

JANAÍNA DÓRIA LÍBANO SOARES

PROSTAGLANDINA E₂ MEDEIA O EFEITO DE
BRADICININA SOBRE A ATIVIDADE
Na⁺-ATPásica DE TÚBULO PROXIMAL

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



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

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Janaína Dória Líbano Soares

PROSTAGLANDINA E₂ MEDEIA O EFEITO DE BRADICININA SOBRE A
ATIVIDADE Na⁺-ATPásica DE TÚBULO PROXIMAL.

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

Orientador: Prof. Dr. Celso Caruso Neves

Rio de Janeiro

jun/2008

Líbano-Soares, Janaína Dória

Prostaglandina E₂ medeia o efeito de bradicinina sobre a atividade Na⁺ - ATPásica de túbulo proximal./ Janaína Dória Líbano Soares. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.

xiii, 134 f. : il. ; 29,7 cm.

Orientador: Prof. Dr. Celso Caruso Neves

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

Referências bibliográficas: f. 96-125

1. Na⁺-ATPase. 2. Receptor B₂ de bradicinina. 3. Túbulos renais proximais. 4. Fosfolipases A₂. 5. Sistema caliceína-cinina. 6. Transdução de sinal. 7. Animal. 8. Fisiologia – Tese. I. Caruso-Neves, Celso. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia. III. Título.

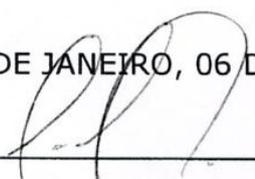
"PGE2 MEDEIA O EFEITO DE BRADICININA SOBRE A ATIVIDADE
NA⁺-ATPÁSICA DE TÚBULO PROXIMAL"

JANAÍNA DÓRIA LÍBANO SOARES

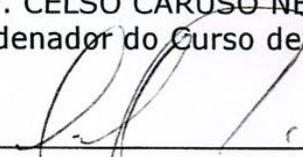
TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

APROVADA POR:

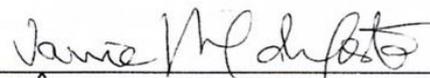
RIO DE JANEIRO, 06 DE JUNHO DE 2008.



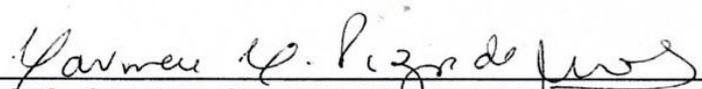
PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR - UFRJ)
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia)



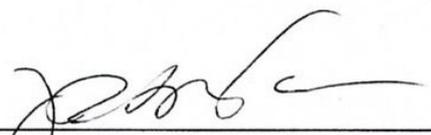
PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR



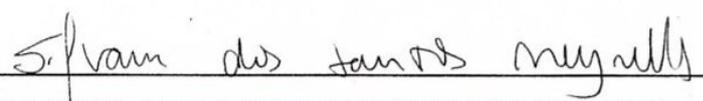
PROFª. VÂNIA MARIA CORRÊA DA COSTA (DOUTOR - UFRJ) - REVISORA



PROFª. CARMEN CABANELAS PAZOS DE MOURA (DOUTOR - UFRJ)



PROF. JOSÉ ROBERTO MEYER FERNANDES (DOUTOR - UFRJ)



PROFª. SILVANA DOS SANTOS MEYRELLES (DOUTOR - UFES)

Ao meu orientador, Celso,
ao meu tio Jackson (*in memoriam*),
à minha mãe Ivany, à minha irmã Luanda
e ao meu amor Daniel.

Pela importância que cada um de vocês têm na minha vida.
Com todo carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai de infinito amor e sabedoria, e aos queridos amigos protetores espirituais. Agradeço sinceramente pela vida, pela proteção diária e pela oportunidade de concluir mais uma etapa.

Ao meu tio Jackson (*in memoriam*). Neste momento você não está presente, fisicamente, para que eu possa lhe dizer o quanto você é importante na minha vida. Mas quero lhe agradecer mais uma vez por todo o apoio na época do meu nascimento, pelo carinho ao me fazer dormir, por vibrar a cada novidade com seu olhar confiante que sempre representava a certeza que tudo daria certo. Você vive nas lembranças que ficam dos bons momentos, na saudade também do que não vivemos juntos e na esperança do reencontro algum dia. Que continue acesa a chama de suas esperanças e objetivos! Que brilhe a sua luz! Saudades, muitas!

À minha mãe, pessoa mais importante na minha vida! É só olhar nos seus olhos para perceber a luz que emana do seu ser. Querida, guerreira, companheira, dedicada, protetora, meu pai, minha MÃE. Impossível te definir com palavras. Agradeço pela oportunidade de ser sua filha, pelo carinho, pelo amor e pelo incentivo sempre. Desde o primeiro instante você acreditou que nenhuma dificuldade seria empecilho para as nossas vidas e nunca se desanimou. Esta conquista também é sua! Te amo!

À minha irmã Luanda. Amiga que se preocupa comigo e torce pelas minhas conquistas. Mesmo com o seu jeito calado consegue demonstrar todo o carinho e amor. Obrigada pela preocupação comigo. Te amo, Lu! Confie sempre em você e não desista de seus ideais! O nosso sucesso depende muito de nós mesmos!

Ao meu amigo, companheiro e querido marido Daniel. Muito obrigada por estar comigo nesta etapa da minha vida. Nossa união é fundamental, meu amor! Que bom que reencontrei você, uma pessoa especial, que está ao meu lado quando estou triste e me alegra mais ainda quando estou feliz. Que tenta me entender até quando estou insuportável. Obrigada por fazer meus dias mais alegres, por cuidar de mim com amor, carinho e respeito. “Depois de você os outros são os outros e só”! Qui, te amo!

Ao meu amigo e orientador, Celso. Grande idealizador deste projeto e de todos os outros muitos! Muito mais que competente orientador, um exemplo. Mas não um simples exemplo, um verdadeiro exemplo de dignidade, caráter, humildade e determinação. Todos precisam conhecer o ser humano fantástico que você é! Sempre pronto a ajudar em todas as questões, com um coração enorme, e sempre preocupado com a minha formação. Mesmo quando a distância era grande você estava sempre presente. Obrigada pela dedicação! Obrigada por ser meu amigo, incentivador, por indicar o caminho e a direção certa, para que possamos crescer. Por acreditar, muitas vezes mais que eu, em mim e no meu potencial. É um orgulho ter você como amigo e orientador! É um desafio conseguir retribuir TUDO o que você fez por mim. Você me ensinou muito além da Ciência, mas lições de vida. Obrigada sinceramente por tudo mesmo!

À professora Vânia pela revisão dedicada e atenciosa desta tese. Muito obrigada pelo carinho!

À minha madrinha e tia Yvone, meu padrinho e tio Jefferson, tia Nilda, Priscila, tia Lúcia e minha nova vó Maria, muchinho. Vocês são uma verdadeira família. Obrigada por vibrarem pelas minhas conquistas e pelas preces. Querer é poder! Amo muito todos vocês!

À Aloa, baixinha inteligente e divertida! Que me ajudou desde quando eu entrei no lab, desde o início nos primeiros seminários, quando eu tinha dúvidas sobre os artigos. Obrigada por tudo que você me ensinou, pelo incentivo, pela ajuda e amizade. Aloinha, amiga, valeu mesmo!

À Mira, minha amiga! Muito obrigada pela força, pelo carinho e pela ajuda! Valeu pelo companheirismo, amizade e apoio. E também pelos momentos de descontração, fabricar, rs!

Aos meus amigos, Léa, Marcelo, Luiza, Simone, Zé, Betinha, Ana Paula e Giany, que sempre estão presentes nas minhas conquistas. Obrigada pelos momentos de descontração, pelo carinho e apoio sempre!

À Ana Acácia, companheira de salinha sempre alegre e tranqüila. Você é muito competente e merece mesmo tudo de melhor !!

À Sharon, pela amizade recente e pelo apoio, sempre dedicada e pronta pra ajudar. Obrigada Sharon!

À professora Elaine, ao Helder e ao Eugênio, com quem eu participei na fase inicial deste projeto, obrigada!

Ao Victor pela dica importante, rs e pelas brincadeiras. Fala pelos cotovelos! Valeu Vitinho!

Ao Shan pela ajuda, pela alegria e pelos momentos de descontração.

À Sandrinha pela ajuda, principalmente nos detalhes de última hora.

A todos os amigos do laboratório de Bioquímica Renal, que eu não mencionei, mas nem por isso são menos importantes. Muito obrigada!

RESUMO

PROSTAGLANDINA E₂ MEDEIA O EFEITO DE BRADICININA SOBRE A ATIVIDADE Na⁺-ATPásica DE TÚBULO PROXIMAL

Janaína Dória Líbano Soares

Orientador: Celso Caruso Neves

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

Bradicinina, o principal peptídeo do sistema caliceína-cinina, desempenha um papel importante no balanço eletrolítico, assim como na regulação da pressão arterial. Já foi descrito que este peptídeo modula a atividade da Na⁺-ATPase presente em membrana basolateral de túbulo proximal renal de maneira bifásica. O efeito estimulatório é mediado pelo receptor B₁. O efeito inibitório é mediado pelo receptor B₂ e apresenta duas fases: em tempos curtos ocorre estímulo da atividade enzimática e em tempos longos ocorre a inibição. Neste trabalho foram estudados os mecanismos moleculares envolvidos na ação de BK, via receptor B₂, sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica de túbulo proximal. Foi observado que: 1) a ativação da via PI-PLCβ/PKC está envolvida na fase estimulatória do efeito de BK, via B₂, sobre a atividade Na⁺-ATPásica; 2) a ativação prévia da via PI-PLCβ/PKC é necessária para que ocorra a ativação da PLA₂; 3) a PLA₂ envolvida pertence a família iPLA₂ e está associada a membrana basolateral; 4) o efeito inibitório de BK depende de AA e COX; 5) a inibição da Na⁺-ATPase por BK é modulada por PGE₂, via AMPc/PKA; 6) PGE₂ é capaz de modular a iPLA₂, indicando um processo de retroalimentação positiva, também mediado pela via AMPc/PKA, sustentando o efeito final de inibição da reabsorção de sódio no túbulo proximal por BK. Esses resultados demonstram que BK, através do mesmo receptor, é capaz de ativar vias de sinalização interdependentes, com efeitos opostos e a integração destes sinais converge em um evento final: a regulação da reabsorção de sódio.

Palavras-chave: bradicinina, transporte de sódio, sinalização celular, receptores, túbulo proximal

Rio de Janeiro

Jun/2008

ABSTRACT

PROSTAGLANDIN E₂-MEDIATED BRADYKININ EFFECT ON THE PROXIMAL TUBULE Na⁺-ATPase ACTIVITY

Janaína Dória Líbano Soares

Orientador: Celso Caruso Neves

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

Bradykinin, the principal peptide of the kallikrein-kinin system, plays an important role in electrolyte balance as well as blood pressure regulation. It has been already described that BK modulates the Na⁺-ATPase from basolateral membrane of kidney proximal tubule cells, in a biphasic manner. A stimulatory effect is mediated by B₁ receptor. An inhibitory effect, mediated by B₂ receptor, has two phases: short incubation times stimulate the enzyme activity and long incubation times inhibit it. In this work was evaluated the molecular mechanisms involved in B₂-mediated modulation of proximal tubule Na⁺-ATPase by BK. It was observed that: 1) the stimulatory effect of BK, via B₂ receptor, is mediated by activation of PI-PLCβ/PKC; 2) prior activation of the PI-PLCβ/PKC pathway is required to activate the PLA₂; 3) a membrane-associated, Ca²⁺-independent PLA₂ isoform is involved in the effect of BK; 4) the inhibitory effect of BK depends on the metabolism of AA by COX; 5) PGE₂ mediates the inhibitory effect of BK on Na⁺-ATPase activity through cAMP/PKA pathway; 6) PGE₂ enhances iPLA₂ activity, an important positive feedback, also mediated by cAMP/PKA pathway, that could be responsible to sustain the final inhibitory effect of BK on sodium reabsorption proximal tubule. These results reveal that BK, through the same receptor, is able to start an interdependent signaling pathway, with opposite effects and the different pathways activated in this process converge to a final common event: sodium reabsorption regulation.

Key-words: bradykinin, sodium transport, cellular signaling, receptors, proximal tubule.

Rio de Janeiro

Jun/2008

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Função renal	2
1.2 (Na ⁺ +K ⁺)ATPase	5
1.3 Na ⁺ -ATPase	8
1.4 Mecanismos de regulação do volume extracelular	12
1.5 Sistema Caliceína-Cinina	17
1.5.1 Receptores e vias de sinalização de cininas	25
1.5.1.1 Fosfolipase C/Proteína cinase C (PLC/PKC)	31
1.5.1.2 Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	35
1.5.1.3 Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	37
1.6 Resultados anteriores	43
2 OBJETIVOS	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 Materiais	48
3.2 Preparação de membrana basolateral	49
3.3 Medida da atividade ATPásica	51
3.4 Medida da atividade de PLC	51
3.5 Medida da atividade de PLA ₂	52
3.6 Análise eletroforética e Western Blotting	52
3.7 Ensaio de ligação de [³⁵ S]GTP _γ S	53
3.8 Medida da atividade de proteína cinase A	54
3.9 Análise estatística	54
4 RESULTADOS	55
4.1 Efeito estimulatório de BK sobre a atividade Na ⁺ -ATPásica	55
4.2 Caracterização do tipo de PLA ₂ envolvida no efeito de BK	59
4.3 Interdependência entre as fases estimulatória e inibitória, moduladas por BK via receptor B ₂	64
4.4 Papel dos produtos de PLA ₂ no efeito inibitório de BK	64
4.5 Via de sinalização envolvida no efeito de PGE ₂	68
4.6 Modulação de PLA ₂ por PGE ₂	72
5 DISCUSSÃO	81
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE - ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO	126

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismos de transporte através das células epiteliais de túbulos proximais de mamíferos	4
FIGURA 2. (Na ⁺ +K ⁺)ATPase	6
FIGURA 3. Interação entre o sistema calicreína-cinina plasmático e sistema renina-angiotensina.	16
FIGURA 4. Representação esquemática do sistema calicreína-cinina	18
FIGURA 5. Receptores de bradicinina	27
FIGURA 6. Isoformas de PLC e PKC	33
FIGURA 7. Metabolismo do AA via COX	39
FIGURA 8. Expressão da ciclooxigenase, prostanóide sintase e receptores prostanóides no rim	40
FIGURA 9. Curso temporal do efeito de BK, via B ₂ , sobre a atividade Na ⁺ -ATPásica	45
FIGURA 10. Mecanismo de ação de BK sobre a Na ⁺ -ATPase, via receptores B ₁ e B ₂	46
FIGURA 11. Efeito de HOE140 (antagonista de receptor B ₂) sobre a atividade Na ⁺ -ATPásica modulada por BK.	56
FIGURA 12. Efeito de U73122 (inibidor de PI-PLCβ) sobre a modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por BK.	57
FIGURA 13. Curso temporal do efeito de BK sobre a atividade de PLC.	58
FIGURA 14. Efeito de PACOCF ₃ e BEL (inibidores de iPLA ₂) sobre a modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por BK.	60
FIGURA 15. Detecção de iPLA ₂ em MBL de túbulo proximal	61
FIGURA 16. Efeito de PACOCF ₃ e BEL (inibidores de iPLA ₂) sobre a modulação da atividade da PLA ₂ por BK.	62
FIGURA 17. Efeito de HOE 140 (antagonista de receptor B ₂) e GDPβS (inibidor de proteína G) sobre a modulação da atividade da PLA ₂ por BK.	63
FIGURA 18. Modulação do efeito de BK sobre atividade de PLA ₂ por U73122 (inibidor de PI-PLCβ).	65
FIGURA 19. Modulação do efeito de BK sobre atividade de PLA ₂ por calfofostina C e PMA (inibidor e ativador de PKC, respectivamente).	66
FIGURA 20. Efeito de AA sobre a modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por BK.	67
FIGURA 21. Efeito de AA e BK sobre a atividade Na ⁺ -ATPásica na presença de inibidores de COX	69
FIGURA 22. Efeito de GDPβs sobre a modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por PGE ₂ .	70
FIGURA 23. Efeito de PGE ₂ na ligação de [³⁵ S]GTPγS à MBL.	71
FIGURA 24. Efeito de CTX sobre a modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por BK ou PGE ₂ .	73
FIGURA 25: Efeito de FSK sobre a modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por BK.	74
FIGURA 26: Efeito do inibidor de PKA sobre a modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por BK ou PGE ₂ .	75
FIGURA 27: Curso temporal do efeito de BK sobre a atividade de PKA.	76
FIGURA 28: Curso temporal do efeito de PGE ₂ sobre a atividade de PLA ₂ .	77
FIGURA 29: Efeito dos inibidores de iPLA ₂ (PACOCF ₃ 10 ⁻⁶ M e BEL 10 ⁻⁶ M) na modulação da atividade de PLA ₂ por PGE ₂ .	79
FIGURA 30: Efeito de PGE ₂ , CTX, AMPc e FSK na modulação da atividade de PLA ₂ .	80
FIGURA 31. Modelo proposto para o mecanismo molecular envolvido na modulação da atividade Na ⁺ -ATPásica por bradicinina	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentrações normais dos principais constituintes dos espaços extra e intracelular. _____	1
TABELA 2. Diferenças entre a Na ⁺ -ATPase e a (Na ⁺ +K ⁺)ATPase _____	9

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA= ácido araquidônico
AC = adenilato ciclase
APP = aminopeptidase P
APM = aminopeptidase M
ATP = adenosina trifosfato
BEL = bromoenol lactona
BK= bradicinina
COX = ciclooxigenase
CPN = carboxipeptidase N
CPM = carboxipeptidase M
CTX = toxina da cólera
DABK = des-Arg⁹-BK
DAG = diacilglicerol
DALBK = des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK
ECA = enzima conversora de angiotensinas
EP = receptor prostanóide E
FSK = forskolina
HMWK = cininogênio de alto peso molecular
IP₃ = inositol trifosfato
iPKA = peptídio inibidor de PKA (Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Trh-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp)
LMWK = cininogênio de baixo peso molecular
MBL = membrana basolateral
NEP = endopeptidase neutra
PACOCF₃ = palmitoil trifluorometil cetona
PC = fosfatidilcolina
PKC = proteína cinase C
PKA = proteína cinase A
PGD₂ = prostaglandina D₂
PGDS = prostaglandina D sintase
PGE₂ = prostaglandina E₂
PGES = prostaglandina E sintase

PGF_{2α} = prostaglandina F_{2α}
PGFS = prostaglandina F sintase
PGI₂ = prostaciclina
PGIS = prostaciclina sintase
PLA₂ = fosfolipase A₂
PLC = fosfolipase C
SDS = dodecil sulfato de sódio
SKK = sistema caliceína cinina
TXA₂ = tromboxano A₂
TXS = tromboxano sintase
VEC = volume extracelular

1 INTRODUÇÃO

O rim é um dos principais órgãos envolvidos na manutenção da homeostase do organismo. Uma de suas principais funções é regular o volume do fluido extracelular, mantendo-o dentro dos limites fisiológicos, apesar das variações diárias da ingestão de sal e água que ocorrem em um indivíduo normal (MELLO-AIRES, 2008).

Os meios intra e extracelulares possuem composições diferentes. Em relação à distribuição de sódio e potássio nos compartimentos intra e extracelulares, nota-se que o fluido extracelular é rico em sódio e o intracelular em potássio (TABELA 1). Isto se deve, principalmente, à baixa permeabilidade das membranas celulares ao íon sódio e à atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, que mantém alta a concentração extracelular de sódio (FÉRAILLE & DOUCET, 2001)

TABELA 1. Concentrações normais dos principais constituintes dos espaços extra e intracelular (retirado de SELDIN & GIEBISCH, 1992).

Constituintes		Plasma		Água (plasma)		Espaço intracelular
		mmol/L	mEq/L	mmol/L	mEq/L	
Cátions	Na^+	142	142	151	151	10
	K^+	4	4	4,3	4,3	160
	Ca^{+2}	1,2	2,5	1,3	2,4	0,0001
	Mg^{+2}	0,5	1	0,5	1,1	18,5
	Outros	1,8	3,5	1,9	3,7	
Total cátions		149,5	153	159	162,7	188,5
Ânions	Cl^-	103,5	103,5	110	110	2
	HCO_3^-	24	24	25,6	25,6	8
	PO_4^{-3}	1	2	1,1	2,1	37,5
	Proteína	1	16	1,1	17	55
	Outros	6	7,5		8	86
Total ânions		135,5	153		162,7	188,5

Por ser o cátion mais abundante no meio extracelular, o sódio é de grande importância na determinação do volume desse compartimento. A regulação do

volume é relacionada primariamente com a modificação no balanço de sódio, isto é, a relação entre sua ingestão e excreção. Assim, uma dieta rica em sódio promove aumento do volume do fluido extracelular e, conseqüentemente maior excreção de sódio. Ao contrário, uma dieta com baixo teor de sódio acarreta queda de volume e da excreção de sódio (BIE *et al.*, 2004). Diferentes sistemas hormonais são acionados em resposta às variações de volume e deflagram vias de sinalização que culminam na modulação da excreção renal de sódio e água (ABASSI *et al.*, 2004).

1.1 Função renal

O rim humano contém em torno de um milhão de pequenas unidades funcionais denominadas néfrons. Os principais constituintes do néfron são: o glomérulo, onde ocorrem os processos de ultrafiltração de aproximadamente 180L de plasma por dia, e os túbulos renais, onde ocorrem os processos de reabsorção e/ou secreção de solutos e água. O plasma que chega ao rim através da artéria renal é filtrado pelos capilares glomerulares. A composição do fluido filtrado é semelhante à do plasma, porém com poucas proteínas e macromoléculas, já que a barreira de filtração glomerular restringe a filtração de moléculas com base no tamanho e na carga elétrica (CAMICI, 2005). Após o processo de filtração, o filtrado glomerular sofre alterações na sua composição e volume, através dos processos de reabsorção e secreção ao longo dos túbulos renais. No néfron, uma substância pode ser reabsorvida ou secretada pelas vias transcelular ou paracelular. Em estados euvolêmicos cerca de 70% do fluido filtrado são reabsorvidos no túbulo proximal, aproximadamente 25% na alça de Henle, 4% no túbulo distal e 2-3% no ducto coletor (MELLO-AIRES, 2008).

No túbulo proximal ocorre a reabsorção de água e quase todos os diversos solutos, como bicarbonato, fosfato, glicose e aminoácidos. E neste segmento

acontece a secreção de hidrogênio e íons orgânicos, além de NH_3 e creatinina. A reabsorção de sódio pelo túbulo proximal ocorre, em sua maior parte, pela via transcelular e depende do gradiente eletroquímico gerado pela $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, localizada na membrana basolateral (FIGURA 1). Esta enzima hidrolisa uma molécula de ATP para promover a extrusão de três íons sódio e entrada de dois íons potássio na célula. Além da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, uma segunda bomba de sódio, a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, foi descrita na membrana basolateral (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970). O gradiente gerado por estes transportadores ativos primários é usado por co-transportadores localizados na membrana luminal responsáveis pela entrada de sódio. Estes transportadores acoplam à reabsorção luminal de Na^+ a reabsorção de glicose, aminoácidos, fosfato e ânions orgânicos (simporte) ou secreção de próton (antiporte) (HEDIGER *et al.*, 2004). Desta forma, o funcionamento acoplado dos transportadores luminiais e basolaterais determinam a reabsorção transcelular de sódio.

As membranas luminiais e basolaterais das células do túbulo proximal contém proteínas importantes para o transporte de fluido via transcelular, são canais de água denominados aquaporinas (AQP). Estudos realizados com ratos knock-out para AQP1 demonstraram a importância desta proteína na reabsorção de fluido no túbulo proximal (SCHNERMANN *et al.*, 1998). A deleção de AQP1 resultou numa redução em mais de 50% na permeabilidade a água e na reabsorção de fluido neste segmento. Este fato é uma grande evidência que o transporte transcelular é o principal nas células do túbulo proximal.

