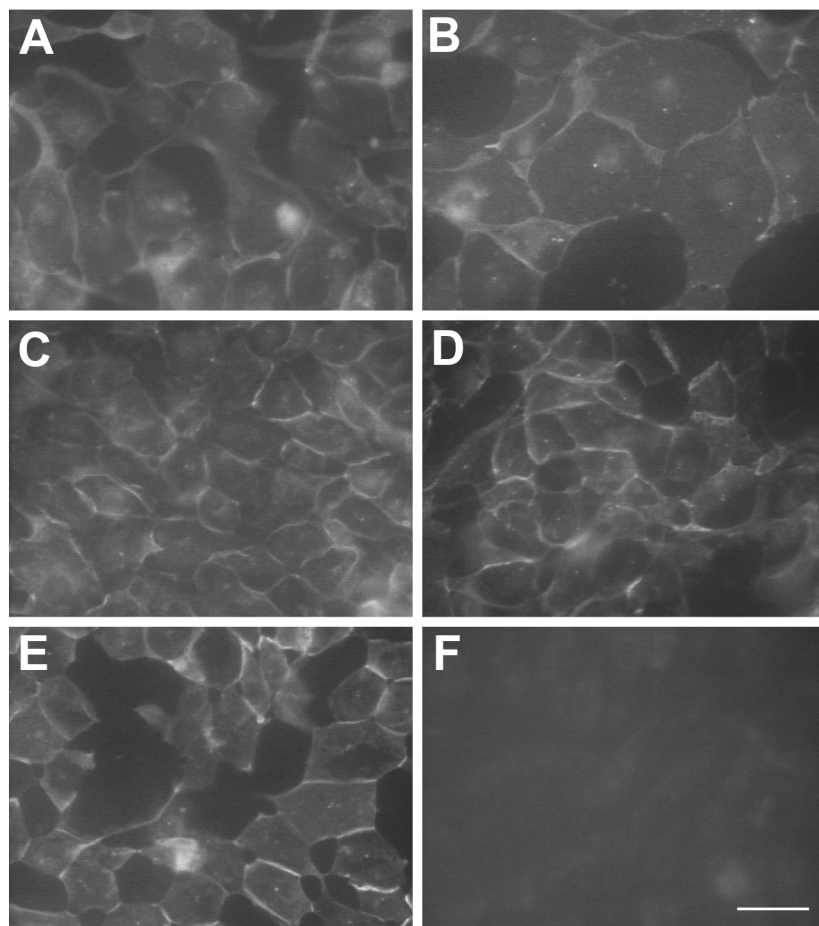
Para verificar o efeito do aumento da osmolaridade do meio de cultura, bem como do aumento da concentração de osmólitos específicos na expressão e localização da ABCC1, foram realizados, conforme descritos na seção de “Materiais e Métodos”, experimentos de imunofluorescência e “western blotting”. Durante a realização dos experimentos de “western blotting”, verificamos que a actina (usada como controle) parecia acompanhar as variações da ABCC1, como mostrado na Figura 15. Por essa razão, optamos por não fazer densitometria dos “blottings” e estamos estudando a possibilidade de uso de GAPDH ou outra proteína para usar como controle.



**Figura 15: Efeito de diferentes osmólitos sobre a expressão da ABCC1 nas células Ma104.** Após incubação inicial por 24 horas a 37°C, diferentes osmólitos foram adicionados ao meio para aumentar a osmolaridade em cerca de 260 mOsm/L. Seguiu-se nova incubação de 48 horas a 37°C. Da esquerda para a direita: 1) Controle, 2) NaCl (175 mM), 3) Uréia (350 mM), 4) NaCl/ Uréia (150/ 50 mM), 5) Cloreto de Colina (175 mM) e 6) Manitol (350 mM). Figura representativa de 3 experimentos independentes.

Para verificar a localização da proteína, fizemos uma imunomarcagem com anticorpo específico contra a ABCC1. Na Figura 16 podemos observar que a marcação nas células do controle (Figura 16-A) é tênue, localizada

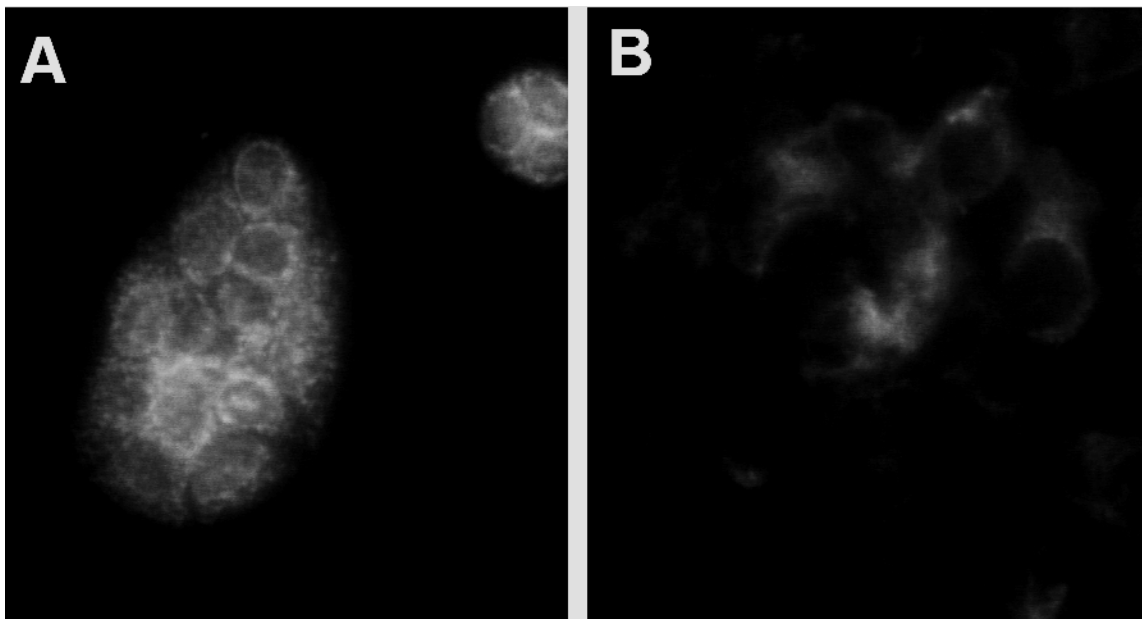
preferencialmente na membrana celular. Esse padrão se repete para as células incubadas com NaCl (Figura 16-B). Já as células incubadas com uréia, uréia+NaCl ou cloreto de colina (Figuras 16 - C, D e E) apresentam uma marcação mais forte na membrana basolateral.



**Figura 16: Efeito de diferentes osmólitos sobre a expressão e localização da ABCC1 nas células Ma104.** Após incubação inicial por 48 horas a 37°C, diferentes osmólitos foram adicionados ao meio para aumentar a osmolaridade em cerca de 260 mOsm/L. Seguiu-se nova incubação de 48 horas a 37°C. A (controle); B (NaCl); C (Uréia); D (NaCl + Uréia); E (cloreto de Colina); F (controle com omissão do anticorpo primário). Barra de calibração – 30 μM. Figura representativa de 3 experimentos independentes.