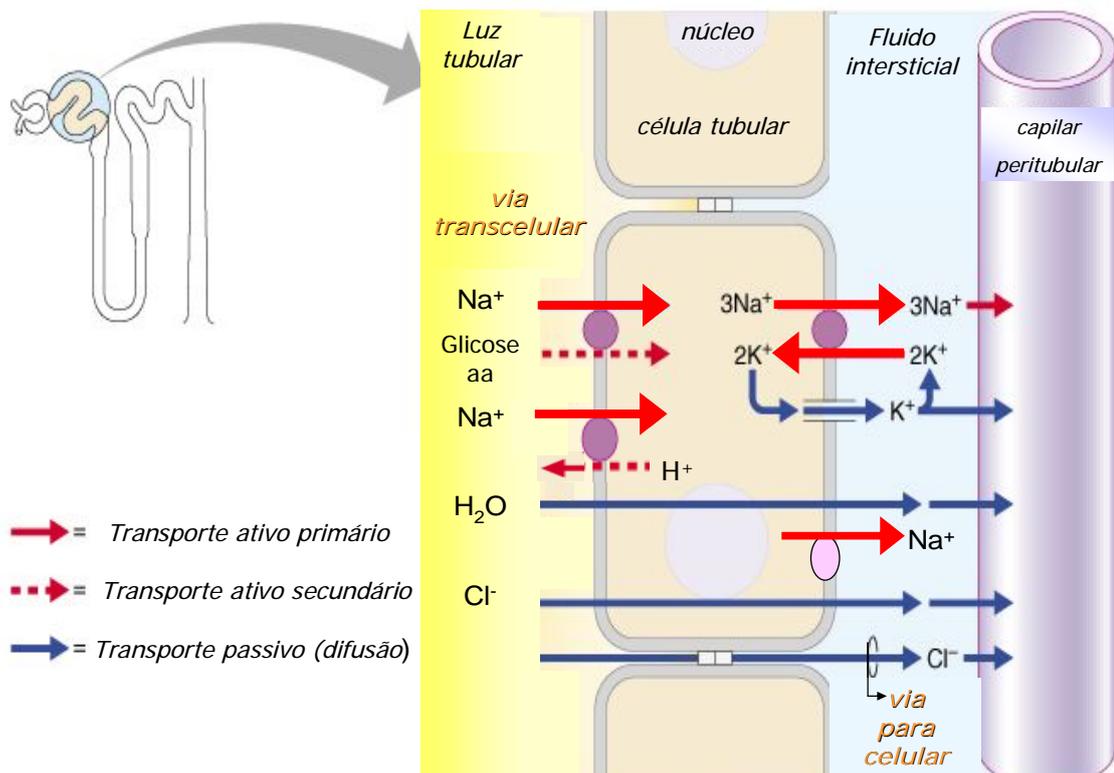


FIGURA 1. Mecanismos de transporte através das células epiteliais de túbulos proximais de mamíferos (adaptado de MARIEB, 2001).

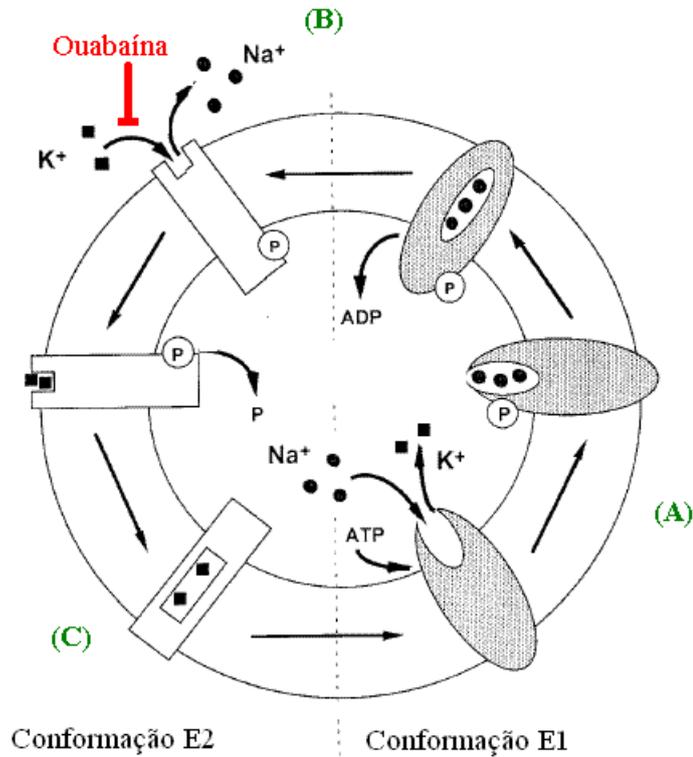
1.2 (Na⁺+K⁺)ATPase

Em 1957, a (Na⁺+K⁺)ATPase foi identificada por SKOU, que observou em fração microsomal de nervos de pata de caranguejo a presença de uma atividade hidrolítica de ATP estimulada por concentrações de sódio e potássio encontradas normalmente nos fluidos intra e extracelulares, respectivamente. A (Na⁺+K⁺)ATPase é responsável pela reabsorção de grande massa de sódio e considerada um potente transdutor energético que aproveita a energia metabólica para gerar gradiente eletroquímico e permitir transporte de solutos transcelular (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

A (Na⁺+K⁺)ATPase é composta de duas cadeias polipeptídicas principais, as subunidades α e β (BLANCO & MERCER, 1998). Além dessas subunidades foi identificada uma terceira subunidade denominada γ , expressa no rim, que não é fundamental para a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase (FÉRAILLE & DOUCET, 2001). No rim, a isoforma $\alpha 1\beta 1$ corresponde a 90% do total da enzima expressa nesse tecido (JORGENSEN & PEDERSEN, 2001).

A (Na⁺+K⁺)ATPase pertence à classe das P-ATPases, as quais formam um intermediário fosforilado do tipo acil-fosfato durante seu ciclo catalítico. Os dois estados conformacionais (E₁ e E₂) são caracterizados pelas diferentes afinidades por sódio, potássio, ATP e pela acessibilidade aos sítios catiônicos nos lados intra e extracelulares da membrana. E₁ apresenta alta afinidade para o sódio e ATP, e baixa para o potássio. Ambos os sítios de ligação de cátions estão acessíveis pelo lado intracelular. Em E₂ ocorre o inverso, os sítios de ligação de cátions estão acessíveis pelo lado extracelular e apresenta baixa afinidade para sódio e alta para potássio. Durante o seu ciclo catalítico, a (Na⁺+K⁺)ATPase passa por diferentes conformações: E₁, E₁-P, E₂-P e E₂ (FIGURA 2A). Em E₁, ATP, Mg²⁺ e Na⁺ se ligam

A



B

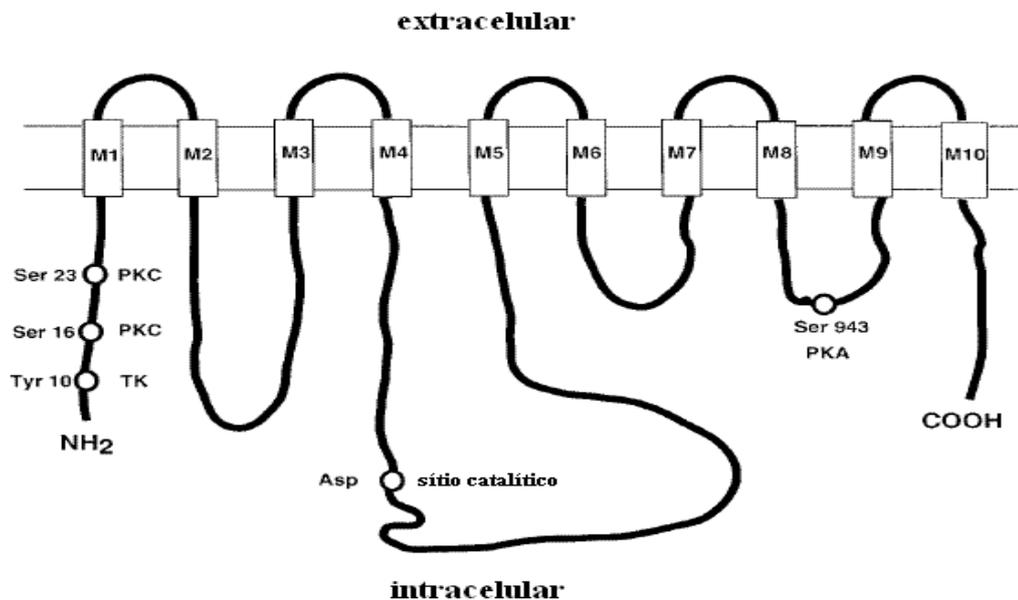


FIGURA 2. (Na⁺+K⁺)ATPase

(A) Ciclo catalítico da (Na⁺+K⁺)ATPase. Este modelo mostra a transição entre os estados conformacionais principais da (Na⁺+K⁺)ATPase (E1, E1-P, E2-P e E2), os sítios de ligação aos cátions e o sítio de ação do inibidor ouabaina. (A, B e C: vide texto). (B) Estrutura da subunidade alfa da (Na⁺+K⁺)ATPase e localização dos aminoácidos fosforilados por diferentes cinases (adaptado de FÉRAILLE & DOUCET, 2001)

pelo lado intracelular, permitindo a fosforilação de E₁ (E₁-P) e a oclusão do Na⁺ (A). Após a liberação de ADP, ocorre a transição de E₁-P a E₂-P, promovendo a liberação do Na⁺ no meio extracelular e a ligação do K⁺ pelo lado extracelular (B). Em seguida ocorre a defosforilação de E₂-P e a oclusão de K⁺ (C). A reversão espontânea em E₁ libera K⁺ no meio intracelular, completando o ciclo catalítico. Esta enzima é conhecidamente inibida por glicosídeos digitálicos, como a ouabaína, que em E₂ se liga ao domínio extracelular, diminuindo sua afinidade pelo K⁺. Assim, a ouabaína impede a defosforilação da enzima, bem como a mudança conformacional para E₁ (FÉRAILLE & DOUCET, 2001) (FIGURA 2A)

A sinalização hormonal da (Na⁺+K⁺)ATPase ao longo do néfron ocorre por diversos mecanismos. A subunidade catalítica α apresenta sítios de fosforilação para os diferentes tipos de proteínas cinases, sendo alvo para a modulação de hormônios envolvidos na regulação do volume extracelular (FIGURA 2B). A fosforilação por proteína cinase A (PKA) pode estar associada com o estímulo da atividade enzimática, como demonstrado em células epiteliais renais (MORDASINI *et al.*, 2005; KIROYTCHEVA *et al.*, 1999). Enquanto que a fosforilação por proteína cinase C (PKC) pode levar tanto ao estímulo quanto à inibição da atividade enzimática, desencadeando diferentes efeitos fisiológicos dependendo da isoforma da cinase envolvida e do sítio de fosforilação (BERTUCCIO *et al.*, 2007; KHUNDIMIRI *et al.*, 2005; DURAN *et al.*, 2004). Além disso, algumas respostas como internalização da enzima ou aumento da afinidade aparente por Na⁺ podem ser observadas quando ocorre fosforilação por PKC (CHIBALIN *et al.*, 1999; FÉRAILLE *et al.*, 2000). A ativação enzimática pode depender também da fosforilação por tirosina cinases (TK), como observado em células epiteliais de túbulo proximal (NARKAR *et al.*, 2002; FÉRAILLE *et al.*, 1999).

1.3 Na⁺-ATPase

Esta enzima foi inicialmente mostrada em fatias de córtex de rim de rato onde, mesmo na presença de ouabaína foi observado o transporte de Na⁺ acompanhado por Cl⁻ e água. Além disso, foi mostrado que este transporte alternativo era inibido por ácido etacrínico e furosemida, sugerindo a presença de uma segunda bomba de sódio (WHITTEMBURY & PROVERBIO, 1970). Posteriormente, em fração microssomal de córtex de rim de rato, foi determinada uma atividade ATPásica insensível à ouabaína 10 mM e estimulada por Na⁺, sendo denominada Na⁺-ATPase (PROVERBIO *et al.*, 1975).

Vários dados sustentam a existência de duas ATPases estimuladas por Na⁺: a insensibilidade da Na⁺-ATPase a ouabaína e a sua independência de K⁺ (PROVERBIO *et al.*, 1991, MARÍN *et al.*, 1985); a sensibilidade da Na⁺-ATPase a furosemida e ao ácido etacrínico (PROVERBIO *et al.*, 1991; 1986); a diferença na razão SDS/proteína para a atividade ótima da Na⁺-ATPase, bem como a insensibilidade ao tratamento com tripsina (PROVERBIO *et al.*, 1986) e a modulação da sua atividade por variações no volume (PROVERBIO *et al.*, 1991; DI CAMPO *et al.*, 1991; ARENSTEIN, *et al.*, 1995). A TABELA 2 resume as principais diferenças entre a Na⁺-ATPase e (Na⁺+K⁺)ATPase.

Em 1985, MARÍN e colaboradores mostraram que a Na⁺-ATPase está localizada na membrana basolateral do túbulo proximal. Essa localização é semelhante em diferentes espécies animais (CARUSO-NEVES *et al.*, 1998a, 1998b, 1999b, 2004; MORETTI *et al.*, 1991; PROVERBIO *et al.*, 1991). Como a (Na⁺+K⁺)ATPase e a Na⁺-ATPase têm distribuição paralela e a atividade da Na⁺-ATPase é cerca de 10 vezes menor que a da (Na⁺+K⁺)ATPase, o isolamento da Na⁺-ATPase se torna difícil. Em nosso laboratório observou-se através de

imunoprecipitação da (Na⁺+K⁺)ATPase com anticorpo contra a subunidade α_1 , que a atividade desta enzima medida no sobrenadante é praticamente abolida, embora aproximadamente 90% da atividade Na⁺-ATPásica seja mantida (DE SOUZA *et al.*, 2007).

TABELA 2. Diferenças entre a Na⁺-ATPase e a (Na⁺+K⁺)ATPase (*adaptado de DEL CASTILLO et al., 1982*).

ATIVIDADE Na⁺-ATPase	ATIVIDADE (Na⁺+K⁺)ATPase
Requer Mg ⁺²	Requer Mg ⁺²
Não requer K ⁺	Requer K ⁺
Estimulada por Na ⁺	Estimulada por Na ⁺
Hidrolisa somente ATP	Hidrolisa preferencialmente ATP
Insensível a ouabaína	100% inibida por 1mM ouabaína
K _m ^{Na} (mM) 8,0	K _m ^{Na} (mM) 14,0
Totalmente inibida por 1,5 mM ácido etacrínico, 2 mM furosemida e 0,75mM triflocin	Inibida 63% por 1,5 mM ácido etacrínico, 10% por 2 mM furosemida e insensível ao triflocin

Também foi demonstrado que a Na⁺-ATPase forma intermediário fosforilado (E-P) sensível a hidroxilamina durante seu ciclo catalítico, assim como a (Na⁺+K⁺)ATPase. Entretanto, a formação deste intermediário é insensível ao K⁺ e inibida pela furosemida. O peso molecular do E-P formado (estimulado por Na⁺ e insensível ao K⁺) determinado por eletroforese em gel ácido foi 100 kDa (DE SOUZA *et al.*, 2007) O mesmo peso molecular foi observado para Na⁺-ATPases já clonadas em organismos inferiores, como *Tetraselmis viridis*, *Exiguobacterium aurantiacum* e *Trypanosoma cruzi* (POPOVA *et al.*, 1998; SUZUKI, *et al.*, 2005; IIZUMI *et al.*, 2006). Além disso, a concentração de Na⁺ que promove metade do estímulo máximo (K_{0.5})

da Na⁺-ATPase é diferente da observada para a (Na⁺+K⁺)ATPase (DE SOUZA *et al.*, 2007).

Estas observações indicam que as duas enzimas são entidades protéicas distintas e nos leva a propor que esta segunda bomba de sódio seja responsável pela regulação fina da reabsorção renal de sódio.

Além das diferenças cinéticas foi observado que a Na⁺-ATPase apresenta um padrão de modulação diferente da (Na⁺+K⁺)ATPase. Observou-se que compostos que modulam a excreção renal de Na⁺, como adenosina (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997), angiotensina II (AngII) (RANGEL *et al.*, 1999), Ang(1-7) (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000a), urodilatina (CARUSO-NEVES *et al.*, 2004) e bradicinina (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999a), também modulam a atividade Na⁺-ATPásica sem modificarem a atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica em túbulo proximal de rim de porco. Esses dados foram obtidos utilizando como modelo experimental membranas basolaterais isoladas, o que nos leva a propor que a modulação da (Na⁺+K⁺)ATPase seja dependente da integridade celular, sendo mediada por componentes do citoesqueleto e não somente por elementos constitutivos de membrana. Por outro lado, é possível propor que a regulação da Na⁺-ATPase possa envolver microdomínios de membrana como os “rafts” e cavéolas, como tem sido proposto para outras enzimas e em outros modelos (TORTELOTE *et al.*, 2004; ALONSO & MILLÁN, 2001)

Os microdomínios especializados da membrana plasmática possuem grande importância na fisiologia e fisiopatologia renal. Já foi observado que uma disfunção em microdomínios ricos em caveolina e colesterol está diretamente relacionada com a indução e manutenção de fases isquêmicas na falência renal aguda experimental (ZAGER *et al.*, 2002). Além disso, existem evidências que os “rafts” lipídicos, bem

como as cavéolas, participam ativamente na regulação da sinalização e tráfego de receptores metabotrópicos (CHINI & PARENTI, 2004). Dados revelam a co-localização destes receptores e de moduladores da sinalização, como adenilato ciclase e óxido nítrico sintase endotelial, em microdomínios de membrana (INSEL *et al.*, 2005) Assim, seria possível supor que a presença destes microdomínios em membrana basolateral das células de túbulo proximal permitiria o desencadeamento de vias de sinalização responsáveis pelo controle fino da reabsorção de sódio.

A atividade Na^+ -ATPásica é modulada por diferentes proteínas cinases, como PKC, PKA e PKG. Apesar de ainda não serem conhecidos seus possíveis sítios de fosforilação, já foi demonstrado que ocorre a fosforilação de uma proteína presente em membrana basolateral isolada de túbulo proximal por PKC. Esta proteína apresenta aproximadamente 100kDa (massa molecular sugerida para a Na^+ -ATPase) (RANGEL *et al.*, 2001). Através da ativação de PKC ocorre o aumento da atividade enzimática estimulada por Ang-II e Ang(1-7), ambos efeitos mediados via receptor AT_1 . (LARA *et al.*, 2008; RANGEL *et al.*, 2002, 2005). Também foi demonstrado que a ativação da via AMPc/PKA modula a atividade enzimática independente e também na presença de agonistas como Ang-II e Ang(1-7) (DE SOUZA, *et al.*, 2004; CARUSO-NEVES *et al.*, 2000b). Por outro lado, a atividade enzimática é inibida na presença de urodilatina e peptídio atrial natriurético, bem como por Ang(1-7) via AT_2 , através de uma via dependente de ativação de PKG (CARUSO-NEVES *et al.*, 2004, LARA *et al.*, 2006). Desta forma, observa-se que compostos natriuréticos inibem a atividade Na^+ -ATPásica de túbulo proximal e compostos antinatriuréticos a estimulam.

1.4 Mecanismos de regulação do volume extracelular

A regulação de volume do fluido extracelular (VEC) está relacionada primariamente com modificações na relação entre a ingestão e a excreção renal de sódio (balanço de sódio). Alterações no ritmo de filtração glomerular (RFG) e/ou na reabsorção de Na⁺ ao longo dos diferentes segmentos do néfron podem modificar a excreção renal de Na⁺ (ABASSI *et al.*, 2004; EVANS *et al.*, 2005; BIE *et al.*, 2004). Assim, um aumento da excreção de Na⁺ pode ser consequência da diminuição da reabsorção de Na⁺ e/ou da diminuição do RFG.

As modificações do VEC levam a variações na excreção renal de sódio através de mecanismos aferentes que detectam o VEC e mecanismos eferentes que efetuam as modificações na reabsorção renal de sódio.

Os diversos sensores de volume envolvidos na regulação do VEC estão localizados nas grandes veias e átrios, na aorta, seio carotídeo e aparelho justaglomerular (MELLO-AIRES, 2008). São chamados de barorreceptores os sensores que respondem ao estiramento induzido por pressão nas paredes dos vasos nos quais estão localizados.

Como as veias são vasos de alta distensibilidade e capacitância, pequenas variações na pressão venosa são detectadas por receptores nervosos localizados em suas paredes, levando a grandes modificações no seu diâmetro (THRASHER, 2005). Os barorreceptores enviam sinal para o tronco cerebral via fibras aferentes do nervo vago e a atividade desses sensores modula a atividade simpática e a secreção de hormônio antidiurético (MELLO-AIRES, 2008).

Os barorreceptores localizados no seio carotídeo e na aorta detectam modificações na pressão arterial e enviam informações ao sistema nervoso central, resultando em uma alteração do controle da inervação simpática sobre a resistência vascular periférica e renal (THRASHER, 2006; JULIEN *et al.*, 2003) Os

barorreceptores presentes no aparelho justaglomerular, especificamente na arteríola aferente renal igualmente respondem às mudanças de pressão (ABASSI *et al.*, 2004).

As alterações no VEC são detectadas por esses sensores descritos que, uma vez ativados, deflagram uma série de respostas que modulam a reabsorção renal de Na^+ , ao longo do néfron.

Por exemplo, quando ocorre um aumento no volume de sangue circulante, os sensores vasculares respondem enviando sinal ao tronco cerebral, diminuindo tanto a produção de hormônio antidiurético pelo hipotálamo como a atividade simpática. Assim, esses dois efeitos diminuem a reabsorção renal de água e Na^+ , respectivamente. Além disso, quando os átrios são distendidos ocorre a liberação do peptídeo atrial natriurético, que provoca vasodilatação, natriurese e diurese. Nos rins ocorre a liberação de outro peptídeo natriurético (urodilatina). Além disso, ocorre diminuição da secreção de renina, diminuindo a produção de AngII e conseqüentemente reduzindo os níveis de aldosterona. Devido a diminuição da atividade simpática ocorre dilatação das arteríolas, principalmente da aferente, então o RFG aumenta, com elevação da carga filtrada de Na^+ . Como AngII estimula a reabsorção de Na^+ e os níveis deste peptídeos estão reduzidos, bem como os níveis de aldosterona, a reabsorção de Na^+ pelo túbulo proximal e ducto coletor diminui, aumentando a excreção renal de Na^+ e água para que ocorra a restauração da euvolemia (ABASSI *et al.*, 2004; MELLO-AIRES, 2008).

Na contração de volume ocorre aumento da atividade dos nervos simpáticos, estímulo da secreção de hormônio antidiurético pela hipófise posterior e inibição da secreção de peptídeo atrial natriurético, bem como de urodilatina. Em resposta a uma diminuição da pressão de perfusão renal ocorre aumento na liberação de renina

pelos rins. O aumento de renina leva ao aumento de AngII, bem como de aldosterona pelo córtex adrenal. AngII possui um papel importante na regulação do VEC através de seus efeitos: vasoconstrição renal e periférica e estímulo da reabsorção tubular renal de sódio. Então, a seqüência de eventos é oposta: o RFG diminui, diminuindo assim a carga filtrada de sódio e a reabsorção de sódio pelo túbulo proximal e ducto coletor aumenta. Como os níveis de ADH estão elevados, a reabsorção de água é aumentada no ducto coletor. Assim, ocorre redução da excreção de água e sódio, restaurando a euvolemia (ABASSI *et al.*, 2004, MELLO-AIRES, 2008).

De maneira geral, se há um aumento do volume, ocorre aumento na síntese de substâncias natriuréticas e diuréticas, tais como bradicinina, adrenomedulina, peptídeo atrial natriurético (ANP), peptídeo natriurético do tipo C (CNP), peptídeo natriurético do tipo B (BNP) e urodilatina, que atuam diminuindo a reabsorção renal de sódio e conseqüentemente diminuindo o VEC. Quando ocorre uma redução no fluido, observa-se a produção de substâncias antidiuréticas e antinatriuréticas (como por exemplo, Ang II e endotelina) que atuam de forma contrária.

Entre os sistemas peptídicos envolvidos na modulação da excreção renal de Na⁺ pode-se destacar o sistema calicreína-cinina (SKK). Tem sido observado que o SKK é capaz de modular diversas funções renais: fluxo plasmático renal, ritmo de filtração glomerular, natriurese e diurese (KATORI & MAJIMA, 2006; CHAO & CHAO, 2005; LORTIE *et al.*, 1992; PLANTE *et al.*, 1992; COYNE & MORRISON, 1991). Parte do efeito do SKK na excreção renal de Na⁺ é mediado por ação direta de cininas no transporte tubular de Na⁺ (KATORI & MAJIMA, 2006; MARGOLIUS, 1995). O SKK está diretamente relacionado com o sistema renina angiotensina (SRA) (SOUZA DOS SANTOS *et al.*, 2001) através da enzima conversora de

angiotensina (ECA), também conhecida como cininase II. Esta enzima converte Ang I em Ang II e promove a degradação de cininas (SCHMAIER, 2002) (FIGURA 3).

A modulação dos mecanismos de transporte de sódio é fundamental para a manutenção do volume extracelular, assim os transportadores ativos primários apresentam grande importância como possíveis alvos regulatórios, uma vez que criam gradientes eletroquímicos utilizados pelos transportadores secundários. Desse modo, nosso grupo tem sugerido que a Na^+ -ATPase seja o alvo para ação de substâncias capazes de modular a excreção renal de Na^+ , tendo uma participação direta e fundamental na regulação do volume extracelular através do ajuste fino da excreção renal deste íon.

Sistema caliceína-cinina

Sistema renina-angiotensina

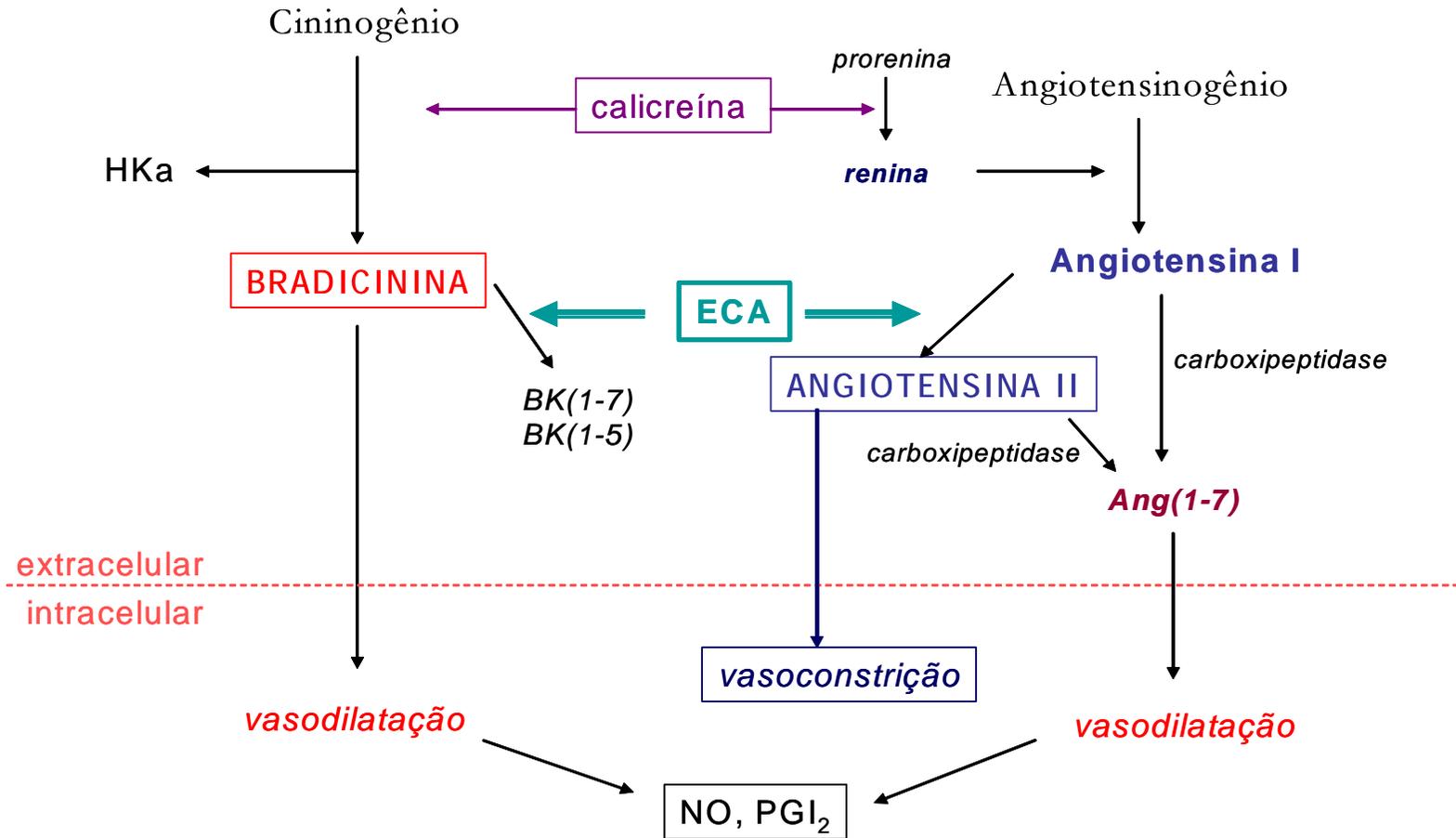


FIGURA 3. Interação entre o sistema caliceína-cinina plasmático e sistema renina-angiotensina.

A caliceína plasmática converte pro-renina em renina, que converte angiotensinogênio em angiotensina I. ECA (enzima conversora de angiotensina) converte o peptídeo inativo angiotensina I em angiotensina II, peptídeo com ação vasoconstritora. Ao mesmo tempo ECA degrada BK em BK(1-7) ou BK(1-5). Carboxipeptidase converte AngI ou AngII em Ang(1-7), um peptídeo com ação vasodilatadora. Ang(1-7) estimula a formação de NO e PGI₂, que potencializam o efeito de BK. A caliceína gera BK a partir do cininogênio e libera HKa (cininogênio livre de cinina), que apresenta propriedades anti-proliferativas e anti-angiogênicas. BK estimula formação de NO e PGI₂, contrabalançando os efeitos de AngII (adaptado de SCHMAIER, 2002)

1.5 Sistema Calicreína-Cinina

O SKK compreende uma complexa rede de enzimas e peptídios bioativos que atuam de maneira parácrina e autócrina. Este sistema é composto por enzimas de síntese, serina proteases, denominadas calicreínas plasmática e tecidual; que liberam cininas a partir de seus substratos (cininogênios de alto e baixo peso molecular, HMWK e LMWK) (FIGURA 4). As cininas exercem suas ações através da ligação a receptores específicos, sendo mediadores importantes em diversos efeitos biológicos, incluindo homeostase cardiovascular, inflamação e dor (COSTA-NETO *et al.*, 2008; MOREAU *et al.*, 2005; CHAO & CHAO, 2005; MARCEAU & REGOLI, 2004; KATORI & MAJIMA, 2003; COUTURE *et al.*, 2001).

O HMWK, uma α -globulina, circula no plasma como uma glicoproteína de 88 a 120kDa, composta de seis domínios. Este cininogênio é o substrato da calicreína plasmática enquanto o LMWK é o principal substrato da calicreína tecidual. O LMWK, uma β -globulina, apresenta massa molecular entre 50 e 68kDa (MOREAU *et al.*, 2005).

Os cininogênios podem ser hidroxilados na terceira prolina da seqüência de BK, levando a formação de cininas hidroxiladas (CAMPBELL, 2001). As cininas hidroxiladas apresentam atividade biológica similar à das cininas não hidroxiladas e ambas já foram identificadas tanto no plasma quanto na urina de humanos (DUNCAN *et al.*, 2000).

Já foi demonstrada, em ratos, a existência de dois tipos de cininogênios de baixo peso molecular: T-I e T-II cininogênio, que podem ser formados pela ação de excesso de tripsina (ENJYOJI *et al.*, 1988).

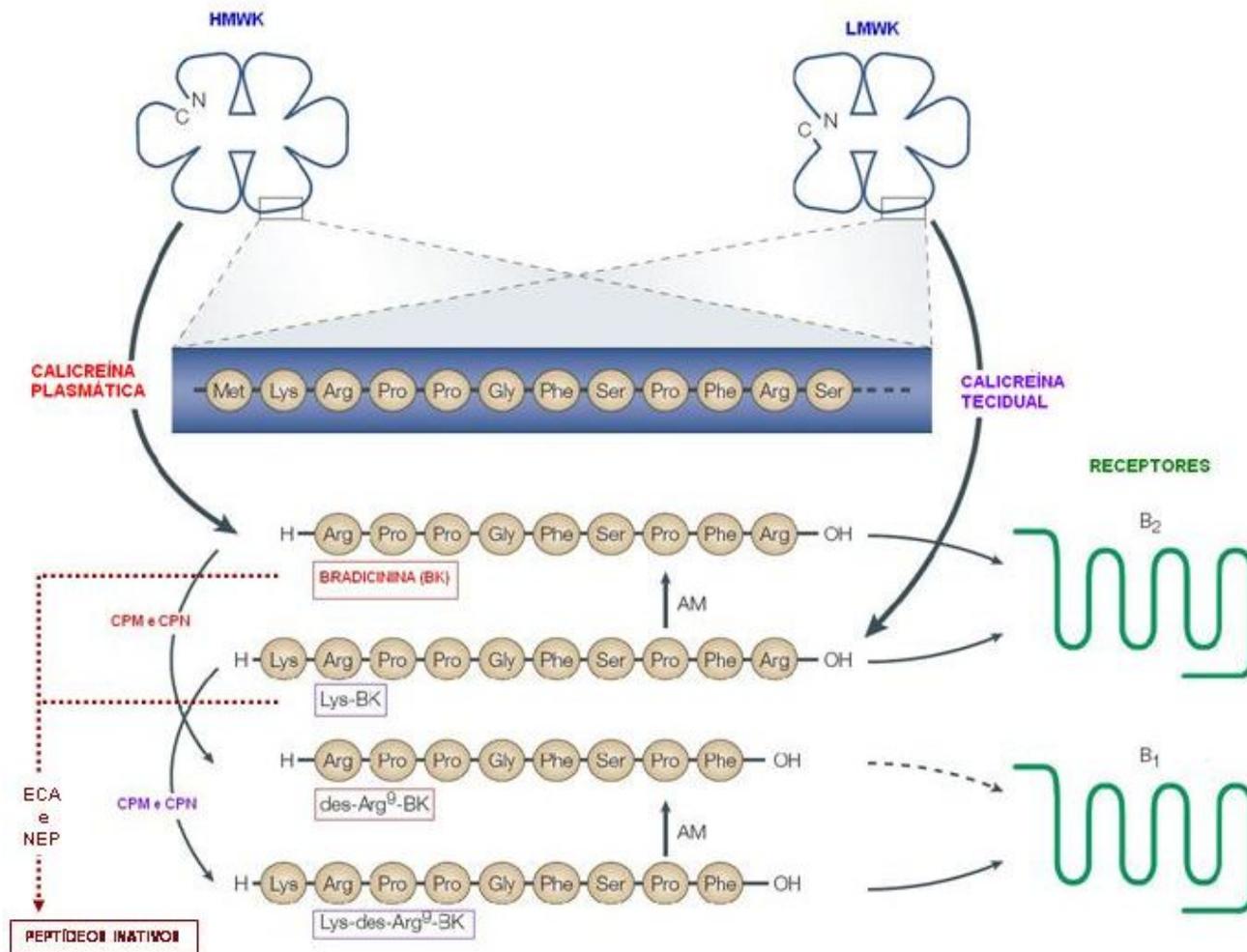


FIGURA 4. Representação esquemática do sistema calicreína-quinina.

CPM (carboxipeptidase M), CPN (carboxipeptidase N), AM (aminopeptidase), HMWK (cininogênio de alto peso molecular), LMWK (cininogênio de baixo peso molecular), ECA (enzima conversora de angiotensina), NEP (endopeptidase neutra) (adaptado de MARCEAU & REGOLI, 2004).

Além disso, foi isolada uma cinina: T-cinina (Ile-Ser-BK) após o tratamento de plasma de ratos com tripsina (FURUTO-KATO *et al.*, 1985). Em 1987, SAKAMOTO *et al.* observaram que T-cinina e Met-T-cinina são liberadas a partir de T-cininogênio por uma proteinase ácida em tecido granulomatoso de ratos sob inflamação induzida. Entretanto, ainda são necessários maiores estudos para verificar a funcionalidade e a existência desta cinina em humanos.

O primeiro trabalho que evidenciou a existência das caliceínas foi publicado em 1909 por ABELOUS & BARDIER. Utilizando cachorros anestesiados como modelo, foi observada hipotensão após a injeção intravenosa de uma fração de urina humana insolúvel em álcool. As substâncias hipotensoras foram isoladas e denominadas urohipotensinas. Inicialmente acreditava-se que essas substâncias eram originadas no pâncreas, por isso o termo caliceína (do grego *kallikreas*). Atualmente sabe-se que as caliceínas plasmática e tecidual são as duas mais potentes cininogenases conhecidas e possuem características bioquímicas, imunológicas e funcionais diferentes (LUNDWALL & BRATTSAND, 2008; SCHMAIER, 2008; PAMPALAKIS & SOTIROPOULOU, 2007; MOREAU *et al.*, 2005).

A caliceína plasmática, uma serina protease, é ativada por um sistema em cascata (cascata proteolítica) (PAMPALAKIS & SOTIROPOULOU, 2007). Esta enzima está presente no plasma na sua forma inativa, pré-caliceína (uma α -globulina), e isto permite que bradicinina (BK) não seja constantemente liberada. A pré-caliceína plasmática circula no plasma como um complexo, heterodímero, ligada ao HMWK no domínio 6, numa estequiometria 1:1. Entre 80 e 90% da pré-caliceína está normalmente complexada ao HMWK (SCHMAIER, 2008; MOREAU *et al.*, 2005).

A cascata de formação de cininas está em equilíbrio no plasma mesmo na ausência de fatores exógenos. Porém, o contato do plasma com uma superfície carregada negativamente, como as endotoxinas (lipossacarídeos), leva a ativação do fator de coagulação sanguínea XII a XIIa. Então a pré-caliceína é diretamente ativada a caliceína pelo fator XIIa e a caliceína resultante gera BK a partir do HMWK (FIGURA 4) (SCHMAIER, 2008; MOREAU *et al.*, 2005; ROJKJAER & SCHAIMER, 1999) A caliceína plasmática cliva o HMWK primeiramente na ligação Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ e em seguida na ligação Lys³⁸⁰-Arg³⁸¹, liberando o nonapeptídeo BK (MOREAU *et al.*, 2005)

A caliceína tecidual é sintetizada como uma proenzima (procaliceína), sendo posteriormente hidrolisada gerando a forma ativa. Esta serina protease é uma glicoproteína amplamente distribuída (células do pâncreas, glândulas salivar, sudorípara e lacrimal, no sistema nervoso central, no rim, dentre outros locais) (KATORI & MAJIMA, 2006; MAHABEER & BHOOLA, 2000), que converte calidina (Lys-BK) a partir do LMWK, clivando as ligações Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰ e Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ (FOGAÇA *et al.*, 2004, MAHABEER & BHOOLA, 2000)

As cininas compõem um grupo de peptídios de 9 a 11 aminoácidos, as principais são: bradicinina (BK), (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹), calidina (Lys-bradicinina) e seus metabólitos ativos, des-Arg⁹-cininas.

A bradicinina foi isolada em 1949 por ROCHA-E-SILVA *et al.* Foram investigados os efeitos farmacológicos do veneno de *Bothrops jararaca* em íleo de porco-da-índia e observaram que a incubação do veneno com uma fração de plasma resultou na liberação de uma substância com ação vasodilatadora potente, a qual apresentava atividade contrátil em músculo liso. Devido ao movimento contrátil lento a substância foi chamada de bradicinina (do grego, *brady*-lento, *kinin*-movimento).

Uma vez liberada, BK é rapidamente inativada por cininases encontradas nos tecidos e fluidos biológicos. Quando BK é infundida pela artéria renal não é possível detectá-la na urina, devido à presença de cininases ao longo do néfron, principalmente no túbulo proximal e ducto coletor medular (KATORI & MAJIMA, 2006).

Quatro metalopeptidases são responsáveis pelo metabolismo de BK. São elas: enzima conversora de angiotensina (ECA), aminopeptidase P (APP), endopeptidase neutra 24.11 (NEP) e carboxipeptidases M e N (CPM e CPN). Essas peptidases são zinco metalopeptidases, ou seja, todas requerem zinco em seus sítios catalíticos para hidrolisar seus substratos. São glicoproteínas, tetrâmeros, e exceto a CPN, estão associadas à membrana (MOREAU *et al.*, 2005). Os produtos de clivagem das cininas são biologicamente inativos, com exceção dos metabólitos des-Arg⁹-BK (DABK) e des-Arg¹⁰-Lys-BK (CAMPBELL, 2000)

Há duas classes principais de cininases descritas: cininases I e II (KATORI & MAJIMA, 2003) As cininases I são divididas em CPN e CPM. As CPN são sintetizadas no fígado e é a mais importante enzima metabolizadora de cininas no plasma humano (SKIDGEL & ERDÖS, 2007; MOREAU *et al.*, 2005). As CPM estão presentes em diversos tecidos, incluindo o rim, pulmão, placenta, além do endotélio vascular e já foi observado seu ancoramento à membrana celular de células epiteliais renais e pulmonares (MOREAU *et al.*, 2005; SKIDGEL & TAN, 1992; PALMIERI *et al.*, 1986). Estas enzimas clivam BK e Lys-BK na porção carboxi-terminal, especificamente na ligação Phe⁸-Arg⁹. Estas metalopeptidases transformam agonistas de B₂ em seus des-Arg-metabólitos, que são ativos e estimulam receptores B₁ (MOREAU *et al.*, 2005; GABRA *et al.*, 2003; SANGSREE *et al.*, 2003; BLAIS *et al.*, 2000).

A ECA e a NEP compõem o grupo das cininases II. A ECA é a principal cininase no rim podendo ser encontrada no glomérulo e ao longo do túbulo proximal (KATORI & MAJIMA, 2006; IKEMOTO *et al*, 1990; MARCHETTI *et al.*, 1987). A NEP já foi demonstrada nos túbulos renais, no epitélio intestinal, no sistema nervoso central, além de diversos outros tecidos (KATORI & MAJIMA, 2006; ROQUES *et al.*, 1993; DENDORFER *et al.*, 1997). No plasma, diferente da ECA, a NEP não tem um papel significativo no metabolismo das cininas (DÉCARIE *et al.*, 1996).

A ECA é uma dipeptidil carboxipeptidase dependente de Zn^{2+} , que regula a atividade dos peptídios vasoativos: AngI e BK (TURNER & HOOPER, 2002) Esta enzima catalisa a conversão do peptídio inativo AngI a AngII, um potente vasopressor. Como cininase, ECA inativa BK removendo o dipeptídio Phe⁸-Arg⁹ da porção carboxi-terminal e em seguida Phe⁵-Ser⁶, transformando BK em BK(1-7) e em seguida a BK(1-5) (MOREAU *et al*, 2005; GABRA *et al.*, 2003). ECA também metaboliza DABK a BK(1-5). Os efeitos antihipertensivos dos inibidores da ECA podem ser atribuídos (além da inibição da conversão de AngI a AngII) a inibição da degradação de BK, portanto ao aumento nos níveis de BK.

A NEP inativa BK por remover seqüencialmente o dipeptídio Phe⁸-Arg⁹ e o tripeptídio Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷, gerando o metabólito inativo BK(1-4). Esta enzima também cliva DABK na ligação Gly⁴-Phe⁵, igualmente gerando BK(1-4).

A exopeptidase, prolina específica, conhecida como aminopeptidase P, está presente em membrana celular de células epiteliais de túbulo proximal, bem como em células epiteliais intestinais e células endoteliais, além disso sua atividade já foi mensurada em alguns tecidos como o rim e coração (ERSAHIN & SIMMONS, 1997; DÉCARIE *et al.*, 1996; VANHOOF *et al.*, 1992) Esta enzima cliva BK e DABK na porção amino-terminal, gerando peptídios inativos: BK-(2-9) e BK-(2-8),

respectivamente. Esta é a principal via de degradação de DABK no plasma (BLAIS *et al.*, 1999; DÉCARIE *et al.*, 1996)

Outras enzimas são capazes de clivar cininas, dentre elas a aminopeptidase M (presente no plasma), que cliva a lisina da porção amino-terminal, convertendo (Lys-BK) à BK. Esta enzima também converte des-Arg¹⁰-Lys-BK a DABK, agonista de receptores B1

Portanto, a atividade das cininases pode influenciar de forma significativa no efeito das cininas, que apesar de desempenharem suas funções por breves períodos, apresentam efeitos extremamente potentes.

O rim expressa os componentes do SKK, que trabalha independentemente do SKK plasmático. O SKK renal pode produzir concentrações locais de BK muito maiores que aquelas presentes no plasma. (SOUZA DOS SANTOS *et al.*, 2001; CAMPBELL, 2000). Grandes quantidades de cininogênio e calicreína são sintetizados pelo epitélio tubular e secretados na urina. Já foi demonstrada a presença de RNA mensageiro de LMWK, o substrato preferencial da calicreína tecidual, em córtex e medula de rim humano (IWAI *et al.*, 1988). A expressão gênica da calicreína renal é modulada por alguns fatores, como por exemplo, a ingestão de sal. Uma dieta com alto sal regula a expressão de calicreína renal, assim como sua atividade enzimática, em ratos neonatos e adultos (el-DAHR *et al.*, 1996). A calicreína, localizada nas membranas luminiais ou basolaterais, atua sobre o cininogênio no fluido tubular ou no espaço peritubular gerando as cininas, que são capazes de influenciar na função renal. Mesmo que a meia-vida das cininas, tanto sistêmicas como locais, sejam consideradas muito curtas (10 a 30 segundos), considera-se que o SKK contribua em processos regulatórios fisiológicos em rim de mamíferos. As cininas são produzidas continuamente e exercem efeitos na

resistência da vasculatura, na excreção de água e eletrólitos e sobre moduladores da função renal (como o sistema renina angiotensina, eicosanóides, NO, vasopressina e endotelina) (CHAO & CHAO, 2005; BAE *et al.*, 2003; KATORI & MAJIMA, 2003; SCHMAIER, 2002; TORNEL *et al.*, 2000; HIGAKI *et al.*, 1999).

No rim existem diversas vias de degradação de cininas limitando suas ações localmente. Desta forma, as cininas atuam de maneira autócrina ou parácrina no parênquima renal (KATORI & MAJIMA, 2003).

Os principais efeitos renais das cininas, natriurese e diurese, estão relacionados com aumento do fluxo sanguíneo renal e inibição da reabsorção de Na⁺ e água (HÉBERT *et al.*, 2005). Observou-se em músculo liso de vias aéreas que BK é capaz de modular a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPásica, promovendo estímulo via receptor B₂ (DODSON & RHODEN, 2001).

Através da ativação de seus receptores, as cininas desempenham um papel importante nos processos hemodinâmicos e excretórios. Em 2003, foi proposto por KATORI & MAJIMA que este sistema trabalharia como uma válvula de segurança para o acúmulo excessivo de sódio no organismo. Assim, em indivíduos normais, o SKK funcionaria como uma válvula de segurança aberta, promovendo diurese e natriurese quando o sódio se acumulasse no organismo. Este acúmulo pode ser proveniente do resultado do aumento da ingestão de sódio ou da liberação de aldosterona, provavelmente pela ação de angiotensina II. No caso de indivíduos hipertensos (tanto pacientes hipertensos sensíveis ao sal como ratos espontaneamente hipertensos, SHR) já foi observado através da medida do “clearance” de lítio que ocorre um aumento na reabsorção de sódio no túbulo proximal (CHIOLERO *et al.*, 2000; BIOLLAZ *et al.*, 1986). Este aumento poderia ser, pelo menos em parte, devido a expressão desregulada de transportadores de sódio

ou modificação nos efeitos dos peptídeos do SKK. Neste caso a válvula de segurança estaria fechada e o sódio se acumularia no organismo, aumentando o volume extracelular e conseqüentemente a pressão arterial.

Devido à importância das cininas no controle da pressão sanguínea e perfusão, o SKK presente no miocárdio, sistema vascular e no rim são os mais importantes. O efeito vasodilatador das cininas pode ser mediado por NO e prostaciclina (PGI₂) (DENDORFER *et al.*, 1999), enquanto o aumento na perfusão renal é mediado primariamente por prostaglandinas.

O SKK plasmático está envolvido nos processos de hipotensão, coagulação sanguínea e nas respostas inflamatórias. Sua ativação instantaneamente libera BK, que promove potente ação biológica nas células adjacentes (KATORI & MAJIMA, 2006; KATORI *et al.*, 1989).