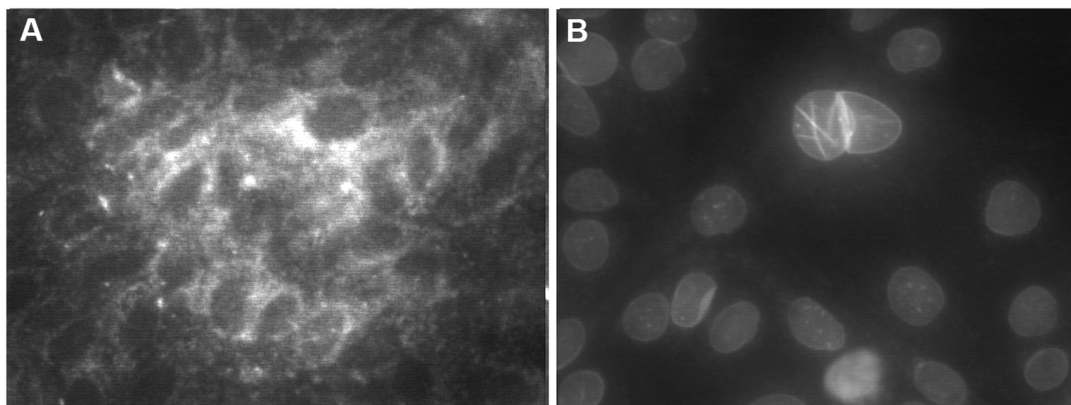
#### 5.4. Estudo de caracterização das células Ma104

A linhagem Ma104 é proveniente de rim de macaco e tem características de células epiteliais. Sua utilização em pesquisa tem sido quase que restrita ao estudo de infecções virais, por ser suscetível a diversos vírus humanos e animais (CHEMELLO et al., 2002; KHADRE, YOUSEF, 2002; SUGIYAMA et al., 2004; SIMS et al., 2008). Nosso laboratório vem estudando algumas particularidades dessas células, como a resistência à ouabaína e a expressão e modulação das proteínas ABCB1 e ABCC1 (CAPELLA et al., 1999; CAPELLA et al., 2001) e, no presente trabalho, sua resposta à hiperosmolaridade. No entanto, até hoje, nenhum esforço foi feito para a caracterização dessa linhagem. Como os resultados obtidos até aqui sugerem que estas células sejam de túbulo distal reto ou de ducto coletor, resolvemos iniciar sua caracterização. Como primeiro passo, avaliamos a marcação para aglutinina de amendoim (*peanut agglutinin* ou PNA). Para comparação, utilizamos a linhagem MDCK-C11, que possui características de células intercalares de ducto coletor (FERNANDEZ, OLIVEIRA-SOUZA, MALNIC, 2000; TARARTHUCH, FERNANDEZ, MALNIC, 2007). Como pode ser visto na Figura 17, as células Ma104 não têm marcação significativa para PNA, sugerindo que essas células não são intercalares.



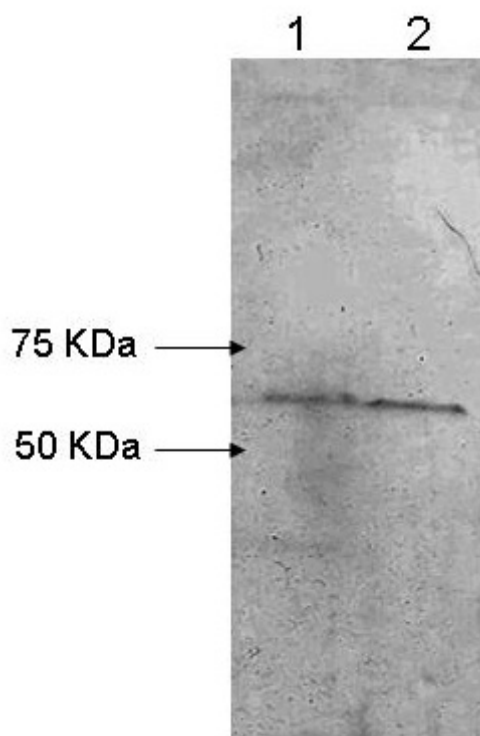
**Figura 17: Marcação das células MDCK-C11 e Ma104 para PNA.** As células MDCK-C11 (A), e Ma104 (B) foram incubadas durante 30 min com PNA (100  $\mu$ M), fixadas e observadas em microscópio de fluorescência.

O próximo passo foi verificar a expressão de aquaporina 2 (AQP2), característica de células principais de ducto coletor. Para nossa surpresa, a linhagem Ma104 teve uma forte marcação para AQP2, no entanto, essa marcação era nuclear (Figura 18-B). A linhagem MDCK-C7, com características de ducto coletor, teve marcação difusa citoplasmática (Figura 18-A), como esperado, já que as células estavam em meio sem adição de vasopressina.



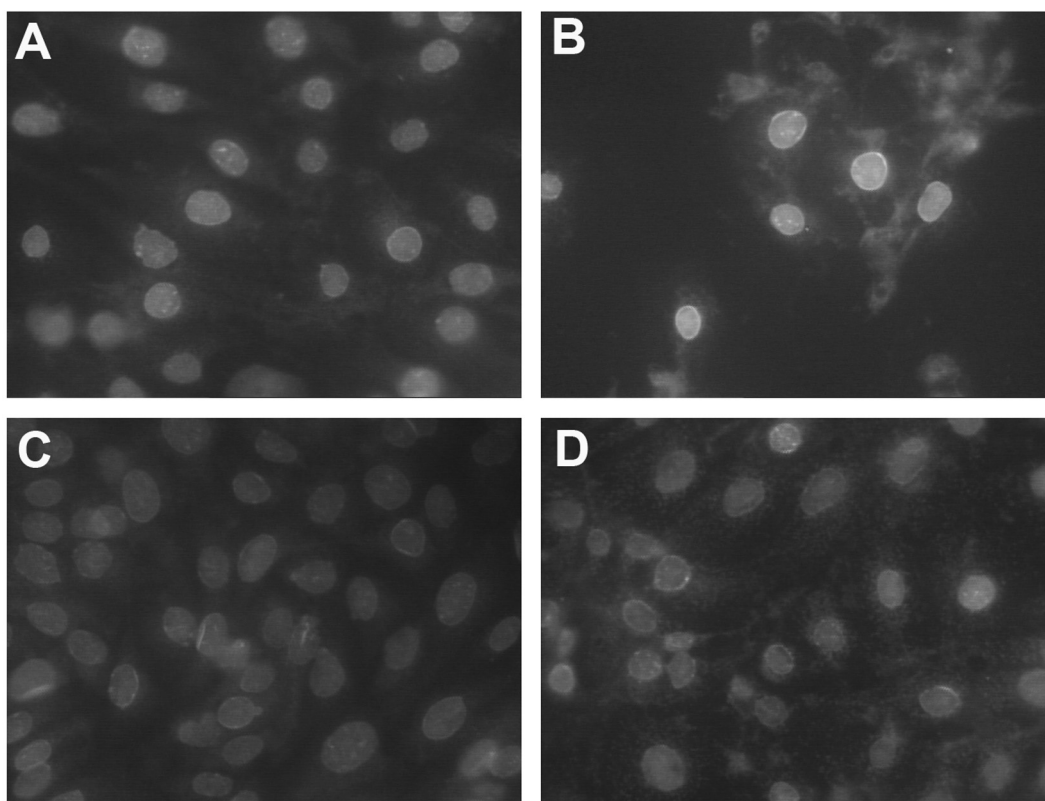
**Figura 18: Marcação das células MDCK-C7 e Ma104 com anticorpo anti-AQP2.** As células MDCK-C7 (A), e Ma104 (B) foram fixadas, incubadas com anticorpo contra aquaporina 2 e observadas em microscópio de fluorescência.

Devido a este resultado inesperado, pensamos na possibilidade do anticorpo utilizado ter marcação inespecífica para alguma proteína nuclear, que só existisse nas células Ma104. Foi feito, então, um “western blotting”, para verificar possível marcação cruzada do anticorpo contra AQP2, usando como controle as células MDCK-C7. No entanto, como pode ser visto na Figura 19, a marcação foi semelhante nas duas linhagens celulares, apesar do peso molecular ser equivalente a aproximadamente o dobro do descrito para AQP2 (29 KDa). Alguns pesquisadores têm observado que a AQP2 pode aparecer na forma de tetrâmero ou dímero (KAMSTEEG et al., 1999; SHINBO et al., 1999), e este último teria peso molecular próximo ao observado em nossos experimentos.