1.5.1 Receptores e vias de sinalização de cininas

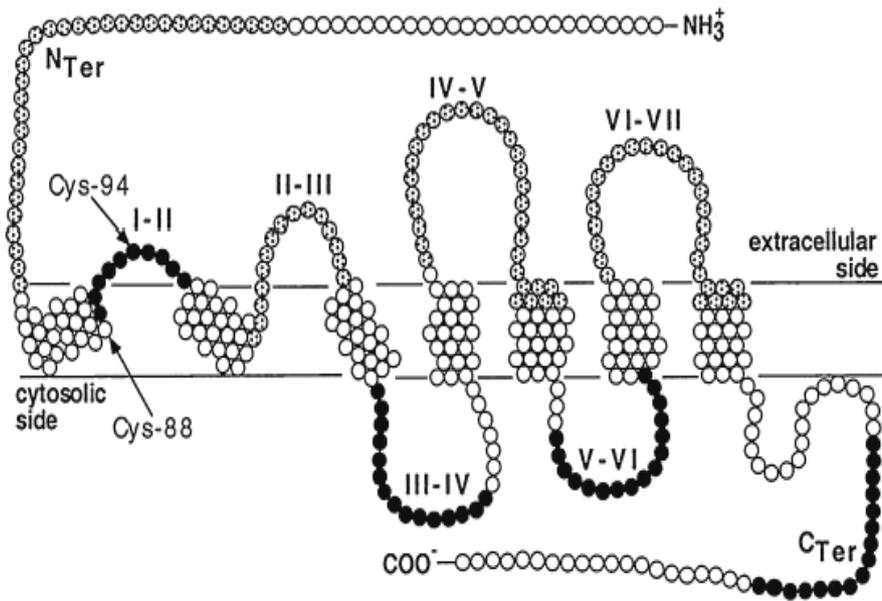
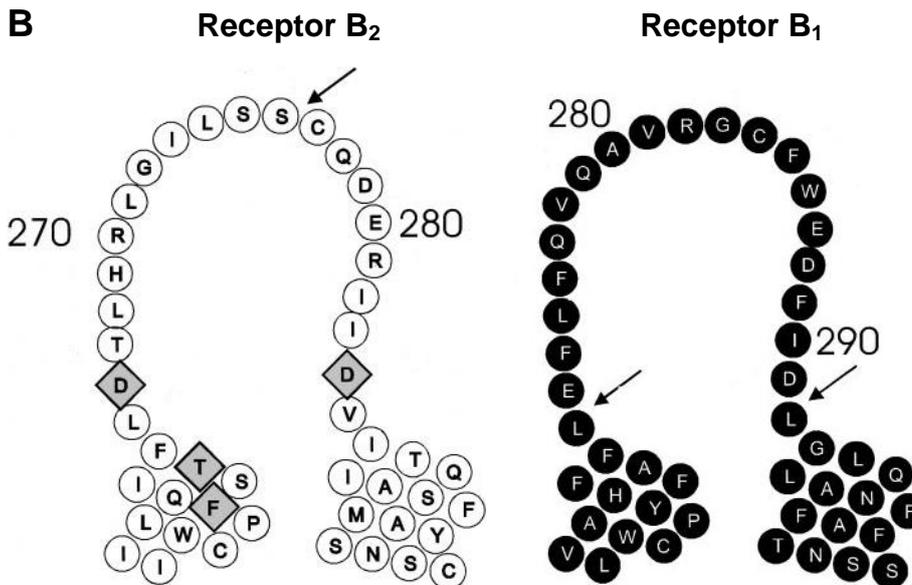
Até o momento, duas classes de receptores de bradicinina (B₁ e B₂) foram identificadas, utilizando como ferramentas farmacológicas diferentes agonistas e antagonistas. Ambos os receptores já foram clonados e pertencem à família de receptores de sete domínios transmembranas acoplados à proteína G (MARCEAU & REGOLI, 2004; MARCEAU *et al.*, 1998; CHAI *et al.*, 1996; EGGERICKX *et al.*, 1992).

Através da ativação de seus receptores as cininas exercem efeitos biológicos, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, estímulo das terminações nervosas sensoriais e simpáticas e contração de músculo liso. BK e Lys-BK são agonistas endógenos dos receptores B₂, enquanto DABK e des-Arg¹⁰-

(Lys-BK) são agonistas dos receptores B₁ (MARCEAU & REGOLI, 2004; FATHY *et al.*, 2000; PRADO *et al.*, 2002; QUITTERER *et al.*, 1999; MARCEAU *et al.*, 1998)

O receptor B₂ é expresso constitutivamente nos tecidos e está presente em diferentes segmentos do néfron: túbulo proximal, porção espessa ascendente da alça de Henle e ducto coletor (ARDAILLOU *et al.*, 1998; MARIN-CASTAÑO *et al.*, 1996; FIGUEROA *et al.*, 1995) (FIGURA 5A). A expressão do receptor B₁ é induzida durante injúria tecidual e processos infecciosos e inflamatórios (MARCEAU *et al.*, 1998; CHAI *et al.*, 1996). Embora o receptor B₁ seja induzido em condições específicas, tem sido sugerido que estes receptores podem ser expressos em condições normais na vasculatura e no rim (NAKHOSTINE *et al.*, 1993; LORTIE *et al.*, 1992). Em condições patológicas, o receptor B₁ medeia as ações inflamatórias das cininas podendo ser ativado principalmente por DABK, cujos níveis estão aumentados durante a inflamação. O receptor B₂ medeia diversas ações conhecidas das cininas, incluindo a regulação da pressão sanguínea sistêmica, transporte de água e eletrólitos, crescimento celular, permeabilidade capilar, atividade vasodilatadora em células endoteliais (MARCEAU & REGOLI, 2004; KATORI & MAJIMA, 2003; COUTURE *et al.*, 2001; TORNEL *et al.*, 2000; BHOOLA *et al.*, 1992). Dados sugerem que a calicreína possa diretamente ativar o receptor B₂ e inclusive induzir sua redistribuição na membrana plasmática (HECQUET *et al.*, 2002, 2000)

Sobre a funcionalidade e os mecanismos de transdução de sinal relacionados ao subtipo B₁ existem menos informações descritas. A seqüência de aminoácidos é 36% idêntica a do receptor B₂ (FATHY *et al.*, 2000; MENKE *et al.*, 1994). A coexistência dos receptores B₁ e B₂ já foi detectada em células mesangiais de rato (BASCANDS *et al.*, 1993).

A**B**

(alça extracelular entre os domínios transmembrana IV e V)

FIGURA 5. Receptores de bradicinina.

(A). Estrutura do receptor B₂ humano. setas: cisteínas em posição análoga as da seqüência do receptor B₂ de rato. bolas pretas e pontilhadas: posição dos peptídeos utilizados para gerar anticorpos (retirado de QUITTERER *et al.*, 1999) (B). Comparação da seqüência de aminoácidos, da alça entre os domínios transmembrana IV e V, dos receptores B₁ e B₂. setas: aminoácidos fundamentais para ligação dos respectivos agonistas, aminoácidos em quadrados: resíduos críticos para ligação de BK a B₂ (adaptado de FATHY *et al.*, 2000).

Já foi mostrado que a porção N-terminal de BK que se liga ao receptor B₂ é adjacente a Cys²⁷⁷, na alça extracelular entre os domínios IV e V (FIGURA 5B) (HERZIG *et al.*, 1996). Além disso, a ligação de BK a este receptor é diretamente dependente de dois resíduos de aspartato, Asp²⁶⁸ e Asp²⁸⁶, localizados na mesma alça, que interagem com a porção N-terminal de BK (Arg¹) (FIGURA 5B) (NOVOTNY *et al.*, 1994). Lys-BK e des-Arg¹⁰-(Lys-BK) se ligam com muito mais afinidade aos receptores B₁. Foi demonstrado que a porção N-terminal destes peptídios interage com o receptor B₁ na alça extracelular entre os domínios IV e V, especificamente nos resíduos Glu²⁷³ e Asp²⁹¹ (FIGURA 5B) (FATHY *et al.*, 2000). Ainda não está claro o mecanismo responsável pela menor afinidade de BK ao receptor B₁, mas a afinidade de BK por B₂ está relacionada aos resíduos Asp²⁶⁸ e Asp²⁸⁶ localizados na alça extracelular entre os domínios IV e V deste receptor.

Um terceiro tipo de receptor de BK (receptor B₃) tem sido identificado em células endoteliais de aorta bovina, na microvasculatura e em cultura de células de músculo liso traqueal de porco-da-índia (FARMER *et al.*, 1991; FIELD *et al.*, 1992 REGOLI *et al.*, 1990)

Vários mecanismos de transdução de sinal têm sido descritos para as cininas em diferentes células. Dentre eles destaca-se a ativação de cascatas de fosfolipases A₂, C e D (PLA₂, PLC e PLD) as quais catalisam a clivagem de fosfolipídeos de membrana com subsequente liberação de prostaglandinas, óxido nítrico, inositol fosfato e diacilglicerol (DAG). Estas vias de sinalização podem levar à mobilização do cálcio intracelular e ativação de diversas isoformas de proteína cinase C (GABRA *et al.*, 2003; MARCEAU *et al.*, 1998).

O receptor B₁ está principalmente associado à ativação de PLC, PLA₂ e MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) (MARCEAU *et al.*, 1998).

Essencialmente a maioria das ações farmacológicas das cininas depende dos receptores B₂, que são acoplados a proteínas G_q e G_i (KANG & LEEB-LUNDBERG, 2002). A ativação de proteínas G_{αq} está relacionada ao estímulo de PLC β e ativação de PKC por diacilglicerol (DAG) (GABRA *et al.*, 2003; KATORI & MAJIMA, 2003; DE WEERD & LEEB-LUNDBERG, 1997;. A subunidade G $\beta\gamma$, dissociada após ativação de G_i, também é capaz de ativar PLC β (MORRIS & MALBON, 1999). O início dessa via de sinalização pode levar a proliferação celular através da ativação de diferentes cascatas da MAPK (LIEBMANN, 2001). Esta ativação pode envolver subunidades α ou $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas, tirosinas cinases, moléculas adaptadoras, proteínas cinases e outras proteínas (ZHANG & DONG, 2007; NODA *et al.*, 2004; BLAUKAT *et al.*, 2000)

O aumento da liberação de Ca²⁺ intracelular, através da ativação do receptor B₂, promove estímulo da NOS endotelial (óxido nítrico sintase) e PLA₂, causando vasodilatação em células endoteliais da vasculatura arterial. Os produtos liberados, NO e PGI₂, atuam sobre células musculares lisas causando relaxamento e conseqüentemente vasodilatação. Já sobre a vasculatura venosa, BK causa vasoconstrição por ação direta sobre as células musculares lisas, também via aumento de Ca²⁺ intracelular (BHOOLA *et al.*, 1992).

Outros mecanismos de transdução de sinal desencadeados por bradicinina têm sido identificados em vários modelos e tecidos, dentre eles a modulação de PLD, adenilato ciclase (AC) e transportadores iônicos (LIEBMANN *et al.*, 1995; VAN BLITTERSWIJK *et al.*, 1991; CUTHBERT & MARGOLIUS, 1982). O próprio receptor B₂ pode ser fosforilado a partir de um estímulo, um mecanismo que pode levar a dessensibilização do receptor (BLAUKAT *et al.*, 1996). Outros mecanismos conhecidos podem modular a função e afinidade do receptor B₂. A dessensibilização

dos receptores B₂ devido a internalização é tipicamente observada durante estímulo contínuo (ROSCHER *et al.*, 1984; MUNOZ *et al.*, 1993). A redistribuição, estímulo dependente, desses receptores em cavéolas, assim como a endocitose em vesículas contendo caveolina podem estar envolvidas na internalização desses receptores (HAASEMANN *et al.*, 1998; DE WEERD & LEEB-LUNBERG, 1997). Diferenças na afinidade do receptor B₂ têm sido mostradas em diversos tecidos e preparações. Alguns estudos têm revelado que a afinidade do receptor pode depender do acoplamento da proteína G, de fosforilação e da ocupação dos receptores. (PIZARD *et al.*, 1998; BLAUKAT *et al.*, 1996; LIEBMAN *et al.*, 1990; LEEB-LUNDBERG & MATHIS, 1990)

Estudos relatam a expressão gênica dos receptores B₂ tecido-específica durante o desenvolvimento, no início do desenvolvimento é mais de 10 vezes maior que em ratos adultos, sugerindo que as cininas atuam de forma importante na fase pós-natal. O rim e o sistema cardiovascular são os principais tecidos onde a expressão do receptor B₂ é maior durante o início do desenvolvimento. (el-DAHR *et al.*, 1997).

No rim e em outros tecidos, a BK é conhecida por estimular liberação de ácido araquidônico (AA). Este é produzido a partir de fosfolipídeos de membrana, via ação direta da PLA₂ ou a partir da ação de uma lipase sobre o DAG, levando a formação de prostaglandinas (PG) (JENKINS *et al.*, 2003; COHEN-LURIA *et al.*, 1994; KENNEDY *et al.*, 1997). A ativação de PLA₂, induzida por BK, e a liberação de AA podem estar relacionadas ao acoplamento de B₂ à proteína Gi, sensível a toxina pertussis (NODA *et al.*, 2004; RICUPERO *et al.*, 1993; YANAGA *et al.*, 1991)

Alguns efeitos renais de BK podem ocorrer pela ativação de PKC e produção de PGE₂ (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; KOPP *et al.*, 2000). Em células do epitélio

tubular de coelhos, a síntese de PGE₂ e ativação indireta de AMPc foi demonstrada após tratamento com BK (WELSH et al., 1998). Entretanto, no ducto coletor, BK suprime a formação de AMPc, estimulada por ADH, via aumento da produção de PGE₂ (COYNE & MORRISON, 1991).

1.5.1.1 Fosfolipase C/Proteína cinase C (PLC/PKC)

O metabolismo de fosfoinosítídeos tem um papel importante em diversas funções celulares. Em resposta a ativação de receptores por hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e outras moléculas, pode ocorrer a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) por uma fosfolipase específica (PI-PLC). Dependendo da isoforma desta enzima, o estímulo pode ser via subunidade α da proteína Gq, ou pelas subunidades $\beta\gamma$ da proteína Gi. A partir da hidrólise do PIP₂, duas moléculas com importantes funções como sinalizadores celulares são geradas: diacilglicerol (DAG) e IP₃ (inositol 1,4,5-trisfosfato) (KATAN, 1998).

O IP₃ se difunde pelo citosol e se liga a receptores específicos no retículo endo/sarcoplasmático, resultando na abertura de canais de Ca²⁺ e conseqüente aumento do Ca²⁺ intracelular. Este aumento desencadeia uma série de respostas de acordo com o tipo celular e condição específica. Nas células musculares está relacionado com aumento da contração, já no endotélio estimula a produção de NO que induz relaxamento vascular. Além disso, o Ca²⁺ está também envolvido no tráfego de vesículas e participa como modulador da atividade de diferentes enzimas como a calmodulina, PKC e PLA₂.

O DAG, que permanece na membrana plasmática, pode ativar uma PKC. Esta enzima é componente da família de serina/treonina fosfotransferases e está envolvida em diversas vias de sinalização celular. Dentre as diferentes isoformas de

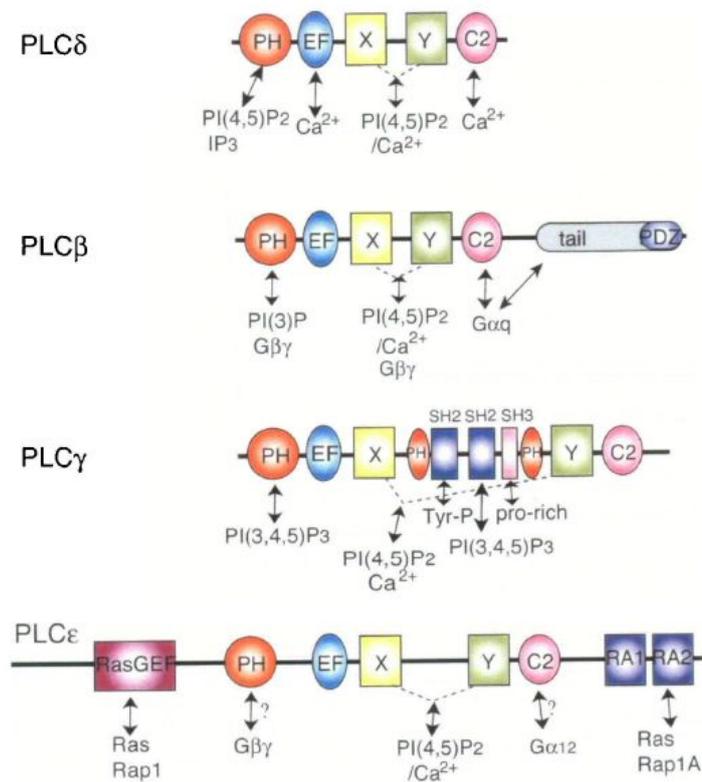
PKC já descritas em mamíferos, pelo menos quatro delas são ativadas por DAG (CORBALÁN-GARCÍA & GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 2006).

Diversas isoformas de PLC foram identificadas e subdivididas em 4 classes, com base na estrutura e no mecanismo regulatório de ativação: PLC β (1-4), PLC γ (1,2), PLC δ (1-4) e PLC ϵ (1) (FIGURA 6A) As várias isoformas de PLC são ativadas por diversos receptores e diferentes mecanismos (FUKAMI, 2002).

Cada isoenzima é composta de domínios conservados e domínios subtipo-específicos. A análise desses domínios tem revelado especificidades em relação aos mecanismos de interação proteína-proteína e proteína-lipídeo necessários para ancoramento das enzimas na membrana plasmática (WILLIAMS, 1999). A proteína Gq estimula a atividade da PLC do tipo β (PLC β), enquanto a PLC γ é regulada por tirosina cinases (receptor e citosólicas). Já a regulação da PLC δ se dá por mecanismos que envolvem cálcio intracelular. A PLC ϵ foi identificada como efetora da proteína Ras e é regulada por Ras de modo GTP-dependente (FUKAMI, 2002).

Todas as isoformas de PLC apresentam os domínios catalíticos X e Y, assim como diversos domínios regulatórios, dentre eles: domínios C2, EF-hand e PH (homologia à plecstrina). Os domínios regulatórios subtipo-específicos contribuem para a diferenciação das isoformas e incluem: domínio de homologia a Src (SH) na PLC γ e domínios de associação a Ras e fator trocador de Ras-GTPase-símile (Ras-GEF-like) na PLC ϵ . As isoformas β apresentam domínios PH, EF-hand, C2, X e Y na porção N-terminal. Além disso, possuem uma extensão C-terminal de aproximadamente 400 aminoácidos, incluindo motivos de ligação PDZ (Ser/Treo)-X-(Val/Leu)-COOH. A PLC δ 1 apresenta domínio PH que compreende cerca de 100 resíduos de aminoácidos e liga fortemente PIP2 e IP3 (FUKAMI, 2002).

A



B

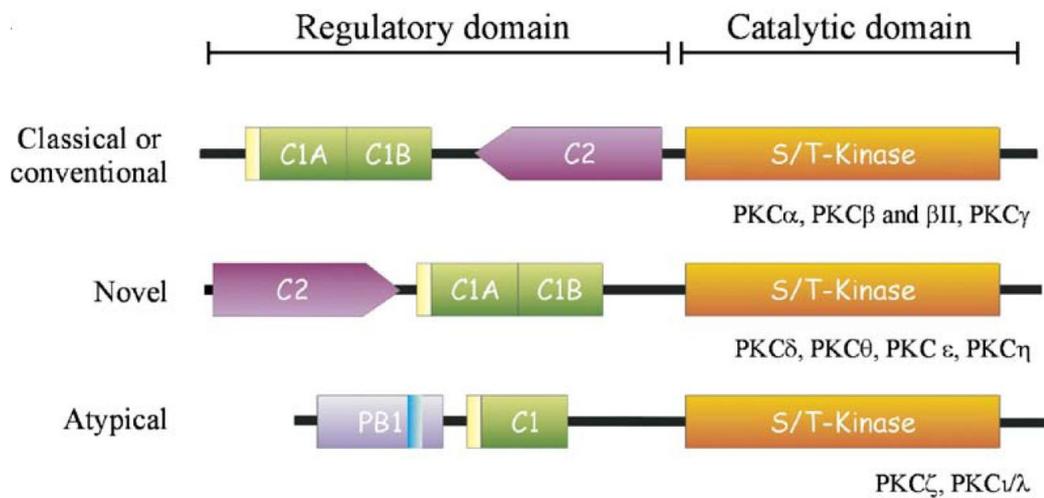


FIGURA 6. Isoformas de PLC e PKC.

(A) Domínios característicos das isoformas descritas de PLC. PH: homologia à plecstrina; EF: mão EF; C2: ligação ao cálcio; PDZ: associação à proteínas; SH: homologia à Src; RasGEF: ligação à proteínas reguladoras de Ras; RA: ligação à Ras; X e Y: domínios catalíticos (retirado de FUKAMI, 2002); (B). Domínios característicos das diferentes isoformas de PKC. C1: domínio de ligação a DAG; C2: domínio de ligação a Ca^{2+} ; PB₁: domínio de associação a proteínas; S/T-kinase: domínio serina/treonina cinase (retirado de CORBALÁN-GARCÍA & GÓMEZ-FERNÁNDES, 2006)

Apesar das PLCs serem descritas como enzimas principalmente citosólicas e serem translocadas para a membrana em resposta à ativação de receptores, foi descrito que a PLC β 3 se liga especificamente a fatores reguladores do trocador Na⁺/H⁺ (NHERFs), os quais apresentam dois domínios PDZ. Este relato indica que a PLC β pode ser translocada para a membrana e associar-se com moléculas específicas (HWANG *et al.*, 2000). Sabe-se que o domínio C2 de PLC β 1 liga especificamente G $_{\alpha q}$ -GTP, seu ativador fisiológico. Neste domínio C2, determinante da ligação de cálcio, os resíduos chave para ligação do cálcio não são conservados, indicando que a ativação da enzima pode ser independente de cálcio (WANG *et al.*, 1999, REBECCHI & PENTYALA, 2000). Dados recentes (RANGEL *et al.*, 2005) demonstraram a presença de PI-PLC β em preparação de membrana basolateral isolada de túbulo proximal de rim de porco.

As isoformas de PKC estão envolvidas em eventos de transdução de sinal de diversas vias intracelulares, assim como também estão relacionadas a condições patológicas. São expressas em diversos tipos celulares e até mesmo isoformas diferentes estão presente em um mesmo tipo celular (CORBALÁN-GARCÍA & GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 2006). Elas são divididas em 3 classes, as convencionais ou clássicas (α , β e γ), as novas (δ , ϵ η/L , θ) e as atípicas (ζ e ι/λ), conforme ilustrado na FIGURA 6B, e diferem na sua estrutura primária e características bioquímicas (WAY *et al.*, 2000; NEWTON, 1995).

As diferentes isoformas de PKC possuem um domínio cinase C-terminal e geralmente dois domínios regulatórios N-terminal, C1 e C2, que são alvos de diferentes segundo-mensageiros. As convencionais e novas apresentam dois domínios C1 (C1A e C1B) e um domínio C2. Nas convencionais o domínio C2 está em seqüência com o domínio C1, o que as torna responsivas a Ca²⁺ e DAG. Nas

novas, o domínio C2 precede o domínio C1 e não responde a Ca^{2+} , o que torna essas enzimas Ca^{2+} -independentes, enquanto a sensibilidade a DAG é mantida. Já as atípicas não apresentam domínio C2 e tem somente um domínio C1, insensível a DAG.

Estruturalmente, a cinase é dividida em dois subdomínios ou lobos: um pequeno lobo N-terminal (lobo N) composto de 5 folhas- β e uma α -hélice proeminente (hélice αC) e um grande lobo chamado de lobo C, predominantemente helicoidal. O domínio catalítico de todas as PKCs contém um sítio de ligação a ATP e sítios consenso para fosforilação. Esta porção interage com o substrato e realiza a transferência de fosfato. Para se tornarem ativas, todas as isoformas requerem duas ou três fosforilações seqüenciais do sítio catalítico. Esses sítios de fosforilação são conservados dentre os membros da família (CORBALÁN-GARCÍA & GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 2006).

Grande parte das isoformas de PKC está localizada no citosol e após estímulo são translocadas para a membrana plasmática, com posterior ativação (HALLER *et al.*, 1994, 1998). Porém, já demonstraram PKC constitutivamente expressa na membrana plasmática (CHAKRAVARTHY *et al.*, 1994). Corroborando este fato, RANGEL *et al.* em 2002 detectaram a presença de PKC em membrana basolateral isolada de túbulo proximal de rim de porco, bem como mensuraram sua atividade.

1.5.1.2 Fosfolipase A₂ (PLA₂)

A superfamília da PLA₂ consiste em um grande número de enzimas caracterizadas pela capacidade de catalisar especificamente a hidrólise da ligação éster, na posição sn-2 de um glicerofosfolípido, liberando ácido araquidônico (AA) e

lisofosfolípídeos, ambos mediadores lipídicos. O AA é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, presente primariamente nos fosfolípídeos de membranas celulares, além de ser conhecidamente um precursor dos eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos).