**Figura 19: Expressão da AQP2 nas linhagens Ma104 e MDCK-C7.** As células foram incubadas durante 48 horas a 37°C, removidas da placa e processadas para *western blotting* de acordo com o que foi descrito em Materiais e Métodos. Da direita para a esquerda 1)MDCK-C7 e 2)Ma104.

O passo seguinte foi, então, verificar se a expressão da aquaporina 2 era de alguma forma afetada pela adição de osmólitos ao meio de cultura. Como mostrado na Figura 20, a adição de cloreto de sódio exacerba a marcação nuclear e citoplasmática de AQP2 (Fig.20-B). No entanto, a adição de cloreto de sódio em conjunto com a uréia parece aumentar a fluorescência citoplasmática (Fig.20-D), embora não mostre diferença aparente no núcleo. A adição de uréia sozinha (Fig.20-C) não parece afetar a localização da aquaporina 2.



**Figura 20: Efeito de diferentes osmólitos sobre a expressão e localização da Aquaporina 2 nas células Ma104.** Após incubação inicial por 48 horas a 37°C, diferentes osmólitos foram adicionados ao meio para aumentar a osmolaridade em cerca de 260 mOsm/L. Seguiu-se nova incubação de 48 horas a 37°C. A (controle); B (NaCl); C (Uréia); D (NaCl + Uréia). Figura representativa de 3 experimentos independentes.

## DISCUSSÃO

*“Freedom and order are not  
incompatible...truth is strenght...  
free discussion is the very life of truth.”*

Thomas Henry Huxley



## 6. DISCUSSÃO

Graças à capacidade de transportar glutatona, leucotrieno 4 (LCT4) e prostaglandinas, a proteína ABCC1 exerce importante função nos processos inflamatórios e no estresse oxidativo, (LAUPÈZE et al., 2001a; COLE, DEELEY, 2006). Seu papel fisiológico tem sido estudado em diversos órgãos e sistemas e, talvez, um dos resultados mais importantes seja a recente descoberta de que a sua presença no endotélio é essencial para a resposta hipertensiva à angiotensina II (WIDDER et al., 2007).

No rim, esta proteína não deve apresentar uma função secretora, já que está localizada na membrana basolateral de células do túbulo distal reto e do ducto coletor (PENG et al., 1999). Este achado não estimulou a realização de estudos posteriores sobre sua importância nesse órgão. No entanto, diversas evidências apontam para um papel da ABCC1 nos mecanismos de concentração urinária. Sabe-se, por exemplo, que o túbulo distal reto apresenta sensibilidade especial à depleção de GSH provocada por dietil-maleato (DEM, um substrato para a enzima GSH-S-transferase, que catalisa a formação do conjugado GSH-DEM e diminui o estoque de GSH intracelular). Animais tratados com DEM apresentam severa deficiência na concentração urinária (TORRES, RODRIGUEZ, ELIAS, 1987a; TORRES, RODRIGUEZ, ELÍAS, 1987b). Além disto, foi visto que a depleção de GSH também provoca acidose em ratos, com aumento da fração de bicarbonato excretada (RODRIGUEZ, TORRES, ELIAS, 1991).

Ao lado dos efeitos da depleção da glutatona, sabe-se que a ABCC1 transporta conjugados de ácido etacrínico (CIACCIO et al., 1996; ZAMAN et al., 1996), um inibidor do transportador tríplice presente no túbulo distal reto, razão

pela qual é utilizado como diurético (JACKSON, 2003). Por outro lado, a furosemida, outro diurético de alça, inibe a atividade ATPásica desta proteína (BAKOS et al., 2000).

A partir dos dados presentes na literatura, decidimos estudar o papel desempenhado pela ABCC1 no epitélio renal. Utilizamos como modelo as células Ma104, que apresentam forte expressão desta proteína, além de serem resistentes a hiperosmolaridade.

Com o intuito de verificar se a atividade da ABCC1 seria influenciada pelo aumento da osmolaridade do meio, verificamos inicialmente as possíveis alterações na atividade de transporte por meio da medida de sua atividade ATPásica. Dessa forma, verificamos que as células adaptadas à hiperosmolaridade fisiológica da medula renal apresentam um decréscimo da atividade ATPásica da ordem de 40 a 60%, independentemente do osmólito utilizado (Figura 8). A redução da atividade parece estar de acordo com a idéia corrente de que a inibição da ABCC1 aumentaria as reservas internas de glutathiona, protegendo as células de eventuais danos oxidativos (LABERGE et al., 2007). Por outro lado, essa redução da atividade da ABCC1 pode explicar um dos mecanismos responsáveis pelo processo de regulação do volume celular frente a choques hiperosmóticos. É sabido que nessas condições ocorre um acúmulo de osmólitos orgânicos intracelulares que permite as células manter seu volume celular constante em meio hiperosmótico (MONTROSE-RAFIDAZEH, GUGGINO, 1990; KANEKO et al., 1997; SCHÄFER et al., 2007). Assim sendo, a ABCC1 pode desempenhar importante papel nesse processo.

O próximo passo realizado foi o estudo do papel da ABCC1 na sobrevivência celular à hiperosmolaridade. No entanto, para isto

necessitávamos, inicialmente, otimizar as condições experimentais. Desta forma, avaliou-se a resposta das células Ma104 à hiperosmolaridade causada por NaCl. A curva de sódio (Figura 9) mostrou que, como era de se esperar, a viabilidade celular é dose e tempo dependentes. Mais ainda, para concentrações de NaCl acima de 125 mM, não notamos diferença de sensibilidade entre 24, 48 e 72h, sugerindo que existe uma sub-população na linhagem de células Ma104 mais resistente ao NaCl. Sendo assim, nos experimentos subseqüentes, foi utilizada a concentração de 175 mM de NaCl, o que eleva a concentração do meio em aproximadamente 260 mOsm/L, bem como concentrações de uréia, manitol e cloreto de colina necessárias para obter o mesmo efeito. Além disto, as células foram incubadas por 48 h, período suficiente para que ocorram alterações na síntese ou localização de proteínas e, também, por impedir que se reduza o conteúdo de nutrientes e ocorre acidificação do meio devido ao metabolismo celular, o que pode ocorrer em períodos mais longos de cultura, como o de 72 horas.

A análise do efeito de outros osmólitos permitiu verificar que a diferença de viabilidade é semelhante quando a hiperosmolaridade é obtida tanto com NaCl como com cloreto de colina (Figura 10) e que a diminuição da viabilidade celular provocada pela uréia era significativamente menor. As células tratadas com manitol foram as únicas a não apresentar uma diferença significativa em relação ao controle. Esses resultados sugerem que, apesar de todos os osmólitos terem inibido a atividade ATPásica da ABCC1 de forma semelhante, a sobrevivência celular à hiperosmolaridade depende de outros fatores. Na verdade, essa relação já era esperada, pois vários são os estudos mostrando o papel de diversas proteínas, como as proteínas de choque térmico, na

manutenção da viabilidade celular frente à hiperosmolaridade (SCHLIESS, WIESE, HÄUSSINGER, 1999; SANTOS et al., 2003; LEE, LEE, SEO, 2005).