Pelo menos 19 enzimas PLA₂ foram identificadas e clonadas em mamíferos. As PLA₂ são classificadas em três grupos principais de acordo com o requerimento de cálcio para ativação: secretória (sPLA₂), que requer concentrações milimolares de cálcio; citosólica (cPLA₂), que requer concentrações micromolares de cálcio; e independente de Ca²⁺ (iPLA₂), que não requer cálcio (KUDO & MURAKAMI, 2002).

Os produtos da hidrólise da reação da PLA₂ têm grande importância como segundos-mensageiros intracelulares e como precursores dos eicosanóides. O ácido araquidônico livre é metabolizado por diversas vias, sendo uma delas pela ciclooxigenase (COX), iniciando então a biossíntese das prostaglandinas e dos tromboxanos, que são potentes mediadores das inflamações e transdutores de sinais (AUSTIN & FUNK, 1999). O lisofosfolípídeo é um importante membro da sinalização celular, do remodelamento lipídico e agente capaz de aumentar a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática (BROWN *et al.*, 2003; MOOLENAAR *et al.*, 1997; BALSINDE & DENNIS, 1997).

A família das cPLA₂ consiste de três isoenzimas (cPLA₂α, cPLA₂β e cPLA₂γ) (KITA *et al.*, 2006; MURAKAMI & KUDO, 2004; UNDERWOOD *et al.*, 1998). A cPLA₂α e a cPLA₂β apresenta um domínio C2 N-terminal, o qual é importante para a associação, dependente de cálcio, com os fosfolípídeos da membrana. Já a cPLA₂γ não apresenta o domínio C2, contendo no C-terminal um sítio de isoprenilação pela qual se liga à membrana. A cPLA₂α desempenha funções importantes na célula, estando envolvida na proliferação celular (KITA *et al.*, 2006).

A família das sPLA₂ está presente em grânulos secretórios de células imunes e é induzida em situações de inflamação. Essas enzimas apresentam um sítio catalítico conservado e depende de Ca²⁺ (SCHALOSKE & DENNIS, 2006).

Pelo menos duas formas enzimaticamente ativas de iPLA₂ já foram clonadas e identificadas em diversas espécies e em grande variedade de células, sendo classificada como grupo VI, subdividido em VIA e VIB (BALSINDE & BALBOA, 2005). Apresentam entre 85 e 88 kDa, possuem uma seqüência consenso de lipase (GXSTG) e um possível domínio de ligação de ATP. A iPLA₂-VIA-1 é uma proteína de 85kDa, em cuja região N-terminal, após uma seqüência de anquirinas, ocorre um sítio catalítico contendo a seqüência consenso da lipase (glicina-X-serina 465-X-glicina) no qual a serina 465 atua como o centro catalítico (WISTEAD *et al.*, 2000). A iPLA₂-VIA-2 é uma isoforma com 88 kDa apresentando uma estrutura primária idêntica à iPLA₂-VIA-1, com uma pequena diferença. A seqüência de anquirinas é interrompida pela adição de 54 aminoácidos à sua estrutura. As duas isoformas são expressas em vários tecidos e são ativadas na ausência de cálcio (YANG *et al.*, 1999a). Dentre as funções atribuídas a estas duas isoformas estão o remodelamento dos fosfolipídeos através de reações de deacilação e a liberação de ácido araquidônico (BALSINDE & BALBOA, 2005). Também foi proposto que a iPLA₂ do grupo VI está envolvida no crescimento celular e apoptose (BALSINDE *et al.*, 2006; WISTEAD *et al.*, 2000).

1.5.1.3 Prostaglandina E₂ (PGE₂)

As três principais vias enzimáticas de metabolização do ácido araquidônico (AA) estão presentes no rim: a via da ciclooxigenase (COX), a via da lipooxigenase e a via do citocromo P-450. A via da COX medeia a formação de prostaglandinas e

tromboxanos, a via de lipooxigenase está envolvida na formação de mono-, di- e tri-ácido hidroxieicosatetraenoico (HETEs), leucotrienos e lipoxinas e a via de citocromo P-450 promove a formação de ácidos epoxieicosatrienoico (EETs), seus dióis correspondentes (HETEs) e derivados monooxigenados de AA.

A COX é um conhecido alvo terapêutico dos analgésicos, antipiréticos e de drogas anti-inflamatórias não esteroidais. A via enzimática da COX é a principal via de metabolismo de AA no rim. O AA quando metabolizado pela COX (1 ou 2) é convertido a PGG_2 (prostaglandina G_2), via atividade bis-oxigenase, e posteriormente este intermediário prostanóide instável é convertido a PGH_2 , pela atividade peroxidase da COX. PGH_2 é subseqüentemente metabolizada por sintases específicas a prostanóides biologicamente ativos e mais estáveis (BOS *et al.*, 2004) (FIGURA 7).

A COX-1 é constitutivamente expressa em diversos tipos celulares, no rim é expressa abundantemente no ducto coletor, pouco é expressa no túbulo proximal e na alça de Henle (FIGURA 8) (HAO & BREYER, 2008). A expressão de COX-2 é induzida e específica em determinados tipos celulares. Nos rins de mamíferos pode ser detectado altos níveis de COX-2, principalmente na região da mácula densa e córtex renal (HAO & BREYER, 2008; BREYER & HARRIS, 2001).

Uma terceira enzima COX (COX-3), semelhante a COX-1, foi relatada. O RNAm de COX-3 já foi demonstrado em córtex cerebral e coração. (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Uma vez PGH_2 formada, ela pode ser convertida enzimaticamente por sintases específicas, PGIS, PGES, PGFS, TxS, PGDS, produzindo cinco prostanóides, respectivamente PGI_2 (prostaciclina), PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, TXA_2 (tromboxano A_2) e PGD_2 (FIGURA 7). Esses prostanóides são abundantemente produzidos

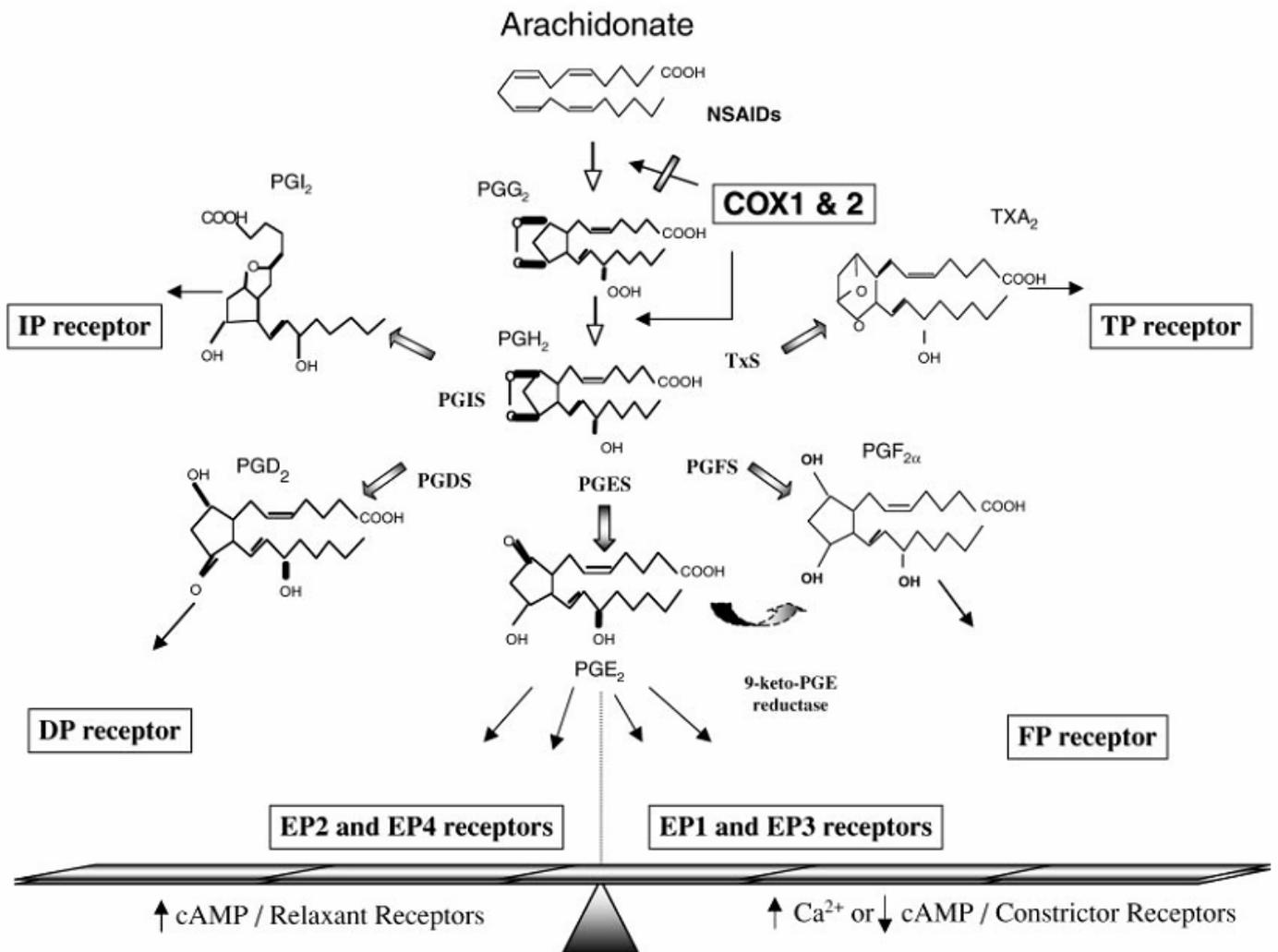


FIGURA 7. Metabolismo do AA via COX.

O AA é metabolizado pela COX1 ou COX2 a PGG₂ (prostaglandina G₂) e depois a PGH₂ (prostaglandina H₂), por uma reação em duas etapas. PGH₂ é relativamente instável, sendo convertida enzimaticamente, por sintases específicas (TxS, tromboxano sintase; PGE sintase; PGF sintase; PGD sintase e PGI sintase), gerando os cinco prostanoïdes primários (TxA₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂ e PGI₂). Cada prostanoïde interage com membros distintos da subfamília de receptores acoplados a proteína G. PGI₂ – receptor IP, PGD₂ – receptor DP, PGF_{2α} – receptor FP, TxA₂ – receptor TP e PGE₂ – receptor EP. Esses receptores ativam diferentes vias de sinalização. PGE₂ interage com quatro distintos receptores EP, cada um acoplado a diferentes vias de sinalização (retirado de BREYER & BREYER, 2001)

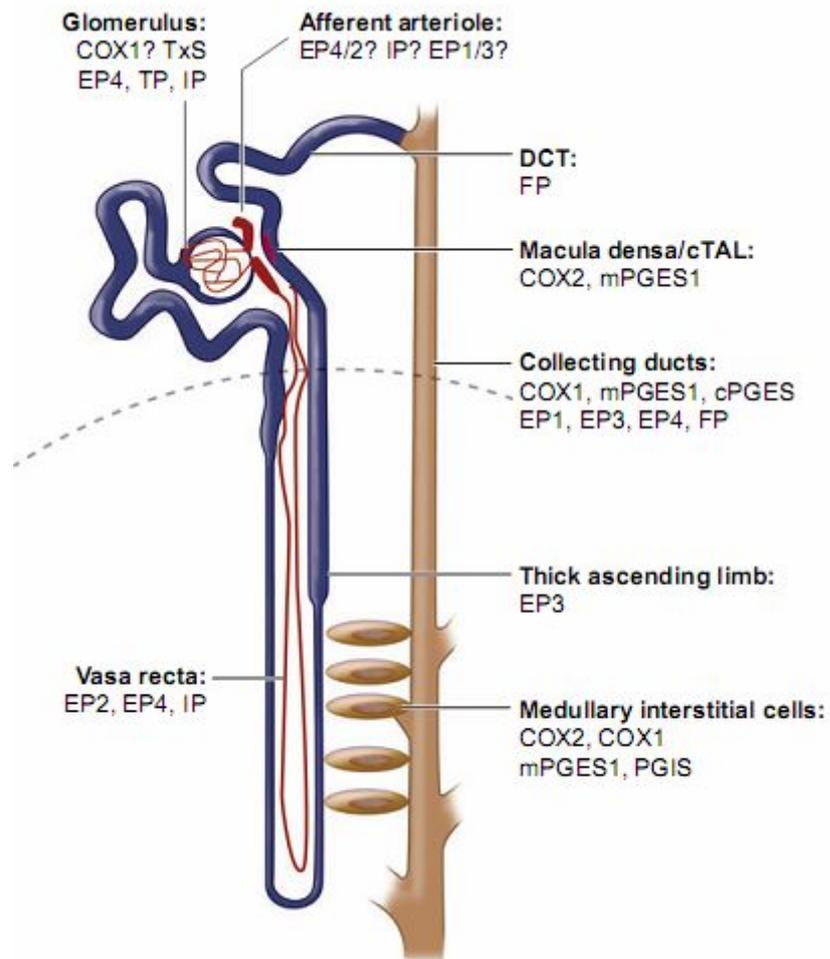


FIGURA 8. Expressão da ciclooxygenase, prostanoide sintase e receptores prostanoídes no rim (retirado de HAO & BREYER, 2008)

no rim, onde atuam localmente via receptores específicos designados IP, EP, FP, TP e DP, respectivamente, e exercem efeitos regulatórios importantes na função renal (BREYER & BREYER, 2001). Os receptores de prostaglandinas fazem parte da família de receptores acoplados a proteína G, ou metabotrópicos, e cada prostanóide interage com seus receptores específicos, ativando diferentes vias de sinalização (HAO & BREYER, 2008).

Pelo menos três PGE sintases já foram identificadas: PGE sintase microsomal 1 e 2 (mPGES1 e mPGES2) e PGE sintase citosólica (cPGES) (TANIKAWA *et al.*, 2002; TANIOKA *et al.*, 2000; JAKOBSSON *et al.*, 1999). A partir dos relatos da literatura, somente a mPGES1 parece ter sua expressão induzida por citocinas e estímulo inflamatório, além de apresentar atividade catalítica maior que as outras PGESs (LAZARUS *et al.*, 2002; TANIKAWA *et al.*, 2002; MURAKAMI *et al.*, 2002; JAKOBSSON *et al.*, 1999). A PGE₂ é um dos principais eicosanóides formados no rim e tem papel importante sobre a modulação da excreção renal de água e sódio (HAO & BREYER, 2008; BREYER & BREYER, 2000; BONVALET *et al.*, 1987). Este prostanóide tem atividade vasodilatadora e natriurética e também interfere na ação do hormônio antidiurético. O resultado final do estímulo da secreção de prostaglandinas no rim pode levar a vasodilatação, aumento na perfusão renal, natriurese e diurese (HAO & BREYER, 2008)

Quatro subtipos de receptores específicos para PGE₂ (EP, E-prostanóide) foram clonados e caracterizados: EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄. (BREYER & BREYER, 2000, 2001; ABRAMOVITZ *et al.*, 2000; NARUMIYA *et al.*, 1999) A distribuição intrarenal dos receptores prostanóides tem sido mapeada, os subtipos de receptores EP exibem expressão diferenciada ao longo do néfron, sugerindo efeitos distintos para cada subtipo no rim. Os receptores EP₂ e EP₄ estão relacionados ao aumento dos

níveis de AMPc intracelular, enquanto EP₁ e EP₃ ao aumento nos níveis de Ca²⁺ ou diminuição nos níveis de AMPc intracelular (BREYER & BREYER, 2001). A FIGURA 8 mostra a localização desses receptores, bem como das COXs e prostanoídes sintases ao longo do néfron.

Os metabólitos gerados a partir do AA pela ação da COX têm um papel importante no transporte de sal e água ao longo do néfron, atuando de maneira autócrina e parácrina. Por exemplo, ocorre interação entre túbulo coletor renal e porção espessa ascendente da alça de Henle, envolvendo síntese de PGE₂ nos túbulos coletores (SMITH, 1989).

Estudos iniciais de microperfusão documentam que PGE₂ presente na face basolateral de células do túbulo proximal podem entrar nestas células e serem secretadas ativamente para o lúmen e, além disso, inibidor de transporte de ânion orgânico, bem como indomethacina e ouabaína parcialmente inibem o acúmulo de PGE₂ nessas células, bem como sua secreção (IRISH, 1979). Outros estudos indicam que o transporte renal de prostaglandinas pode ocorrer via trocador de ânion ou cátion orgânico (KIMURA *et al.*, 2002; BOUMENDIL-PODEVIN & PODEVIN, 1985).

Já foi clonada uma molécula que medeia o transporte de PGE₂ em troca de lactato, seria um transportador de PG denominado PGT (SCHUSTER, 2002). PGT é membro da família de proteínas transportadoras de ânion orgânico (OAT), que são proteínas transmembrana com aproximadamente 100 aminoácidos que exibem uma ampla distribuição tecidual no coração, cérebro, fígado, músculo esquelético, rim, ovário, entre outros (CHAN *et al.*, 1998; LU *et al.*, 1996; KANAI *et al.*, 1995). A principal rota de excreção de PGE₂ é pelo sistema de secreção de ânions orgânicos no túbulo proximal, onde a entrada pela membrana basolateral é a etapa limitante,

sendo mediada pelo transportador de ânion orgânico renal do tipo 1 (rOAT1) e rOAT3. Existe a hipótese que a própria PGE₂ possa abolir sua excreção pelo rOAT 1 ou rOAT3 (SAUVANT *et al.*, 2006). Outra família de transportadores, proteínas resistentes a multidrogas (MRP), também pode transportar PGs de forma dependente de ATP. MRP-2 é expressa na borda em escova das células de túbulo proximal renal e pode contribuir com o transporte das PGs (TOUHEY *et al.*, 2002; NIES *et al.*, 2002; VAN AUBEL *et al.*, 2000; ROLLER *et al.*, 1999; CUI *et al.*, 1999)

Como visto nesta seção, através de receptores específicos, PGE₂ é capaz de modular a excreção de sal e água, e desta forma, os múltiplos efeitos de PGE₂ revelam sua importância na regulação da pressão arterial e controle do volume extracelular.

1.6 Resultados anteriores

Em 1999, nosso laboratório tinha como objetivo o estudo dos mecanismos de ação de BK na excreção renal de sódio. Naquele momento foi investigado o efeito de BK na reabsorção de sódio no túbulo proximal, em particular nas bombas de sódio, uma vez que este representa um importante segmento na modulação da excreção renal de sódio conforme discutido acima. Para isso foram feitos experimentos utilizando membrana basolateral isolada de túbulo proximal de rim de porco e verificou-se que BK não foi capaz de modular a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase. A ausência de efeito sobre a (Na⁺+K⁺)ATPase poderia indicar a necessidade da integridade celular (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999a; 2001; 2004). Por outro lado, BK modulava a atividade Na⁺-ATPásica de maneira dose-dependente e bifásica: o aumento na concentração de BK de 10⁻¹⁴M a 10⁻¹⁰M promovia inibição da atividade Na⁺-ATPásica, e o posterior aumento na concentração (de 10⁻¹⁰M a 10⁻⁶M) promovia o estímulo da mesma (CARUSO-NEVES

et al., 1999a). Vale ressaltar que estes efeitos eram observados em 30 minutos de reação. Também foi mostrado que este efeito bifásico era devido à ação de BK sobre dois receptores diferentes. BK promove inibição via receptor B₂ e seu metabólito DABK promove estímulo via receptor B₁, através da ativação da via PI-PLCβ/PKC (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999a; 2003b). Assim, esses resultados mostraram que o efeito final de BK na excreção renal de sódio dependeria não só de sua produção como também da sua degradação a DABK e da sua interação com diferentes receptores.

Mais recentemente nosso laboratório iniciou estudos com o objetivo de avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na ação de BK sobre a Na⁺-ATPase via receptor B₂. Quando na presença de antagonista do receptor B₁, portanto os efeitos de BK não poderiam ser mediados por este receptor, BK possui também um efeito bifásico. Este efeito bifásico era tempo dependente: até 10 minutos de reação ocorria ativação da enzima, enquanto que em tempos superiores a este ocorria a inibição, como observado anteriormente (LÍBANO-SOARES *et al.*, 2008) (FIGURA 9). Estudos iniciais sugeriram que a fase inibitória era dependente da fase estimulatória (2, FIGURA 10). Além disso, foi mostrado que a fase estimulatória envolvia uma PKC independente de Ca²⁺, enquanto a fase inibitória envolvia uma PLA₂/PGE₂ (GOMES-QUINTANA, 2004). Contudo, a participação de uma PI-PLCβ e sua possível ativação por BK não tinha sido demonstrada (1, FIGURA 10). Outra questão em aberto era o tipo de PLA₂ envolvida na fase inibitória (3, FIGURA 10) e as vias de sinalização desencadeadas por PGE₂ (4, FIGURA 10).

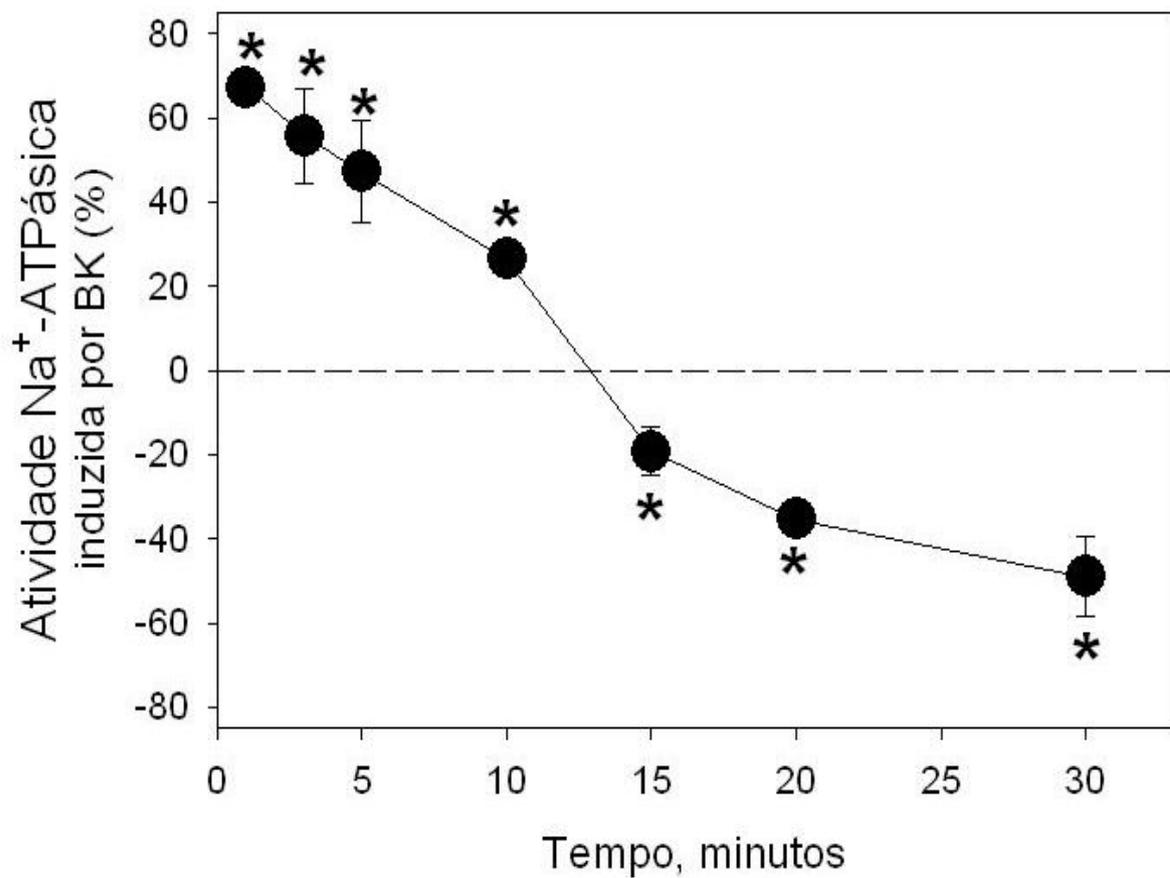


FIGURA 9. Curso temporal do efeito de BK, via B_2 , sobre a atividade Na^+ -ATPásica (LÍBANO-SOARES *et al.*, 2008).