Como a viabilidade das células tratadas com NaCl e cloreto de colina é semelhante, é provável que o cloreto, e não o sódio, esteja envolvido na redução da sobrevivência em tempos prolongados de incubação, contrariando alguns autores que sugerem que o sódio é o principal agente citotóxico. Nestes estudos, nos quais foi medida a atividade da  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ , foi verificado que esta enzima é inibida pela hiperosmolaridade gerada pelo uso de NaCl, mas não pelo uso de cloreto de colina (MORI, COWLEY, 2004; ABE et al., 2006). Durante estes estudos, no entanto, amostras de tecido foram incubadas durante segundos, em contraste com nossos resultados que foram obtidos ao longo de dias de incubação, sugerindo que tempos maiores de incubação podem ser necessários para a observação de efeitos relacionados ao cloreto de colina.

A redução da viabilidade celular promovida pela adição de cloreto de sódio foi, em parte, revertida pela presença de uréia (Figura 11). Dados da literatura mostram que a uréia, que pode induzir estresse oxidativo, também ativa mecanismos capazes de contrapor seu efeito (TIAN et al., 2001; CAI, FERRARIS, BURG, 2003). Já o aumento da concentração de sódio, mesmo sendo capaz de ativar mecanismos de proteção, só o faz quando o NaCl é adicionado de maneira gradual (CAI et al., 2002; CAI, FERRARIS, BURG, 2003). Alguns estudos mostraram que a uréia pode reverter o efeito deletério do NaCl (ZHANG, TIAN, COHEN, 2000) em células de ducto coletor, e também que o NaCl poderia reverter o efeito lesivo da uréia (NEUHOFER et al., 1998).

Portanto, parece existir um fator comum na resposta celular a essas duas substâncias, que ainda não foi elucidado.

Embora a adição de cloreto de colina ao meio de cultura tenha produzido efeitos semelhantes aos de cloreto de sódio na viabilidade celular, a resposta à adição de uréia foi diferente. O efeito do NaCl sobre a viabilidade foi parcialmente abolido com a adição simultânea de uréia, mas o mesmo não foi verdade para o cloreto de colina (Figura 12). A colina e seus metabólitos, incluindo fosfolipídios, betaína e acetilcolina, asseguram a integridade estrutural e funções sinalizadoras das membranas celulares (ZEISEL, 2006). A colina é um precursor para a biossíntese de fosfatidilcolina (FC), um fosfolípido predominante (>50%) na maioria das membranas dos mamíferos (ZEISEL, 2006). Estudos realizados em ratos sugerem que a proporção de fosfolípidos poli-insaturados presentes na membrana celular, suscetíveis a reações de peroxidação, afetam a resistência a danos causados por espécies reativas de oxigênio

De posse das informações acima, e apesar dos resultados sugerirem a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre os efeitos celulares da hiperosmolaridade causados pelo uso de NaCl, uréia e cloreto de colina, voltamos ao nosso objetivo inicial, e passamos a estudar se a inibição da ABCC1 poderia alterar a resposta das células Ma104 a esses osmólitos. Para nossa surpresa, o tratamento das células com dois inibidores clássicos da ABCC1 (Figura 13) mostrou que tanto o MK571 quanto o BSO são capazes de afetar a viabilidade dessas células. É possível que o efeito do BSO seja devido a seu próprio mecanismo de ação, alterando o potencial redox das células e, assim, interferindo com a redução do MTT. Com relação ao MK571, não

sabemos porque mesmo uma concentração relativamente baixa (1  $\mu\text{M}$ ) seria tóxica para essa linhagem. Como o efeito do BSO é bem menor que o observado com o MK571, utilizamos o primeiro nos experimentos seguintes.

Como o BSO inibe a síntese de GSH, e por isso inibe o transporte de diversas substâncias conjugadas à glutathiona (LASH, 2005), nossos resultados não permitem diferenciar se o efeito observado é pela falta de GSH ou pela ausência de transporte pela ABCC1. A adição de BSO potencializou o efeito do cloreto de sódio e do cloreto de colina provocando, em ambos, redução semelhante de viabilidade. No entanto, o efeito obtido com outros osmólitos não foi influenciado pela incubação prévia com BSO. Estes resultados sugerem, mais uma vez, que a citotoxicidade observada é devida ao íon cloreto e que a glutathiona, ou a ABCC1 tem papel importante na proteção contra os danos causados por esse íon.

Nosso próximo passo foi estudar a expressão e a localização da ABCC1 em células Ma104 tratadas com os diferentes osmólitos. No entanto, como a actina não se mostrou um bom controle para o *imunoblotting*, já que parece também ter sua expressão alterada, fixamo-nos somente nos resultados referentes à localização da ABCC1. Dados da literatura indicam que a organização e expressão de filamentos de actina é necessária para a atividade de transporte da ABCB1 (TAKESHITA et al., 1998; LUCIANI et al., 2002; FU, ROUFOGALIS, 2007), sendo plausível esperar que o mesmo seja verdadeiro para a ABCC1. Assim sendo, é possível que alterações na tonicidade do meio alterem a expressão e a polimerização da actina, o que poderia levar a uma redução da atividade da ABCC1.

Os ensaios de imunofluorescência (Figura 16) mostram que a adição de uréia, cloreto de sódio + uréia e cloreto de colina promovem uma elevação da marcação da ABCC1 na membrana basolateral. Este resultado é intrigante, pois vai contra o fato de que sua atividade ATPásica se encontra reduzida em situações de hiperosmolaridade, como observado na Figura 8. Considerando que já foi verificado que a ABCC1 aumenta a liberação de ATP de eritrócitos (ABRAHAM et al., 2001), é possível que esta proteína também atue como um transportador de ATP nas células MA104, o que explicaria o aumento de sua localização na membrana acompanhado de redução em sua atividade ATPásica. Também foi verificado que a redução da osmolaridade provoca a liberação de ATP em células do túbulo distal reto (SILVA, GARVIN, 2008). Assim sendo, é possível que uma liberação similar através da ABCC1 ocorra durante situações de hiperosmolaridade.

No intuito de iniciar a caracterização das células Ma104, foram realizados experimentos de fluorescência utilizando aglutinina de amendoim (PNA). Esta lectina é um conhecido marcador para células  $\beta$ -intercalares de ducto coletor renal (SCHUMACHER, STREHL, MINUTH, 2003). A observação de que as células Ma104 não apresentam marcação para PNA sugerem que elas não são células intercalares. Se por um lado, suas características no que se refere à resistência à osmolaridade e a expressão de ABCC1 indicam que se trata de uma célula de origem medular, o fato de não ser marcada por PNA, exclui a possibilidade de ser uma célula do tipo intercalar. Portanto, é plausível supor que sua origem esteja associada às células principais.

Para elucidar esta dúvida verificamos a presença de aquaporina-2, freqüentemente utilizada como marcador de células principais (LACHHEB et

al., 2008). A análise comparativa da presença de aquaporina-2 por imunofluorescência nas células Ma104 e MDCK-C7, sendo que as células MDCK-C7 apresentam características próprias das células principais, mostra que ambas expressam aquaporina-2, todavia com distribuição e localizações diferentes (Figura 18). Curiosamente, ao contrário do esperado, a marcação para as células Ma104 não se concentrou no citoplasma, e sim no núcleo. Para eliminar qualquer dúvida quanto a uma possível marcação inespecífica, foram realizados experimentos de *Western Blotting* para as duas linhagens, usando assim a MDCK-C7 como controle positivo. A marcação com anticorpo revelou resultados idênticos para ambas linhagens (Figura 19). Entretanto, o peso molecular encontrado, de 60 kDa, não corresponde ao esperado, de 29 kDa para um monômero de AQP-2 (HE et al., 2006). O resultado também não corresponde ao peso do tetrâmero, que é a forma funcional do canal (KAMSTEEG et al., 1999; KAMSTEEG et al., 2000), e tampouco ao peso da forma glicosilada do monômero, que é de cerca de 40-50 kDa (KANNO et al., 1995). Em estudo realizado em células de túbulo proximal de rim de porco, foi encontrada a presença de uma banda em torno de 60kDa, semelhante à observada em nossos experimentos, creditada à um possível dímero da aquaporina-2 (SHINBO et al., 1999). Assim sendo, nossos dados são compatíveis com a expressão de aquaporina-2 na forma de dímeros.

Os ensaios de imunofluorescência realizados para verificar a influência de diferentes osmólitos na expressão e localização da aquaporina-2 indicam o aumento de sua expressão tanto no núcleo quanto no citoplasma em resposta à elevação da concentração de sódio (Figura 20). Considerando que os mecanismos de apresentação da aquaporina-2 na membrana celular são



dependentes da ação do ADH, é compreensível que nas condições experimentais utilizadas (ausência de ADH) este canal não se apresente expresso nas membranas celulares, ainda que presentes no interior celular.

Dados da literatura obtidos em ratos Brattleboro, (utilizados como modelo de diabetes insipidus) submetidos a dietas hipersódicas ou hiperglicêmicas mostram aumento da expressão de aquaporina 2 (LI et al., 2006). Outros estudos utilizando os mesmos modelos ou modelos diferentes corroboram esses resultados (MICHIMATA et al, 2003; CHU et al, 2007; LI et al, 2008).

Alem disto, foi demonstrada recentemente a presença de AQP2 em “vas deferens” de ratos, a qual não é regulada por ADH (STEVENS et al, 2000).

Sendo assim, apesar de, no momento, não sabermos o motivo pelo qual a AQP2 é expressa no núcleo das células Ma104, é possível que esta proteína tenha um papel importante e ainda não descrito em células renais embrionárias.

## CONCLUSÃO

*“Reasoning draws a conclusion, but does not  
make the conclusion certain, unless the mind  
discovers it by the path of experience.”*

Roger Bacon

## 7. CONCLUSÃO

Os experimentos realizados permitiram concluir os seguintes aspectos referentes ao comportamento fisiológico das células Ma104:

1- A atividade ATPásica da ABCC1 é inibida pela hiperosmolaridade independentemente do osmólito utilizado.

2- O aumento da osmolaridade do meio de incubação através da adição de cloreto de sódio ou de cloreto de colina reduz a viabilidade das células Ma104 em cultura. Todavia, o aumento da osmolaridade do meio de incubação através da adição de manitol não teve efeito deletério sobre a viabilidade celular. Assim sendo, o efeito deletério observado com cloreto de sódio ou de colina não está diretamente associado ao aumento da osmolaridade do meio.

3- A presença de uréia aumenta a viabilidade celular das células incubadas em meio hipertônico gerado pela adição de NaCl, mas não pela adição de cloreto de colina, indicando a existência de mecanismos citotóxicos distintos para cada um dos casos.

4- A observação de que a inibição da ABCC1 reduz a viabilidade celular das células tratadas com NaCl ou cloreto de colina permite concluir que esta proteína possa desempenhar um papel importante na sobrevivência das células Ma104.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

*“There will come a time when  
you believe everything is finished.*

*That will be the beginning.”*

Louis L'amour

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar o possível papel fisiológico da ABCC1 na resistência à hiperosmolaridade, usando além das células Ma104, as células MDCK C7 e C11 provenientes de ducto coletor.
- Investigar a ação de hormônios, como o ADH e a aldosterona sobre a atividade e expressão da ABCC1, já que a ouabaína é capaz de afetar sua expressão, reduzindo-a em concentrações normalmente encontradas no plasma (VALENTE et al., 2007), sugerindo a possibilidade de regulação hormonal da ABCC1.
- Verificar se a inibição da ABCC1, como os dados obtidos com o presente trabalho sugerem, está relacionada à manutenção de níveis intracelulares de glutatona.
- Confirmar os resultados obtidos com estudos em animais submetidos a dietas secas ou dieta de alto sódio, já que dados da literatura mostram que diferenças na dieta afetam a expressão de outros transportadores ABC.
  - Ratos submetidos a dietas hipersódicas apresentam redução da expressão da P-gp no tecido renal (MORALES et al., 2000; KANG et al., 2008), ao mesmo tempo em que a mesma tem sua expressão aumentada no intestino (KANG et al., 2008).
  - Estudos também mostram a importância da vasopressina para a regulação da expressão do transportador CFTR, que fica reduzida em sua ausência no córtex e na medula renais, e tem sua expressão elevada na região medular quando a quantidade de

vasopressina circulante se apresenta elevada (MORALES et al., 2001).

- A determinação da região do néfron da qual as células Ma104 se derivam, iniciada neste trabalho, deverá ser completada através do uso de outros marcadores celulares, tais como a proteína de Tamms-Horsfall, definindo claramente sua origem.

## REFERÊNCIAS

*“He is wise who knows the  
sources of knowledge – who knows who  
has written and where is to be found.”*

A. A. Hodge

## 9. REFERÊNCIAS

ABE, M., et al. **Effect of sodium delivery on superoxide and nitric oxide in the medullary thick ascending limb**, American Journal of Physiology, Renal Physiology, 2006, v. 291, n. 2, p. F350-57.

ABRAHAM, E.H., et al. **Erythrocyte Membrane ATP Binding Cassette (ABC) Proteins: MRP1 and CFTR as Well as CD39 (Ecto- apyrase) Involved in RBC ATP Transport and Elevated Blood Plasma ATP of Cystic Fibrosis**, Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2001, v. 27, n. 1, p. 165-80.

AIRES, M.D.M. **Regulação da Tonicidade do Fluido Tubular Extracelular**, Fisiologia. AIRES, M.D.M., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, v. Único, Segunda edição, 1999

AKIZUKI, N., et al. **Impaired solute accumulation in inner medulla of Clcnk1<sup>-/-</sup> mice kidney**., American Journal of Physiology, Renal Physiology, 2000, v. 280, n. 1, p. F79-87.

ANDERSON, M.E. **Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation**, Chemico-biological Interactions, 1998, v. 111-112, n. p. 1-14.

BAKOS, É., et al. **Interactions of the Human Multidrug Resistance Proteins MRP1 and MRP2 with Organic Anions**, Molecular pharmacology, 2000, v. 57, n. 4, p. 760-68.

BERL, T.;VERBALIS, J. **Pathophysiology of Water Metabolism**, Brenner & Rector's The Kidney. BRENNER, B.M.;RECTOR, C.F., Philadelphia, Saunders Elsevier, v. 1, sétima edição, 2004

BUCK, T.M., et al. **A novel tripartite motif involved in aquaporin topogenesis, monomer folding and tetramerization**, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, v. 14, n. 8, p. 8.

CAI, Q.;FERRARIS, J.D.;BURG, M.B. **Greater tolerance of renal medullary cells for a slow increase in osmolality is associated with enhanced expression of HSP70 and other osmoprotective genes**, American Journal of Physiology, Renal Physiology, 2003, v. 286, n. 1, p. F58-F67.

CAI, Q., et al. **Rate of increase of osmolality determines osmotic tolerance of mouse inner medullary epithelial cells**, American Journal of Physiology, Renal Physiology, 2002, v. 283, n. 4, p. F792-98.

CAPELLA, L.S., et al. **Reduced glutathione protect cells from ouabain toxicity**, Biochimica et Biophysica Acta, 2001, v. 1526, n. 3, p. 293-300.

CAPELLA, M.A.M., et al. **Expression of functionally P-glycoprotein in MA104 kidney cells**, Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences, 1999, v. 54, n. 1-2, p. 119-27.