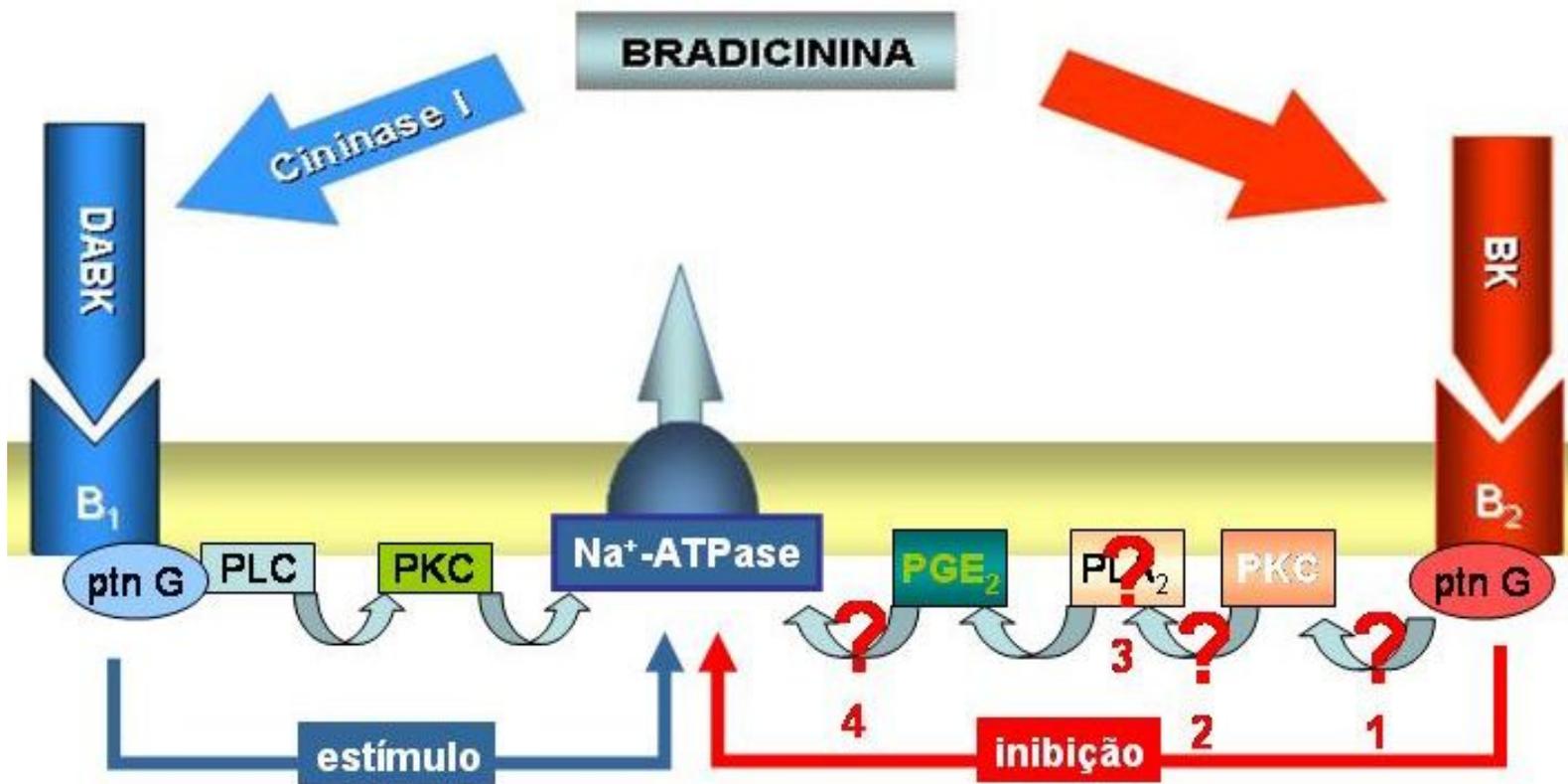


FIGURA 10. Mecanismo de ação de BK sobre a Na⁺-ATPase, via receptores B₁ e B₂. 1, 2, 3 e 4: questões em aberto (vide texto)

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito de BK, via receptor B_2 , sobre a Na^+ -ATPase de túbulo proximal de rim de porco.

Objetivos específicos:

- Determinar o envolvimento de PI-PLC β na fase estimulatória;
- Caracterizar o tipo de PLA $_2$ envolvida no efeito de BK;
- Estudar a interdependência entre as fases estimulatória e inibitória, moduladas por BK via receptor B_2 ;
- Determinar o papel dos produtos de PLA $_2$ no efeito inibitório de BK;
- Identificar a via de sinalização envolvida no efeito de PGE $_2$;
- Verificar a possível modulação de PLA $_2$ por PGE $_2$.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Materiais*

ATP (adenosina trifosfato; sal de sódio), ouabaína, furosemide, AMPc, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina N'-2-etanosulfônico), TRIZMA base (tris[hidroxi metil] amino etano), EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil), bradicinina (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹), des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (DALBK), HOE140 (DArg¹-Arg²-Pro³-Hyp⁴-Gly⁵-Thi⁶-Ser⁷-DTic⁸-Oic⁹-Arg¹⁰), AA (ácido araquidônico), PGE₂, BEL (bromo enol lactona), diclofenaco (sal de sódio), indometacina, 1,2-dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC), GDPβS, peptídeo inibidor de PKA (Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Trh-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp), forskolina (FSK), CTX (toxina da cólera), U73122, calfofina C e albumina bovina sérica foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St Louis, EUA; PMA (phorbol myristate acetate), Histona tipo II-S e PACOCF₃ (palmitoyl trifluoromethyl ketone) foram comprados da Calbiochemical, San Diego, EUA. [³²P] Pi foi adquirido da Comissão Nacional de Energia Nuclear – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CNEN-IPEN), São Paulo, Brasil. Percoll, [³⁵S]GTPγS (1065 Ci/mmol) e L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]palmitoyl (54mCi/mmol) foram adquiridos de Amersham Pharmacia Biotech UK Limited. Sacarose, placas de sílica gel 60 para cromatografia em camada fina e todos os solventes utilizados nesta técnica foram adquiridos da Merck, Darmstadt, Alemanha. Os padrões lipídicos utilizados nas cromatografias (PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PC, fosfatidilcolina e AA) foram provenientes da Sigma Chemical Co., St Louis, EUA. Anticorpo anti-iPLA₂ foi obtido da Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA. Anticorpo secundário, conjugado a peroxidase, anti IgG coelho foi comprado da Calbiochem, San Diego, CA, USA. O ATP[γ-³²P] foi preparado como

descrito anteriormente (MAIA *et al.*, 1983). Todos os outros reagentes foram do maior grau de pureza disponível comercialmente. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada.

3.2 Preparação de membrana basolateral

O estudo da modulação da atividade Na^+ -ATPase pela bradicinina foi realizado em túbulos proximais de rim de porco. Os experimentos foram realizados em fração enriquecida de membrana basolateral de túbulos proximais, conforme descrito a seguir.

A fração purificada de membrana basolateral de túbulos proximais de rins de porco foi obtida segundo método originalmente descrito por SCALERA *et al.* em 1980 e posteriormente modificado (SACKTOR *et al.*, 1981; BOUMENDIL-PODEVIN & PODEVIN, 1983). Os rins de porcos foram retirados logo após ao abate em matadouro comercial (Matadouro Anchieta, Rio de Janeiro, RJ) e mantidos em solução resfriada a 4°C, contendo: sacarose 250 mM, HEPES (N-[2-hidroxi etil]piperazina-N'-[2-ácido etano sulfônico]) 10 mM, EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) 2 mM, PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil) 1 mM em pH 7,6 ajustado com Tris (Tris[hidroxi metil] amino etano). A porção mais externa do córtex (cortex-corticis), composta principalmente por túbulos contornados proximais, foi dissecada e homogeneizada na mesma solução em potter com pistilo de teflon, a 4°C.

O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 1500g, em centrífuga Hitachi-Himac, modelo SCR 20B (Tóquio, Japão), utilizando rotor RPR 12-2 Beckman (Califórnia, USA). O sobrenadante resultante foi centrifugado por 44 minutos a 40000g em centrífuga Beckman XL 100 (Tóquio, Japão), utilizando rotor 45Ti Beckman (Califórnia, USA). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado referente à fração microssomal foi ressuspenso em solução contendo: sacarose 250

mM, HEPES 10 mM, PMSF 1 mM; seguida da adição de Percoll 12% (v/v). A suspensão final foi homogeneizada e centrifugada por 66 minutos a 40000g, em centrífuga Beckman XL 100 com rotor 70Ti Beckman (Califórnia, USA). A fração de membrana basolateral foi aspirada, homogeneizada e centrifugada por 60 minutos a 200000g em centrífuga Beckman XL 100 utilizando rotor 90Ti Beckman (Califórnia, USA) para a remoção do Percoll (SACKTOR *et al.*, 1981). A fração de membrana basolateral enriquecida foi ressuspensa em sacarose 250mM e armazenada a -4°C. A concentração da proteína foi determinada segundo o método descrito por LOWRY *et al* em 1951.

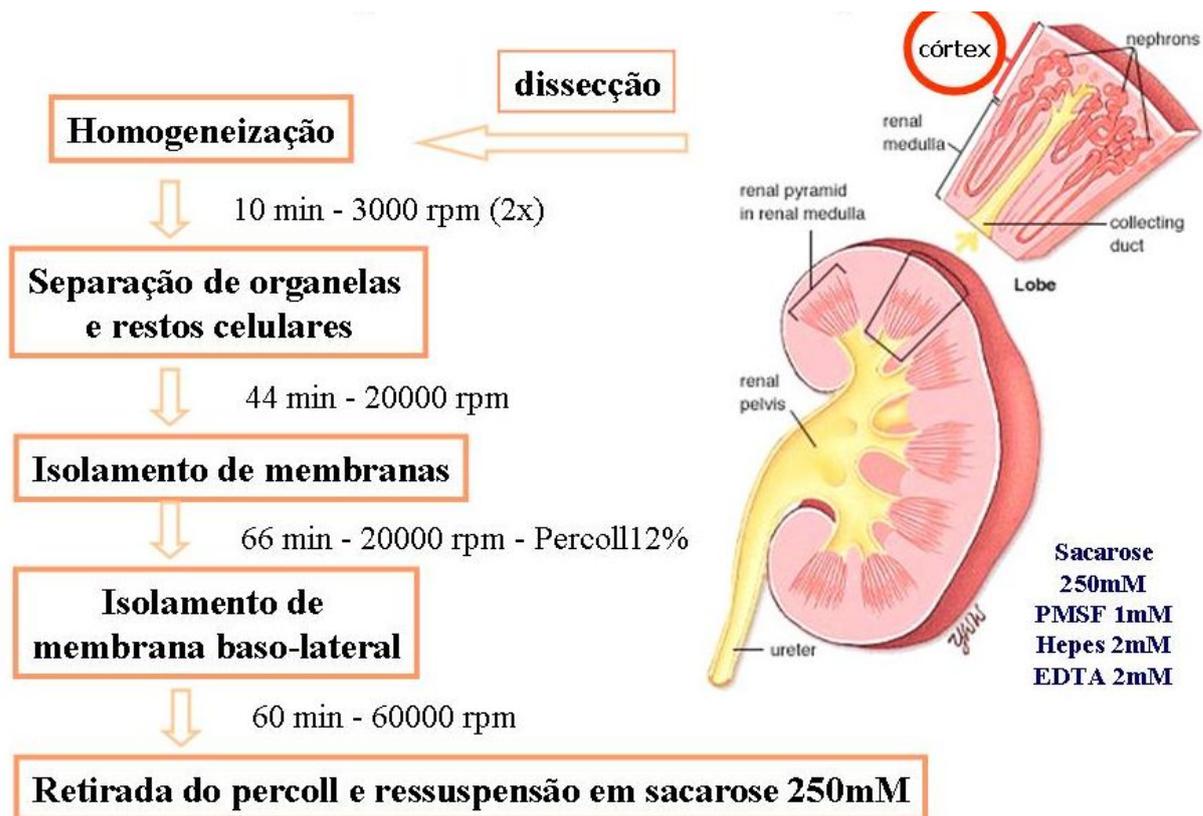


FIGURA 11. Isolamento das membranas basolaterais de túbulo proximal de rim de porco

3.3 Medida da atividade ATPásica

A atividade ATPásica foi determinada segundo o método descrito por GRUBMEYER & PENEFSKY em 1981. A composição do meio de reação para medir a atividade Na⁺-ATPásica, em volume final de 0,1ml, foi: DALBK 10⁻⁸M, MgCl₂ 4mM, [γ -³²P]ATP 2.000 cpm/nmol, ATP (sal de Na⁺) 4mM (pH 7,0), Hepes-Tris 20mM (pH 7,0) e NaCl 90mM.

A reação foi iniciada pela adição de proteína (concentração final 0,3 mg/mL) a 37°C na presença de diferentes compostos a serem testados. Após o tempo de reação estipulado, a reação foi parada pela adição de carvão ativado em HCl 0,1 N. A atividade Na⁺-ATPásica, expressa em nmoles Pi x mg⁻¹ x min⁻¹, foi calculada pela diferença entre os valores de atividade obtidos na ausência e presença de furosemide 2mM, sempre na presença de 1mM de ouabaína (inibidor específico da Na⁺/K⁺-ATPase) (PROVERBIO *et al.*, 1986). O [³²P]-Pi produzido foi medido em uma alíquota do sobrenadante obtido após a centrifugação da suspensão de carvão por 5 min a 2000 rpm, em contador de cintilação líquida (Packard Tri-carb 2100TR, Illinois, USA).

3.4 Medida da atividade de PLC

Os fosfolipídeos de membrana basolateral foram marcados radioativamente pela incubação a 37°C por 4 horas com 4 mM ATP (40000 cpm/nmol [γ -³²P]ATP), 4 mM MgCl₂, 20 mM Hepes–Tris (pH 7,0) e 90 mM NaCl. A reação foi iniciada pela adição de 10⁻⁹M BK ou veículo (10mM HCl). Os fosfolipídeos totais foram extraídos pelo método descrito por HORWITZ & PERLMAN (1987), modificado por MALAQUIAS & OLIVEIRA (1999). As amostras lipídicas foram dissolvidas em 20 μ L de uma mistura CHCl₃/CH₃OH/H₂O (75:25:2 v/v) e em seguida aplicadas juntamente com padrões de fosfolipídeos em placas de sílica gel 60 (colocadas previamente em

estufa a 110°C por 10 minutos para retirar a umidade). A cromatografia em camada fina (TLC) foi realizada com o seguinte sistema eluente: CHCl₃/CH₃OH/CH₃COCH₃/CH₃COOH/ H₂O (40:13:15:12:8 v/v). Após revelação com vapor de iodo, as manchas equivalentes a PIP₂, foram raspadas e a radioatividade quantificada por cintilação líquida (Packard Tri-carb 2100TR, Illinois, USA).

3.5 Medida da atividade de PLA₂

A medida de atividade de PLA₂ foi realizada de acordo com o método descrito por YANG *et al.* (1999a). O ensaio utilizou 100 µM DPPC (contendo 5.0×10⁵ cpm de 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C]palmitoil L-3-fosfatidilcolina) em 0,8 mM Triton X-100, micelas misturadas em 200 mM HEPES (pH 7,0), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM ATP e DALBK 10⁻⁸M. A reação foi iniciada pela adição de proteína (0,3 mg/mL) a 37°C. A extração de lipídeos foi realizada de acordo com o método de HOROWITZ & PERLMAN (1987), modificado por MALAQUIAS & OLIVEIRA (1999). As amostras lipídicas foram aplicadas em placas de sílica gel para TLC e resolvidas utilizando dois sistemas de solventes: CHCl₃/CH₃OH/H₂O (65:35:5 v/v) e C₆H₁₄/CH₃CH₂OCH₂CH₃/CHOOH (90:60:4 v/v). Antes da aplicação das amostras a placa foi colocada em estufa a 110°C por 10 min, para retirar a umidade. A região da placa contendo ácido graxo livre foi identificada por exposição a vapor de iodo, raspada e a radioatividade quantificada por cintilação líquida. (Packard Tri-carb 2100TR, Illinois, USA).

3.6 Análise eletroforética e Western Blotting

A presença de iPLA₂ em MBL foi determinada por eletroforese seguida de Western Blotting. 50µg de amostras de proteína MBL ou homogenato foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 7.5% SDS-PAGE e transferidas para

membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram incubadas “overnight” com anticorpo primário (anti-iPLA₂ 1:500) sob agitação a 4°C. Após lavagens com PBS-T a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti IgG coelho), diluído 1:5000 em solução 5% leite desnatado em PBS-T (tampão fosfato salino: NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1,7mM com 0,1% de Tween 20), por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A imunodeteção da proteína foi observada pela reação do ECL (Amersham-Pharmacia) segundo instruções do fabricante, seguida de exposição imediata ao filme (Kodak X-OmattmK XK-1 100)

3.7 Ensaio de ligação de [³⁵S]GTP_γS

A atividade de proteína G foi avaliada através de ensaio de ligação de [³⁵S]GTP_γS (1065Ci/mmol), segundo método descrito por LAZARENO *et al*, com modificações (LAZARENO *et al.*, 1999). O meio de reação (50μL) foi composto por: PGE₂, em concentrações que variaram de 10⁻¹²M a 10⁻⁶M, NaCl 100mM, MgCl₂ 10mM e HEPES-Tris 20mM (pH 7,0). A reação foi iniciada com a adição de proteína (MBL) (concentração final 1 mg/mL) e de 5nM de [³⁵S]GTP_γS. Após 1 minuto de reação a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 5mL de tampão de parada e imediatamente filtrada a vácuo, em filtros de microfibras de borossilicato (MFS Advantec Inc. GB140, 25mm diâmetro). O tampão utilizado para finalizar a reação tem a seguinte composição: NaCl 100mM, MgCl₂ 10mM e HEPES-tris 20mM (pH 7,0). Os tubos de reação foram lavados mais duas vezes, com 5mL deste tampão. A ligação não específica de [³⁵S]GTP_γS foi determinada na presença de 1mM de GTP_γS não radioativo no meio de reação.

3.8 Medida da atividade de proteína cinase A

A atividade da proteína cinase A (PKA) foi determinada pela incorporação de fosfato inorgânico à histona, a partir de [γ^{32} -P]ATP (7 μ Ci/ μ mol), sensível ao peptídeo inibidor de PKA. A composição do meio reacional foi: 4mM de MgCl₂, 20mM HEPES-Tris (pH 7,0), 10⁻⁸M de DALBK, 1,5 mg/ml de histona e 0,7 mg/ml de proteína (MBL). A reação ocorreu a 37°C e foi parada pela adição de ácido tricloro acético (TCA) 40% após os tempos indicados e as amostras foram imediatamente colocadas no gelo. Em seguida foram filtradas à vácuo em membranas Millipore 0,45 μ m, lavadas com TCA 20% e tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). A radioatividade foi quantificada por cintilação líquida (Packard Tri-carb 2100TR, Illinois, USA). A atividade específica foi calculada pela diferença entre os valores obtidos na ausência e na presença do peptídeo inibidor de PKA (iPKA 10⁻⁸M).

3.9 Análise estatística

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

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (número de experimentos em cada condição testada). Nos ensaios, cada condição experimental foi realizada em triplicata, sendo computadas nos resultados as médias aritméticas assim obtidas. Cada dado experimental (n) corresponde a resultados obtidos em uma mesma fração de preparação de membrana basolateral (MBL), sendo cada fração proveniente de populações distintas de porcos. Cada protocolo foi aplicado em diferentes frações de MBL.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito estimulatório de BK sobre a atividade Na⁺-ATPásica

Com o objetivo de evitar ação de BK mediada por receptor B₁ todos os experimentos realizados nesta tese foram feitos na presença de DALBK 10⁻⁸M, antagonista específico do receptor B₁. O primeiro passo foi confirmar o envolvimento do receptor B₂ na fase estimulatória do efeito de BK sobre a atividade Na⁺-ATPásica. Para isso a atividade enzimática foi medida na presença de BK 10⁻⁹ M e HOE140 10⁻⁶ M, um antagonista específico para o receptor B₂. O tempo de reação foi de 1 minuto uma vez que neste tempo observa-se somente a fase estimulatória (FIGURA 12). Os resultados mostraram que BK estimula a atividade da Na⁺-ATPase em 93% sendo este efeito revertido por HOE140. A adição do antagonista sozinho não promoveu nenhum efeito sobre a atividade da enzima.

Resultados anteriores mostram que a fase estimulatória envolve a ativação de uma PKC. Uma vez que a ativação de PKC geralmente é precedida da ativação de uma PLC, o próximo grupo experimental teve como objetivo verificar o possível envolvimento de PI-PLCβ. A adição de U73122 5x10⁻⁸M, inibidor específico da PI-PLCβ, também reverteu o efeito estimulatório de BK 10⁻⁹M sobre a atividade da Na⁺-ATPase (FIGURA 13). A FIGURA 14 mostra o curso temporal do efeito de BK sobre a atividade da PI-PLCβ. Os resultados mostraram que BK aumenta a atividade da PI-PLCβ sendo o efeito máximo observado no tempo de 15 segundos. Este estímulo se mantém até 45 segundos e é completamente revertido após 1 minuto de reação.

Esses dados mostram que o efeito estimulatório de BK sobre a Na⁺-ATPase é mediado via receptor B₂ e envolve a ativação de uma PI-PLCβ.

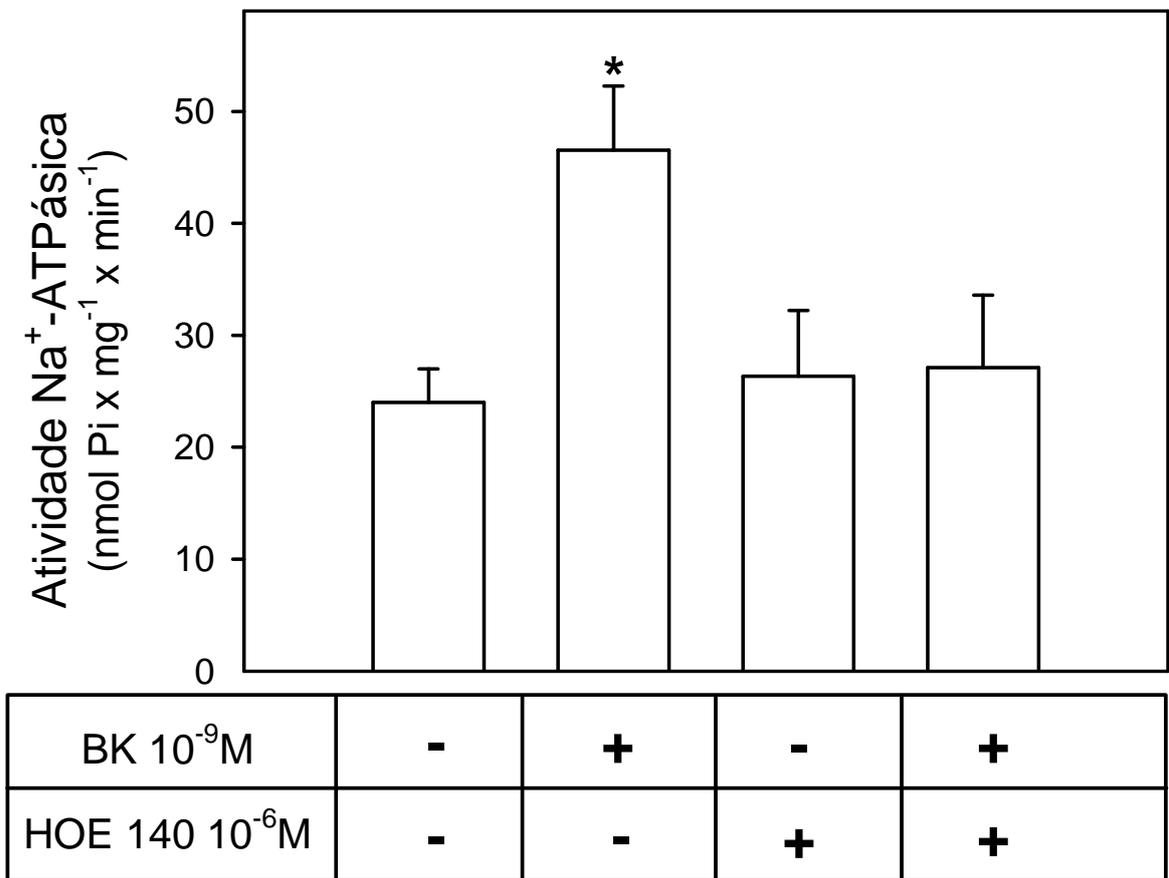


FIGURA 12. Efeito de HOE140 (antagonista de receptor B₂) sobre a atividade Na⁺-ATPásica modulada por BK.

A atividade ATPásica foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 1 minuto. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=6, p ≤ 0,05).

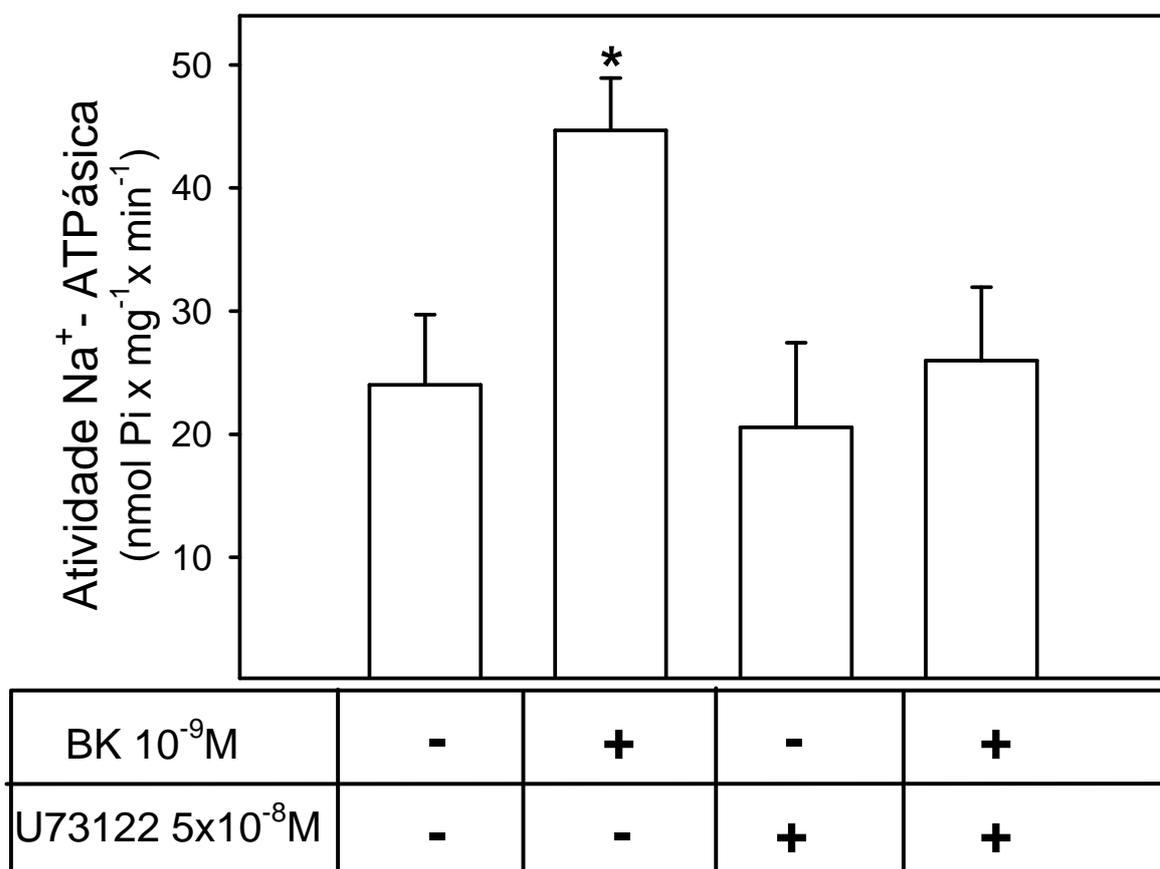


FIGURA 13. Efeito de U73122 (inibidor de PI-PLC β) sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica por BK.

A atividade ATPásica foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 1 minuto. Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=6, $p \leq 0,05$).

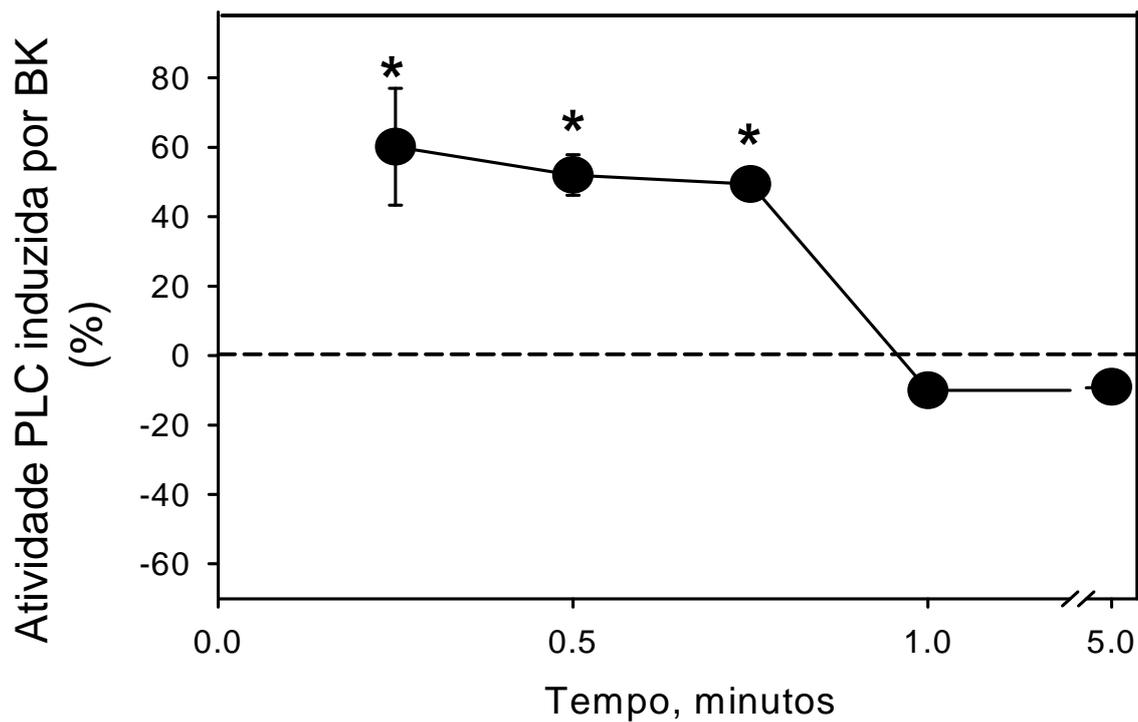


FIGURA 14. Curso temporal do efeito de BK sobre a atividade de PLC.

A atividade de PLC foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. A reação foi realizada na ausência (controle) e presença de BK 10^{-9} M nos diferentes tempos (15 segundos a 5 minutos). A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do $(^{32}\text{P})\text{PIP}_2$ degradado a partir da ação da PLC estimulada por BK. Os resultados estão expressos como média percentual \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($n=4$, $p \leq 0,05$).

4.2 Caracterização do tipo de PLA₂ envolvida no efeito de BK

Uma vez que o presente trabalho foi realizado utilizando membrana basolateral isolada como modelo experimental e o meio de reação é livre de cálcio (adição de 1 mM de EGTA), a PLA₂ envolvida no nosso sistema deve ser independente de Ca²⁺, membro da família iPLA₂. Para testar esta hipótese, experimentos foram feitos na presença de PACOCF₃ 10⁻⁶M e BEL 10⁻⁶M, inibidores seletivos de iPLA₂ (BALSINDE & BALBOA, 2005). A adição desses inibidores na presença de BK promoveu a reversão da inibição produzida por BK sobre a atividade Na⁺-ATPásica, em 20 minutos de reação (FIGURA 15)

Para confirmar a presença da isoforma iPLA₂ na preparação de membranas basolaterais isoladas, foi realizado imunodeteção utilizando anticorpo policlonal para iPLA₂ (FIGURA 16). Como controle positivo para iPLA₂ foi utilizada uma amostra de cerebelo de rato (YANG *et al.*, 1999b). Foi possível observar uma banda única em aproximadamente 85kDa tanto em membrana basolateral isolada quanto em homogenato de córtex. A expressão foi maior em MBL, indicando um enriquecimento da preparação.

Em seguida foi avaliada a atividade de PLA₂ modulada por BK na presença dos inibidores específicos de iPLA₂. A adição de BK aumentou a atividade da PLA₂ em 130%, sendo este efeito revertido completamente pela adição de PACOCF₃ 10⁻⁶M ou BEL 10⁻⁶M (FIGURA 17). Para confirmar que BK modula esta enzima via receptor do tipo B₂ foram realizados experimentos com HOE140 10⁻⁶M, antagonista específico para receptor B₂, ou GDPβS 10⁻⁶M, inibidor de proteína G trimérica (FIGURA 18). Estes compostos revertem o efeito estimulatório de BK sobre a atividade de iPLA₂. Estes resultados indicam que o efeito inibitório de BK sobre a atividade da Na⁺-ATPase, via B₂, envolve a ativação de uma iPLA₂.

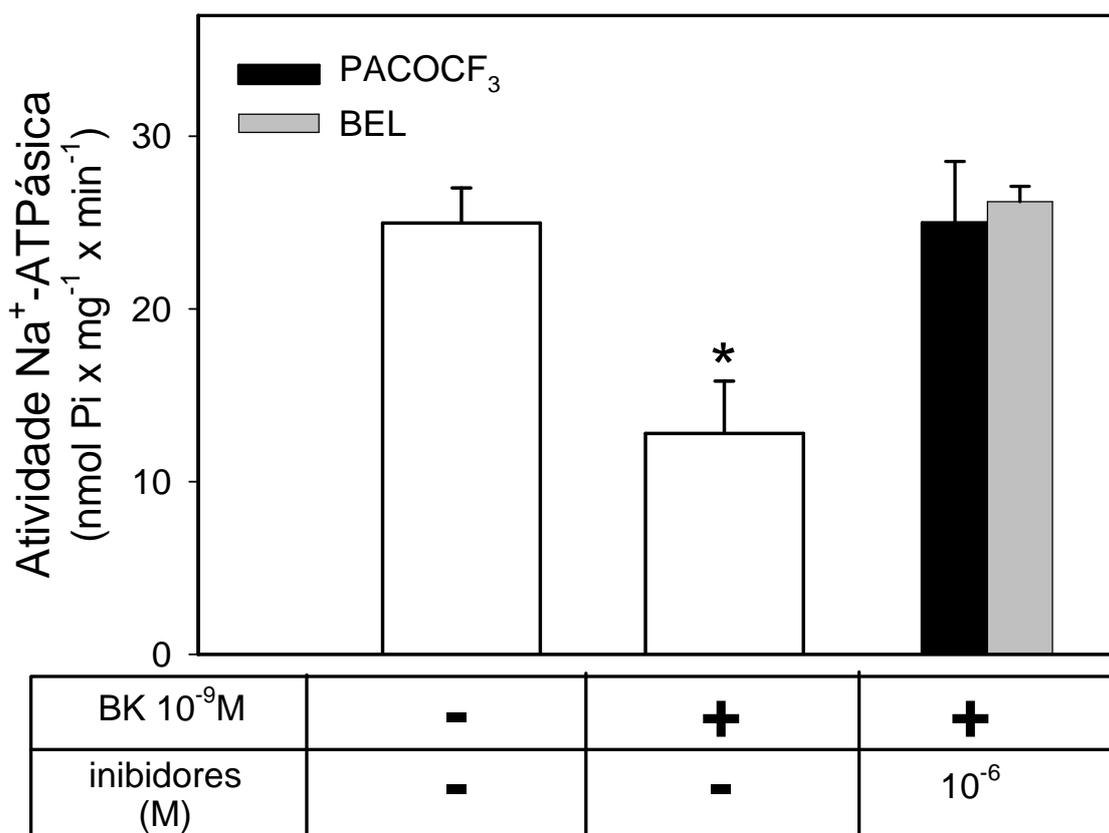


FIGURA 15. Efeito de PACOCF₃ e BEL (inibidores de iPLA₂) sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica por BK.

A atividade ATPásica foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 20 minutos. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=9, p ≤ 0,05).

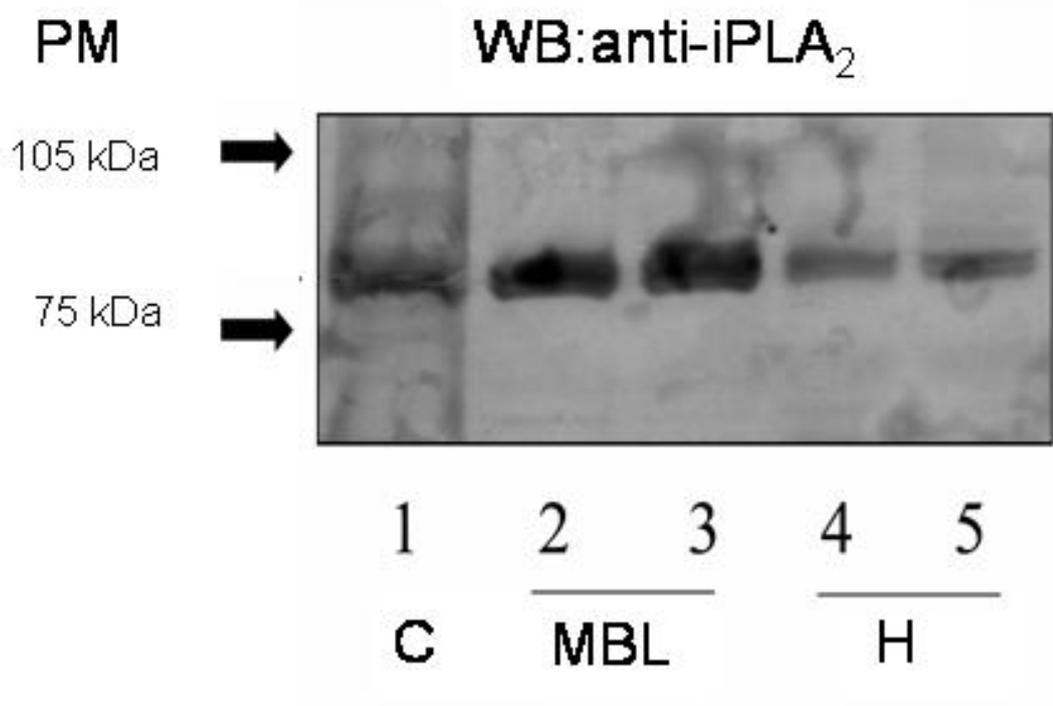


FIGURA 16. Detecção de iPLA₂ em MBL de túbulo proximal

As proteínas foram separadas em gel 7,5% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-iPLA₂ como descrito em “Materiais e Métodos” (1) Controle positivo (cerebelo de rato) 20µg; (2,3) 50 µg de proteínas obtidas em preparações diferentes de MBL isolada; e (4,5) 50 µg de proteínas obtidas de preparações diferentes de homogenato de córtex (n=3).

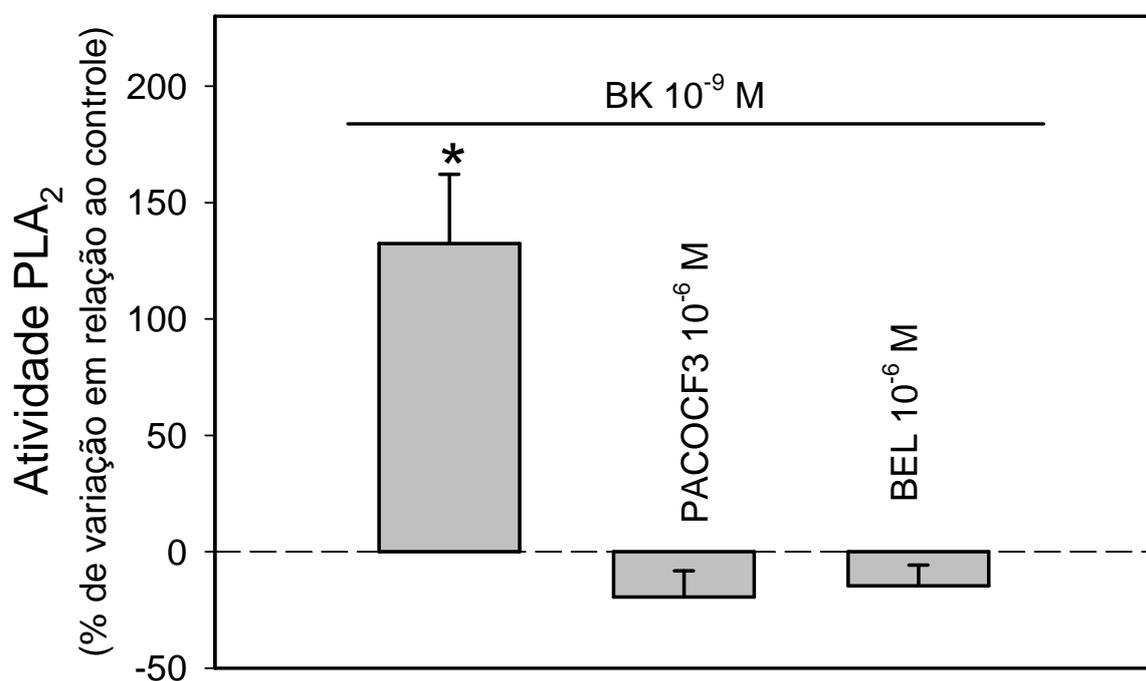


FIGURA 17. Efeito de PACOCF₃ e BEL (inibidores de iPLA₂) sobre a modulação da atividade da PLA₂ por BK.

A atividade de PLA₂ foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do (¹⁴C)ácido palmítico gerado a partir da ação da PLA₂. Tempo de reação: 5 minutos. Os resultados estão expressos como média percentual ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=6, p ≤ 0,05).

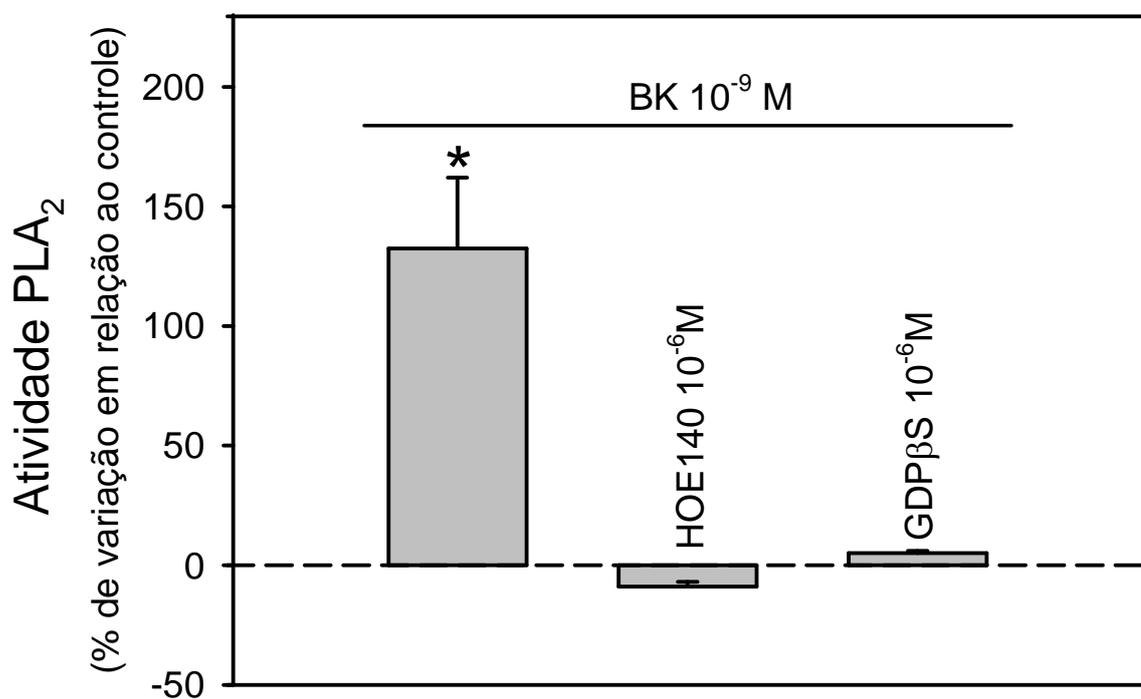


FIGURA 18. Efeito de HOE 140 (antagonista de receptor B₂) e GDPβS (inibidor de proteína G) sobre a modulação da atividade da PLA₂ por BK.

A atividade de PLA₂ foi medida conforme descrito em “Materiais e Métodos”. A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do (¹⁴C)ácido palmítico gerado a partir da ação da PLA₂. Tempo de reação: 5 minutos. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=6, p ≤ 0,05).

4.3 Interdependência entre as fases estimulatória e inibitória, moduladas por BK via receptor B₂

O próximo grupo experimental foi realizado com o objetivo de avaliar se a fase estimulatória desencadeada inicialmente por BK, via B₂, é necessária para que ocorra a fase inibitória. Para verificar a relação entre o estímulo da PI-PLCβ e a ativação de iPLA₂ por BK, a atividade da iPLA₂ foi medida na presença de BK e de inibidor específico de PI-PLCβ, U73122 (FIGURA 19). A adição de BK aumentou a atividade da iPLA₂ em 130%, sendo este efeito revertido completamente pelo U73122 5x10⁻⁸M. Na FIGURA 20 pode-se observar que a adição simultânea de BK 10⁻⁹M e calfofostina C 10⁻⁸M, inibidor específico de PKC, aboliu completamente o efeito estimulatório de BK sobre a atividade da iPLA₂. Além disso, PMA 10⁻¹²M, ativador da PKC, mimetizou o efeito estimulatório de BK sobre a atividade da iPLA₂. Portanto, esses dados comprovam que é necessária a prévia ativação da via PI-PLCβ/PKC por BK para que ocorra a ativação posterior de iPLA₂.

4.4 Papel dos produtos de PLA₂ no efeito inibitório de BK

Como abordado anteriormente, os produtos gerados a partir da ação de iPLA₂ sobre os fosfolípidos de membrana são ácidos graxos e lisofosfolípidos. Resultados anteriores demonstraram que o ácido araquidônico (AA) inibe a atividade Na⁺-ATPásica. Na FIGURA 21 pode-se observar que, em 20 minutos de reação, ambos BK 10⁻⁹M e AA 10⁻⁸M foram capazes de inibir a atividade Na⁺-ATPásica de maneira similar e não aditiva. Para avaliar a participação da COX no efeito de BK e AA sobre a Na⁺-ATPase foram realizados experimentos na presença de BK, AA e inibidores não seletivos de COX (indometacina 10⁻⁶M e diclofenaco 10⁻⁹M).

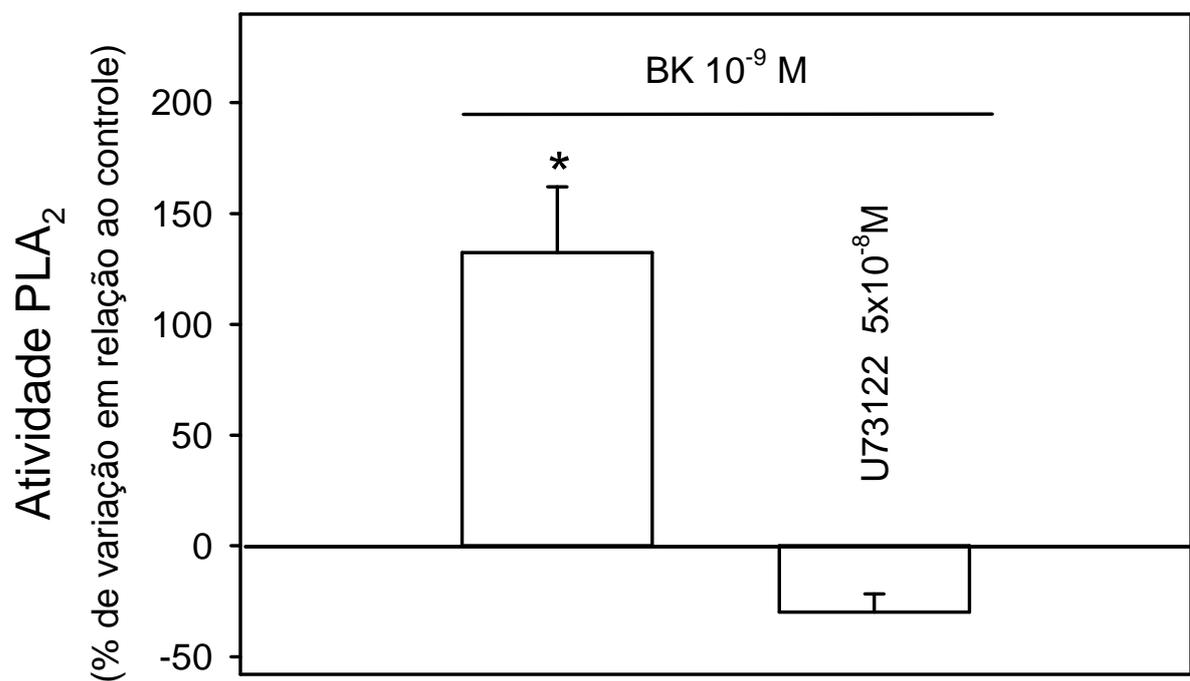


FIGURA 19. Modulação do efeito de BK sobre atividade de PLA₂ por U73122 (inibidor de PI-PLCβ).