CHEMELLO, M.E., et al. **Requirement for vacuolar H<sup>+</sup> -ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> gradient during entry of rotavirus into MA104 cells**, Journal of Virology, 2002, v. 76, n. 24, p. 13083-87.

CHU, J.Y. et al. **Phenotypes developed in secretin receptor-null mice indicated a role for secretin in regulating renal water reabsorption**, Molecular and Cellular Biology, 2007, v. 27, n. 7, p. 2499-511.

CIACCIO, P.J., et al. **Effects of Chronic Ethacrynic Acid Exposure on Glutathione Conjugation and MRP Expression in Human Colon Tumor Cells**, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, v. 222, n. 1, p. 111-15.

CIARLET, M.;CRAWFORD, S.E.;ESTES, M.K. **Differential Infection of Polarized Epithelial Cell Lines by Sialic Acid-Dependent and Sialic Acid-Independent Rotavirus Strains**, Journal of Virology, 2001, v. 75, n. 23, p. 11834-50.

COLE, S.P.C., et al. **Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line**, Science, 1992, v. 258, n. 5088, p. 1650-4.

COLE, S.P.C.;DEELEY, R.G. **Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1**, TRENDS in Pharmacological Sciences, 2006, v. 27, n. 8, p. 438-46.

DAVIDSON, A.L.;MALONEY, P.C. **ABC transporters: how small machines do a big job**, Trends in Microbiology, 2007, v. 15, n. 10, p. 8.

DEAN, M. The Human ATP-Binding Cassete (ABC) Transporter Superfamily. Bethesda (MD): National Library of Medicine, v. Único, 2002. Acessado em julho de 2008 e disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

DEAN, M.;HAMON, Y.;CHIMINI, G. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily**, Journal of Lipid Research, 2001, v. 42, n. 7, p. 11.

DEELEY, R.G.;COLE, S.P.C. **Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1)**, Federation of European Biochemical Societies, 2006, v. 580, n. 4, p. 9.

DEELEY, R.G.;WESTLAKE, C.;COLE, S.P.C. **Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassete Multidrug Resistance Proteins**, Physiological Reviews, 2006, v. 86, n. 3, p. 849-99.

DENKER, B.M., et al. **Identification, Purification, and Partial Characterization of a Novel M<sub>r</sub> 28,000 Integral Membrane Protein from Erythrocytes and Renal Tubules**, The Journal of Biological Chemistry, 1988, v. 263, n. 30, p. 15634-42.

ECHEVARRIA-LIMA, J., et al. **Expression and activity of multidrug resistance protein 1 in a murine thymoma cell line**, Immunology, 2005, v. 114, n. 4, p. 468-75.

EVERS, R., et al. **Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1**, FEBS Letters, 1997, v. 419, n. 1, p. 112-16.

EVERS, R., et al. **Basolateral Localization and Export Activity of the Human Multidrug Resistance-associated Protein in Polarized Pig Kidney Cells**, Journal of Clinical Investigation, 1996, v. 97, n. 5, p. 8.

FENTON, R.A.;KNEPPER, M.A. **Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium.**, Physiological Reviews, 2007, v. 87, n. 4, p. 1083-112.

FERNANDEZ, R.;OLIVEIRA-SOUZA, M.;MALNIC, G. **Na<sup>+</sup>-independent proton secretion in MDCK-C11 cells**, Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 2000, v. 441, n. 2-3, p. 287-93.

FLENS, M.J., et al. **Tissue Distribution of the Multidrug Resistance Protein**, American Journal of Pathology, 1996, v. 148, n. 4, p. 1237-47.

FOJO, T.;BATES, S. **Strategies for reversing drug resistance**, Oncogene, 2003, v. 22, n. 47, p. 7512-23.

FRANCO, R.;CIDLOWSKI, J.A. **SLCO/OATP-like Transport of Glutathione in FasL-induced Apoptosis**, The Journal of Biological Chemistry, 2006, v. 281, n. 40, p. 16.

FU, D.;ROUFOGALIS, B.D. **Actin disruption inhibits endosomal traffic of P-glycoprotein-EGFP and resistance to daunorubicin accumulation**, American Journal of Physiology, Cell Physiology, 2007, v. 292, n. 4, p. C1543-C52.

GEKELER, V., et al. **The leukotriene LTD<sub>4</sub> receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance.**, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, v. 208, n. 1, p. 345-52.

GOTTESMAN, M.M.;FOJO, T.;BATES, S.E. **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters**, Nature Reviews in Cancer, 2002, v. 2, n. 1, p. 48-58.

GRIFFITH, O.W. **Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis**, Free Radical Biology and Medicine, 1999, v. 27, n. 9-10, p. 922-35.

GRUBMEYER, C.;PENFSKY, H.S. **The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase**, The Journal of Biological Chemistry, 1981, v. 256, n. 8, p. 3718-27.

HAMILTON, D.;WU, J.H.;BATIST, G. **Structure-based identification of novel human gamma-glutamylcysteine synthetase inhibitors**, Molecular pharmacology, 2007, v. 71, n. 4, p. 1140-47.

HARRIS, H.W.;STRANGE, K.;ZEIDEL, M.L. **Current Understanding of the Cellular Biology and Molecular Structure of the Antidiuretic Hormone-stimulated Water Transport Pathway**, The Journal of Clinical Investigation, 1991, v. 88, n. 1, p. 1-8.

HARRIS, R.R., et al. **Clinical activity of leukotriene inhibitors**, International Journal of Immunopharmacology, 1995, v. 17, n. 2, p. 147-56.

HASEGAWA, T., et al. **Differential localization of aquaporin-2 and glucose transporter 4 in polarized MDCK cells**, Histochemistry and Cell Biology, 2007, v. 127, n. 3, p. 233-41.

HE, R.-H., et al. **Aquaporin-2 expression in human endometrium correlates with serum ovarian steroid hormones**, Life Sciences, 2006, v. 79, n. 5, p. 423-9.

HIRRLINGER, J., et al. **The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress**, Journal of Neurochemistry, 2001, v. 76, n. 2, p. 627-36.

HOOIJBERG, J.H., et al. **Folate concentration dependent transport activity of the multidrug resistance protein 1 (ABCC1)**, Biochemical Pharmacology, 2004, v. 67, n. 7, p. 1541-8.

HOLMES, C.L.;LANDRY, D.W.;GRANTON, J.T. **Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1 – receptor physiology**, Critical Care, 2003, v. 7, n. 6, p. 427-34.

HUANG, D.Y.;OSSWALD, H.;VALLON, V. **Sodium reabsorption in thick ascending limb of Henle's loop:effect of potassium blockade *in vivo***, British Journal of Pharmacology, 2000, v. 130, n. 6, p. 8.

JACKSON, E. **Diuréticos**, Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. HARDMAN, J.G.;LIMBIRD, L.E.;GILMAN, A.G., Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, v. único, décima edição, 2003

JONES, T.R., et al. **Pharmacology of L-660,711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist**, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1989, v. 67, n. 1, p. 17-28.

KAMSTEEG, E.-J., et al. **An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus**, The EMBO Journal, 1999, v. 18, n. 9, p. 2394-400.

KAMSTEEG, E.J., et al. **The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers**, *The Journal of Cell Biology*, 2000, v. 151, n. 4, p. 919-30.

KANEKO, T., et al. **Osmolarity in renal medulla of transgenic mice regulates transcription via 5'-flanking region of canine BGT1 gene**, *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 1997, v. 272, n. 5, p. 610-16.

KANG, H.J., et al. **Effects of dietary salt on the expression of drug transporters, cytochrome P4503a, and nuclear receptors in rats**, *Xenobiotica*, 2008, v. 38, n. 2, p. 147-55.

KANNO, K., et al. **Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus**, *The New England Journal of Medicine*, 1995, v. 332, n. 23, p. 1540-45.

KARWATSKY, J., et al. **The Leucotriene C4 Binding Sites in Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1) Include the First Membrane Multiple Spanning Domain**, *Biochemistry*, 2005, v. 44, n. 1, p. 340-51.

KHADRE, M.A.;YOUSEF, A.E. **Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure, and pulsed electric field**, *Journal of Food Protection*, 2002, v. 65, n. 9, p. 1441-46.

KONDO, Y., et al. **Functions of ascending thin limb of Henle's loop with special emphasis on mechanism of NaCl transport.**, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1992, v. 166, n. 1, p. 75-84.

KRÄMER, B.K., et al. **Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels CICKA and CICKB, the Barttin subunit, and their clinical relevance.**, *Nature Clinical Practice, Nephrology*, 2008, v. 4, n. 1, p. 38-46.

LABERGE, R.-M., et al. **Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress**, *Biochemical Pharmacology*, 2007, v. 73, n. 11, p. 1727-37.

LACHHEB, S., et al. **Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K<sup>+</sup> channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells**, *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 2008, v. 294, n. 6, p. F1398-F407.

LASH, L.H. **Role of glutathione transport processes in kidney function**, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, v. 204, n. 1-2, p. 329-42.

LAUPÈZE, B., et al. **Differential expression of the efflux pumps P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in human monocyte-derived dendritic cells**, *Human Immunology*, 2001a, v. 62, n. 10, p. 1073-80.

LAUPÈZE, B., et al. **Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leukocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood**, *Life Sciences*, 2001b, v. 68, n. 11, p. 1323-31.

LAYTON, A.T., et al. **Two modes for concentrating urine in rat inner medulla**, *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 2004, v. 287, n. 4, p. F816-F39.

LEE, J.S; LEE, J.J, SEO, J.S. **HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis.**, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, v. 280, n. 8, p. 6634-41.

LEGRAND, O., et al. **Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) mRNA and protein in normal peripheral blood and bone marrow haemopoietic cells.**, *British journal of Haematology*, 1996, v. 94, n. 1, p. 23-33.

LEITE, D.F.P., et al. **Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitride production by the murine macrophage cell line RAW 264.7**, *Biochemical Pharmacology*, 2007, v. 73, n. 5, p. 665-74.

LEITE, D.F.P., et al. **In vivo and in vitro modulation of MDR molecules in murine thymocytes**, *International Immunopharmacology*, 2006, v. 6, n. 2, p. 204-15.

LI, C., et al. **Hyperosmolality in vivo upregulates aquaporin 2 water channel and Na-K-2Cl co-transporter in Brattleboro rats**, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006, v. 17, n. 6, p. 1657-64.

LI, C., et al. **Molecular mechanisms of antidiuretic effect of oxytocin**, *Jornal of the American Society of Nephrology*, 2008., v. 19, n. 2, p. 225-32.

LIU, W., et al. **Analysis of NaCl transport in thin ascending limb of Henle's loop in CLC-K1 null mice.**, *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 2001, v. 282, n. 3, p. F451-57.

LOHOFF, M., et al. **A Multidrug-resistance Protein (MRP)-like Transmembrane Pump Is Highly Expressed by Resting Murine T Helper (Th) 2, but Not Th1 Cells, and Is Induced to Equal Expression Levels in Th1 and Th2 Cells after Antigenic Stimulation In Vivo**, *The Journal of Clinical Investigation*, 1998, v. 101, n. 3, p. 703-10.

LOWRY, O.H., et al. **Protein Measurement with the Folin Reagent**, *Journal of Biological Chemistry*, 1951, v. 193, n. 1, p. 265-75.

LUCIANI, F., et al. **P-glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin**, *Blood*, 2002, v. 99, n. 2, p. 641-48.

LÚCIO, M., et al. **Binding of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs to DPPC: Structure and Thermodynamic Aspects**, Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids, 2008, v. 24, n. 8, p. 4132-39.

MADDOX, D.A.;BRENNER, B.M. **Glomerular Ultrafiltration**, Brenner and Rector's: The kidney. BRENNER, B.M.;RECTOR, C.F., Philadelphia, Saunders Elsevier, v. 1, sétima edição, 2004

MADSEN, K.M.;TISHER, C.C. **Anatomy of the Kidney**, Brenner & Rector's The Kidney. BRENNER, B.M.;RECTOR, C.F., Philadelphia, Saunders Elsevier, v. 1, sétima edição, 2004

MATSUMURA, Y., et al. **Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel**, Nature Genetics, 1999, v. 21, n. 1, p. 95-98.

MICHIMATA et al. **Vasopressin-independent renal urinary concentration: increased rBSC1 and enhanced countercurrent multiplication**, Kidney International, 2003, v.64, n. 3, p. 933-8.

MINICH, T., et al. **The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes**, Journal of Neurochemistry, 2006, v. 97, n. 2, p. 373-84.

MITCHELL, D.M.;BALL, J.M. **Characterization of a spontaneously polarizing HT-29 cell line, HT-29/cl.f8**, In vitro cellular & developmental biology - Animal, 2004, v. 40, n. 10, p. 297-302.

MOE, O.W., et al. **Renal Transport of Glucose, Amino Acids, Sodium, Chloride, and Water**, Brenner & Rector's The Kidney. BRENNER, B.M.;RECTOR, C.F., Philadelphia, Saunders Elsevier, v. 1, sétima edição, 2004

MONTROSE-RAFIDAZEH, C.;GUGGINO, W.B. **Cell Volume Regulation in the Nephron**, Annual Review of Physiology, 1990, v. 52, n. p. 761-72.

MORALES, M.M., et al. **Modulation of the mdr-1b gene in the kidney of rats subjected to dehydration or a high-salt diet**, Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 2000, v. 439, n. 3, p. 356-62.

MORALES, M.M., et al. **Arginine vasopressin regulates CFTR and CIC-2 mRNA expression in rat kidney cortex and medulla**, Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 2001, v. 443, n. 2, p. 202-11.

MORI, T.;COWLEY, A.W. **Renal oxidative stress in medullary thick ascending limbs produced by elevated NaCl and glucose**, Hypertension, 2004, v. 43, n. 2, p. 341-46.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** , Journal of Immunological Methods, 1983, v. 65, n. 12, p. 55-63.

MUELLER, C.F.H., et al. **Multidrug Resistance Protein-1 Affects Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherogenesis via Leukotriene C4 Export,** Circulation 2008, v. 117, n. 22, p. 2912-18.

MUELLER, C.F.H., et al. **The Role of the Multidrug Resistance Protein-1 in Modulation of Endothelial Cell Oxidative Stress,** Circulation Research, 2005, v. 97, n. 7, p. 637-44.

MÜLLER, M., et al. **Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport,** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, v. 91, n. 26, p. 13033-37.

MÜLLER, M., et al. **Evidence for the role of glycosylation in accessibility of the extracellular domains of human MRP1 (ABCC1),** Biochemistry, 2002, v. 41, n. 31, p. 10123-32.

NEUHOFER, W., et al. **Differential expression of heat shock protein 27 and 70 in renal papillary collecting duct and interstitial cells - implications for urea resistance.,** The Journal of Physiology, 2005, v. 564, n. 3, p. 715-22.

NEUHOFER, W., et al. **Pretreatment with hypertonic NaCl protects MDCK cells against high urea concentrations** Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 1998, v. 435, n. 3, p. 407-14.

NIELSEN, S., et al. **Aquaporins in the Kidney: From molecules to Medicine,** Physiological Reviews, 2002, v. 82, n. 1, p. 205-44.

NIELSEN, S., et al. **Physiology and Pathophysiology of Renal Aquaporins,** Journal of the American Society of Nephrology, 1999, v. 10, n. 3, p. 647-63.

OLDHAM, R.K.;REID, W.K.;BARNETT, D. **Phase I study of CBT-1 and Taxol in patients with Taxol resistant cancers,** Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 2000, v. 15, n. 2, p. 153-59.

PAJICA, M., et al. **The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome,** Cancer Letters, 2005, v. 228, n. 1-2, p. 241-46.

PAUMI, C.M., et al. **Multidrug Resistance Protein (MRP) 1 and MRP3 Attenuate Cytotoxic and Transactivating Effects of the Cyclopentenone Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14Prostaglandin J2 in MCF7 Breast Cancer Cells,** Biochemistry, 2003, v. 42, n. 18, p. 5429-37.

PENG, K.-C., et al. **Tissue and Cell Distribution of the Multidrug Resistance- Associated Protein (MRP) in Mouse Intestine and Kidney**, The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1999, v. 47, n. 6, p. 757-67.

RAHMAN, I. **Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases** Mutation Research, 2005, v. 579, n. 1-2, p. 58-80.

ROBERTS, L.J.;MORROW, J.D. **Analgésico-antipiréticos, agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da Gota**, Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. HARDMAN, J.G.;LIMBIRD, L.E.;GILMAN, A.G., Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, v. único, décima edição, 2003

ROBEY, R.W., et al. **Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1®**, Biochemical Pharmacology, 2008, v. 75, n. 6, p. 1302-12.

RODRIGUEZ, J.V.;TORRES, A.M.;ELIAS, M.M. **Effect of glutathione depletion on urinary acidification in the rat**, Biochemical Medicine and Metabolic Biology, 1991, v. 45, n. 3, p. 310-18.

ROVATI, G.E.;CAPRA, V. **Cysteinyl-Leukotriene Receptors and Cellular Signals**, The Scientific World Journal, 2007, v. 7, n. p. 1375-92.

SANTOS, B.C. et al. **Chronic hyperosmolarity mediates constitutive expression of molecular chaperones and resistance to injury.** , American Journal of Physiology, Renal Physiology, 2003, v. 284, n. 3, p. F564-74.

SCHÄFER, C., et al. **Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells**, American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology, 2007, v. 292, n. 4, p. G1089-G98.

SCHLIESS, F.; WIESE, S; HAUSSINGER, D. **Osmotic regulation of the heat shock response in H4IIE rat hepatoma cells.**, The FASB Journals, 1999, v. 13, n. 12, p. 1557-64.

SCHUMACHER, K.;STREHL, R.;MINUTH, W.W. **Urea restrains aldosterone-induced development of peanut agglutinin-binding on embryonic renal collecting duct epithelia**, Journal of the American Society of Nephrology, 2003, v. 14, n. 11, p. 2758-66.

SHINBO, I., et al. **Functional analysis of aquaporin-2 mutants associated with nephrogenic diabetes insipidus by yeast expression**, The American Journal of Physiology, 1999, v. 277, n. 5, p. F734-F41.

SILE, S.;VANOYE, C.G.;GEORGE, A.L. **Molecular physiology of renal Cl<sup>-</sup> chloride channels/transporters**, Current Opinon in Nephrology and Hypertension, 2006, v. 15, n. 5, p. 511-16.



SILVA, G.B.;GARVIN, J.L. **TRPV4 mediates hypotonicity-induced ATP release by the thick ascending limb**, American Journal of Physiology, Renal Physiology, 2008 Disponível em: <http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/abstract/90365.2008v1>. Acessado em: setembro de 2008

SIMS, A.C., et al. **SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium**, Virus Research, 2008, v. 133, n. 1, p. 33-44.

STEVENS, et al. Aquaporin 2 is a vasopressin-independent, constitutive apical membrane protein in rat vas deferens, American Journal of Cell Physiology, 2000, v. 278, n. 4, p. C791-802.

SUGIYAMA, M., et al. **Attachment and infection to MA104 cells of avian rotaviruses require the presence of sialic acid on the cell surface**, The Journal of Veterinary Medical Science, 2004, v. 66, n. 4, p. 461-63.

TAKATA, K., et al. **Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney**, Histochemistry and Cell Biology, 2008 Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/r68521661p6823w6/fulltext.pdf>. Acessado em: julho de 2008

TAKESHITA, H., et al. **Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance**, Cancer Letters, 1998, v. 126, n. 1, p. 75-81.

TARARTHUCH, A.L.;FERNANDEZ, R.;MALNIC, G. **Cl<sup>-</sup> and regulation of pH by MDCK-C11 cells**, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2007, v. 40, n. 5, p. 687-96.

TIAN, W., et al. **Urea and hypertonicity increase expression of heme oxygenase-1 in murine renal medullary cells**, American Journal of Physiology, Renal Physiology, 2001, v. 281, n. 5, p. F983–F91.

TORRES, A.M.;RODRIGUEZ, J.V.;ELIAS, M.M. **Vulnerability of the Thick Ascending Limb to Glutathione Depletion in Rat Kidney: Effects of Diuretics and Indomethacin**, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1987, v. 250, n. 1, p. 247-53.

TORRES, A.M.;RODRIGUEZ, J.V.;ELÍAS, M.M. **Urinary concentrating defect in glutathione-depleted rats**, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1987, v. 65, n. 7, p. 1461-66.

TRESCHAN, T.A.;PETERS, J. **The Vasopressin System: Physiology and Clinical Strategies**, Anesthesiology, 2006, v. 105, n. 3, p. 599-612.

TSALOUHIDOU, S., et al. **Mitochondrial phospholipids of rat skeletal muscle are less polyunsaturated than whole tissue phospholipids: implications for protection against oxidative stress**, *Journal of Animal Science*, 2006, v. 84, n. 10, p. 2818-25.

UCHIDA, S.;MARUMO, F. **Severely impaired urine-concentrating ability in mice lacking the CLC-K1 chloride channel.**, *Experimental Nephrology*, 2000, v. 8, n. 6, p. 361-5.

UCHIDA, S., et al. **Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla.**, *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, v. 268, n. 6, p. 3821-24.

VALENTE, R.C., et al. **Modulation of a multidrug resistance protein (MRP1/ABCC1) expression: a novel physiological role for ouabain**, *Cell Biology and Toxicology*, 2007, v. 23, n. 6, p. 421-27.

WHITAKER, A.M.;HAYWARD, C.J. **The characterization of three monkey kidney cell lines**, *Developments in biological standardization*, 1985, v. 60, n. 125-131, p.

WIDDER, J.D., et al. **Role of the Multidrug Resistance Protein-1 in Hypertension and Vascular Dysfunction Caused by Angiotensin II**, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007, v. 27, n. 4, p. 762-68.

WIJNHOLDS, J., et al. **Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage.**, *The Journal of Experimental Medicine*, 1998, v. 188, n. 5, p. 797-808.

YAMANE, Y., et al. **Expression of Multidrug Resistance Protein/GS-X Pump and  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase Genes Is Regulated by Oxidative Stress**, *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, v. 273, n. 47, p. 31075-85.

ZAMAN, G.J.R., et al. **Transport of the glutathione conjugate of ethacrynic acid by the human multidrug resistance protein MRP**, *FEBS Letters*, 1996, v. 391, n. 1, p. 126-30.

ZEISEL, S.H. **Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults**, *Annual Review of Nutrition*, 2006, v. 26, n. p. 229-50.

ZHANG, Z.;TIAN, W.;COHEN, D.M. **Urea protects from the proapoptotic effect of NaCl in renal medullary cells**, *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 2000, v. 279, n. 2, p. F345-F52.

# 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](#)