A medida da atividade de PLA₂ foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do (¹⁴C)ácido palmítico gerado a partir da ação da PLA₂. Tempo de reação: 5 minutos. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=5, p ≤ 0,05).

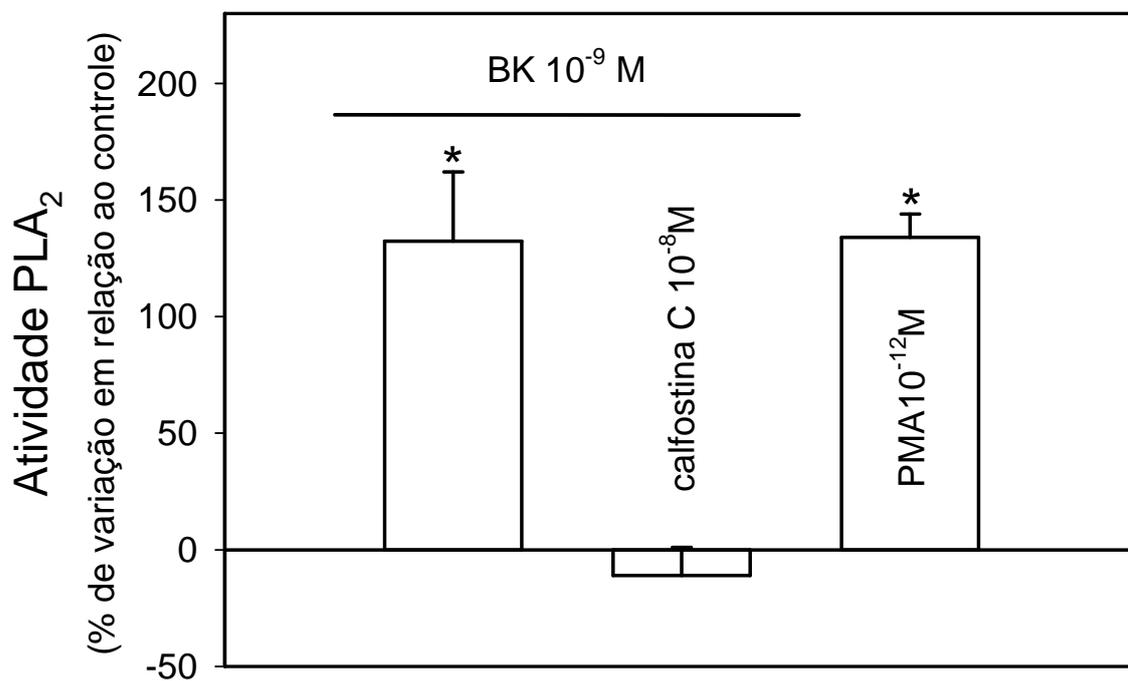


FIGURA 20. Modulação do efeito de BK sobre atividade de PLA₂ por calyculina C e PMA (inibidor e ativador de PKC, respectivamente).

A medida da atividade de PLA₂ foi realizada como descrita em "Materiais e Métodos". A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do (¹⁴C)ácido palmítico gerado a partir da ação da PLA₂. Tempo de reação: 5 minutos. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=5, p≤ 0,05).

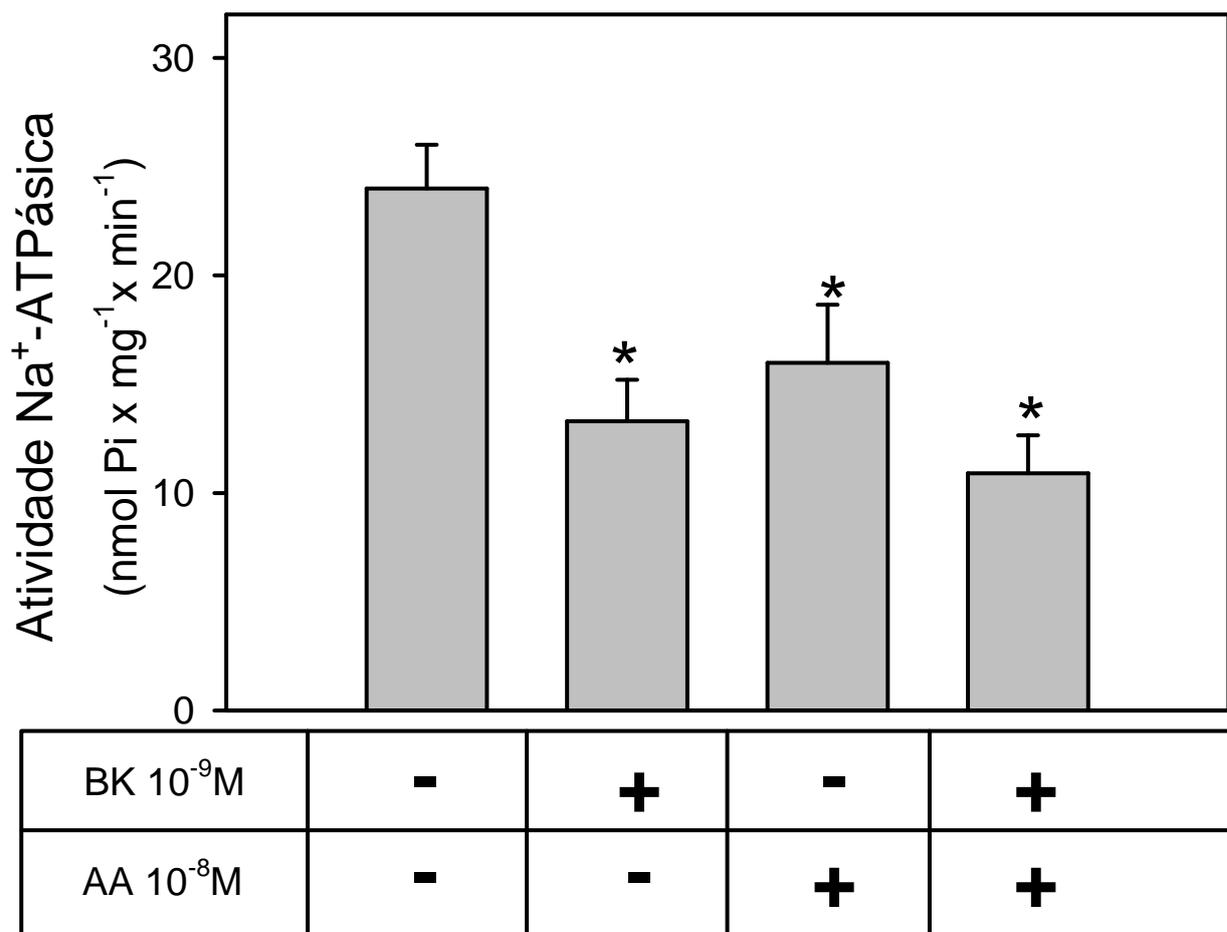


FIGURA 21. Efeito de AA sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica por BK.

A medida da atividade Na⁺-ATPásica foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 20 minutos. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=8, p ≤ 0,05).

A FIGURA 22 demonstra que o efeito inibitório tanto de BK quanto de AA sobre a atividade Na⁺-ATPásica foi revertido na presença dos inibidores não seletivos de COX. Estes dados indicam que BK e AA atuam pela mesma via, promovendo a inibição da Na⁺-ATPase e que este efeito é dependente da ativação de COX.

4.5 Via de sinalização envolvida no efeito de PGE₂

Como AA e COX estão envolvidos no efeito inibitório de BK sobre a atividade Na⁺-ATPásica, a próxima etapa foi investigar a via de sinalização envolvida no efeito de PGE₂, principal prostanóide produzido no rim. Em um trabalho anterior, nosso grupo mostrou que PGE₂ promove inibição da Na⁺-ATPase de maneira similar e não aditiva a BK (LOPES *et al.*, 2004). Em geral, os efeitos de PGE₂ são mediados por receptores de 7 domínios transmembrana (EP) e envolvem a ativação de proteína G trimérica. Na FIGURA 23 observa-se que o efeito inibitório de PGE₂ sobre a atividade Na⁺-ATPásica foi revertido por GDPβS 10⁻⁶M, inibidor de proteína G trimérica. A adição de GDPβS sozinho não promoveu efeito sobre a atividade Na⁺-ATPásica. Para confirmar o envolvimento de proteína G trimérica foram realizados experimentos de ligação de [³⁵S]GTPγS, um análogo não hidrolisável do GTP. A FIGURA 24 mostra que a PGE₂ aumentou a ligação de [³⁵S]GTPγS à MBL de maneira dose-dependente. Esses dados confirmam que existe o envolvimento de receptor acoplado a proteína G trimérica na via de inibição da Na⁺-ATPase por PGE₂.

Como abordado na Introdução, PGE₂ através da ativação de receptores EP pode modular os níveis de AMPc intracelular (BREYER & BREYER, 2001). Com a finalidade de determinar a via de sinalização desencadeada por PGE₂, a isoforma de

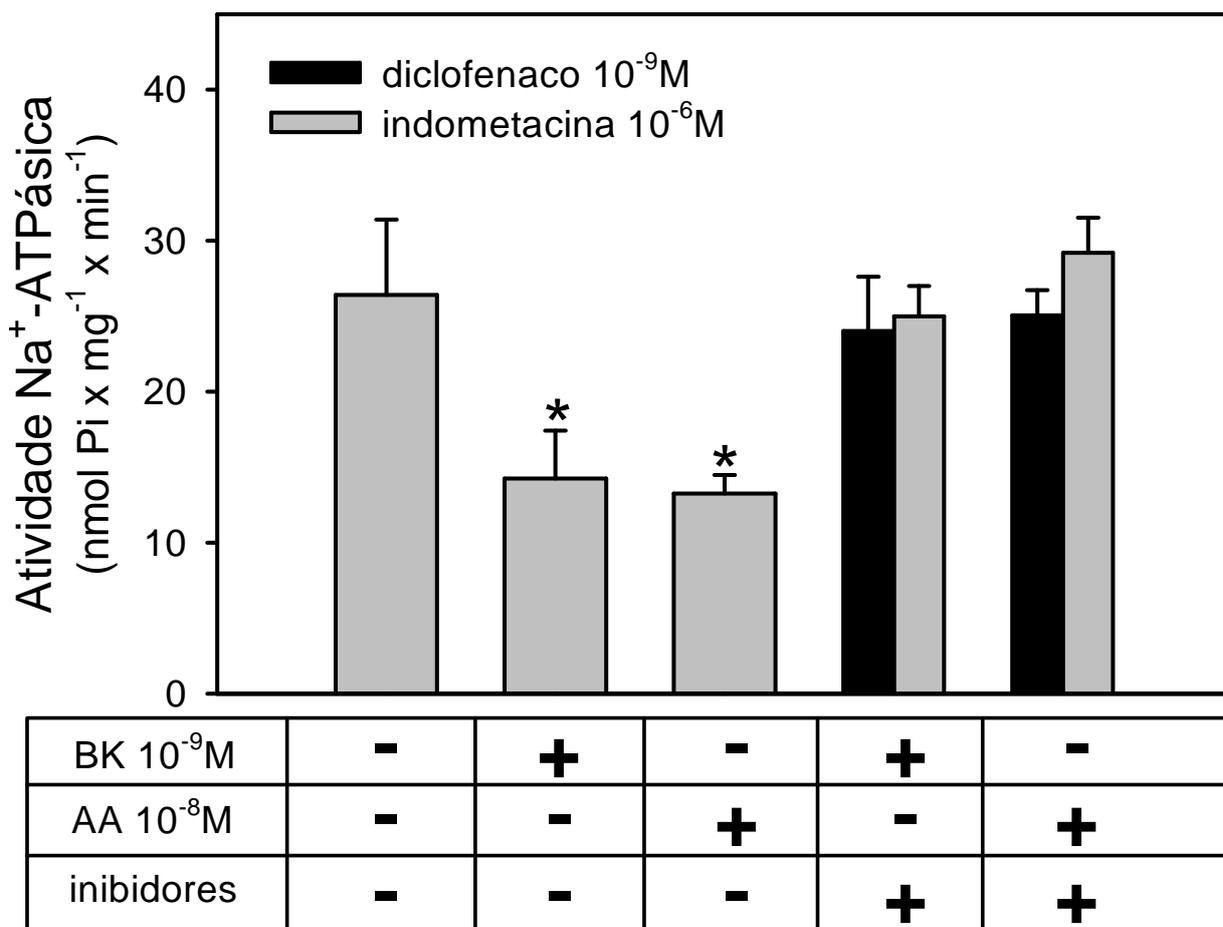


FIGURA 22. Efeito de AA e BK sobre a atividade Na⁺-ATPásica na presença de inibidores de COX.

A medida da atividade Na⁺-ATPásica foi realizada como descrita em "Materiais e Métodos". Tempo de reação: 20 minutos. Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=4, p \leq 0,05).

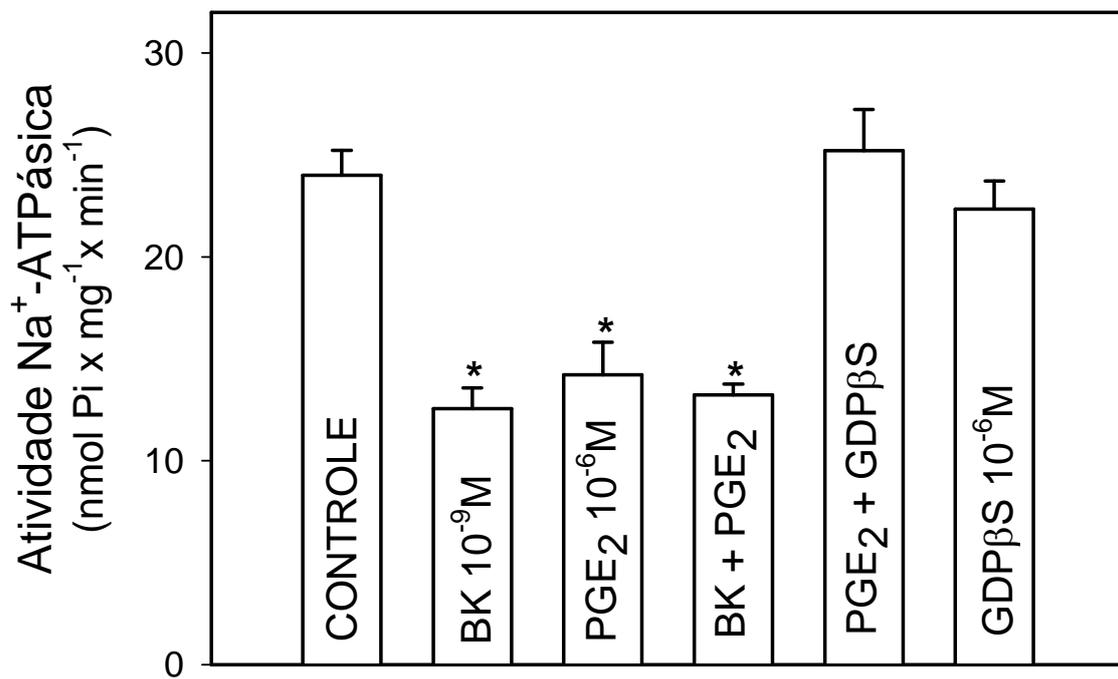


FIGURA 23. Efeito de GDPβs sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica por PGE₂.

A medida da atividade Na⁺-ATPásica foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 20 minutos. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=7, p ≤ 0,05).

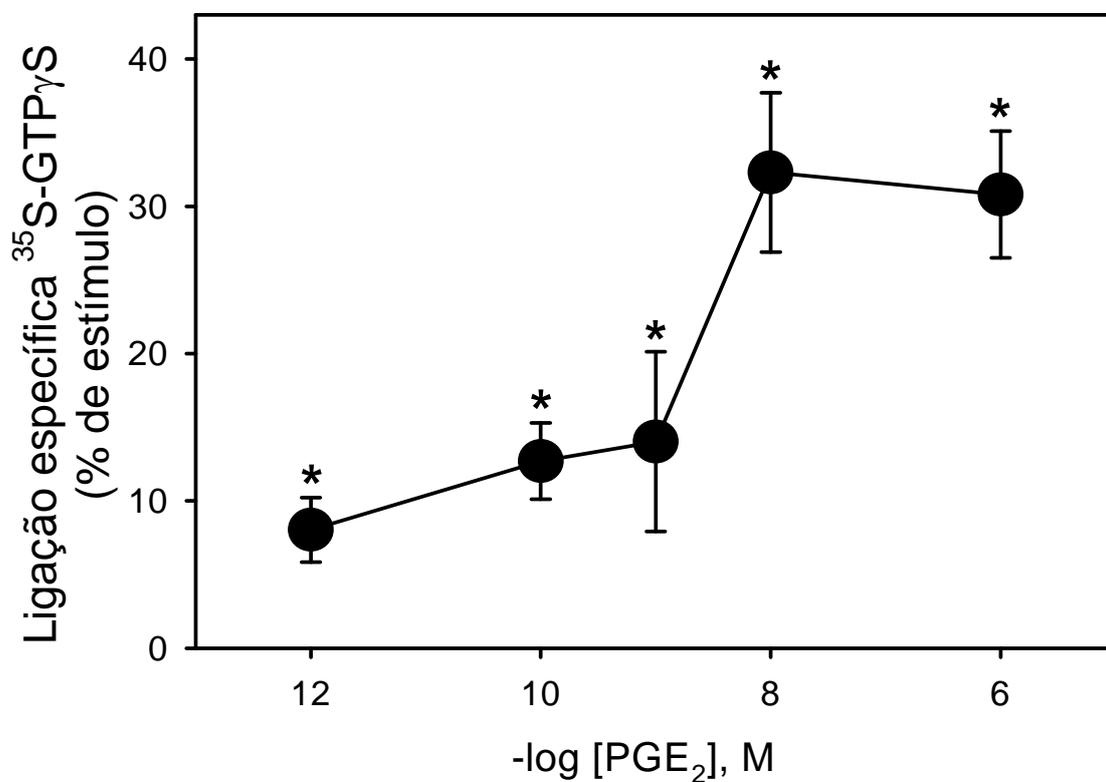


FIGURA 24: Efeito de PGE₂ na ligação de [³⁵S]GTP_γS à MBL.

A medida da atividade de proteína G foi realizada conforme descrito em "Materiais e Métodos". A porcentagem foi calculada em relação a ligação total a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do [³⁵S]GTP_γS incorporado à MBL na presença de PGE₂ (10⁻¹²M a 10⁻⁶M). Os resultados estão expressos como média percentual ± EP (n=4).

*Estatisticamente significativo quando comparado com o controle

proteína G envolvida nesse processo foi investigada pela adição de toxina da cólera (CTX), ativador de proteína Gs. A adição de CTX 10^{-9} M ativou a Na^+ -ATPase, contudo na presença de PGE_2 ou BK, CTX deixou de ativar a enzima de maneira similar e não aditiva (FIGURA 25). Resultado semelhante foi obtido na presença de forskolina (FSK), um ativador da adenilato ciclase (FIGURA 26).

Na presença de inibidor de PKA (10^{-8} M) (FIGURA 27) ocorre reversão do efeito inibitório mediado tanto por BK quanto por PGE_2 sobre a atividade Na^+ -ATPásica. A adição de inibidor de PKA sozinho não interferiu na atividade enzimática. O próximo passo foi medir a atividade de PKA modulada por BK. Com esta finalidade foi realizado o curso temporal (5, 10, 20 e 30 minutos) do efeito de BK sobre a atividade da PKA (FIGURA 28). BK aumentou a atividade de PKA em 260% sendo o efeito máximo observado em 20 minutos de reação. Após este tempo este estímulo começa a decair, sendo que em 30 minutos ainda observa-se um estímulo de 60%. Este efeito foi semelhante ao observado para $\text{AMPc } 10^{-8}$ M.

Portanto, PGE_2 através da ativação de receptor metabotrópico acoplado a proteína Gs, ativa a via AMPc/PKA mediando o efeito inibitório de BK sobre a atividade da Na^+ -ATPase.

4.6 Modulação de PLA_2 por PGE_2

A próxima etapa foi investigar uma possível retroalimentação positiva entre PGE_2 e iPLA_2 , uma vez que já foi demonstrado que este prostanóide pode modular as enzimas anteriores à sua produção, como a COX e a própria PLA_2 (VICHAI *et al.*, 2005; LEMIEUX *et al.*, 2003). A FIGURA 29 ilustra o curso temporal do efeito de PGE_2 sobre a atividade da PLA_2 nos tempos entre 1 e 30 minutos. PGE_2 foi capaz de estimular a atividade de iPLA_2 em 110% sendo o efeito máximo em 10 minutos de

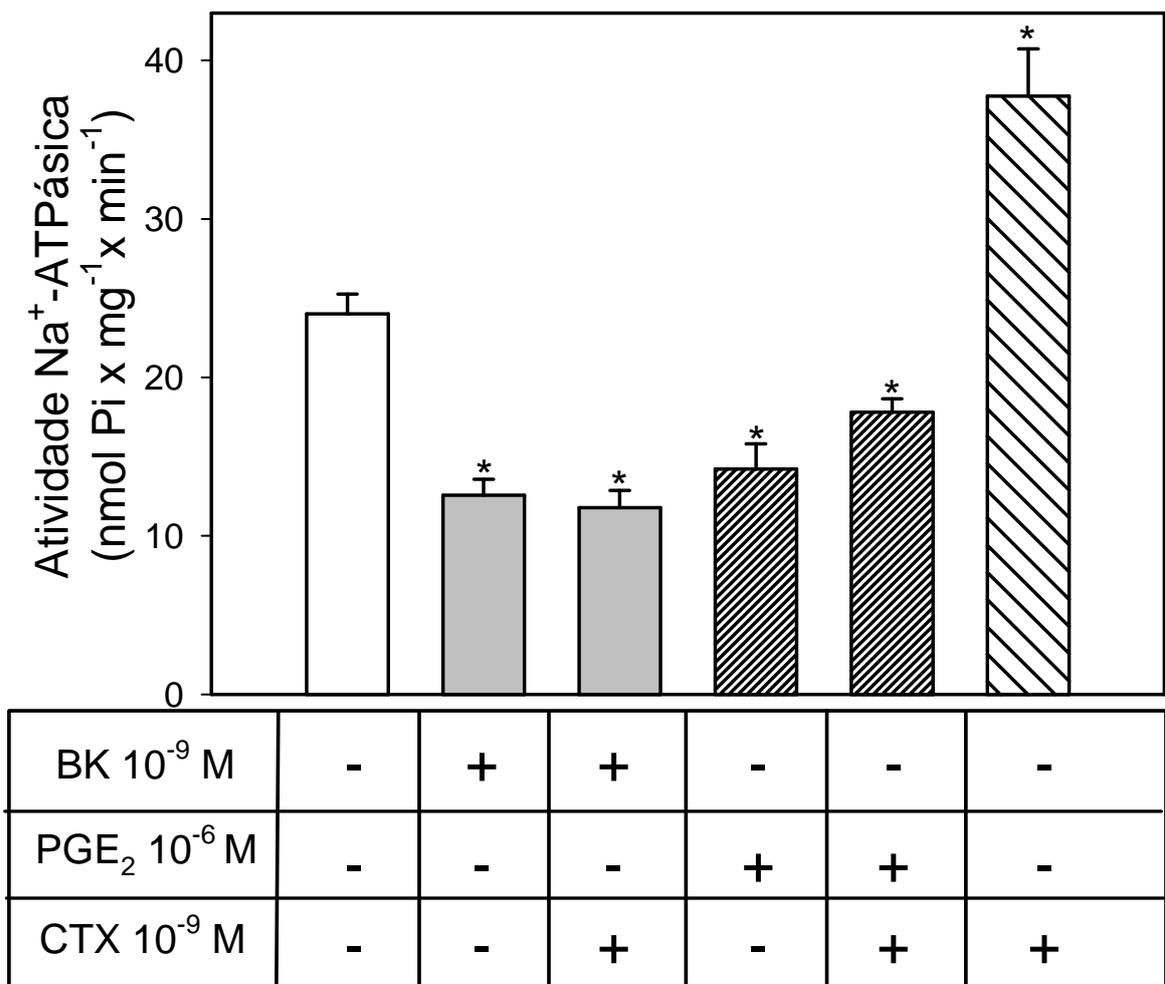


FIGURA 25: Efeito de CTX sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica por BK ou PGE₂.

A medida da atividade Na⁺-ATPásica foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 20 minutos. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=9, p ≤ 0,05).

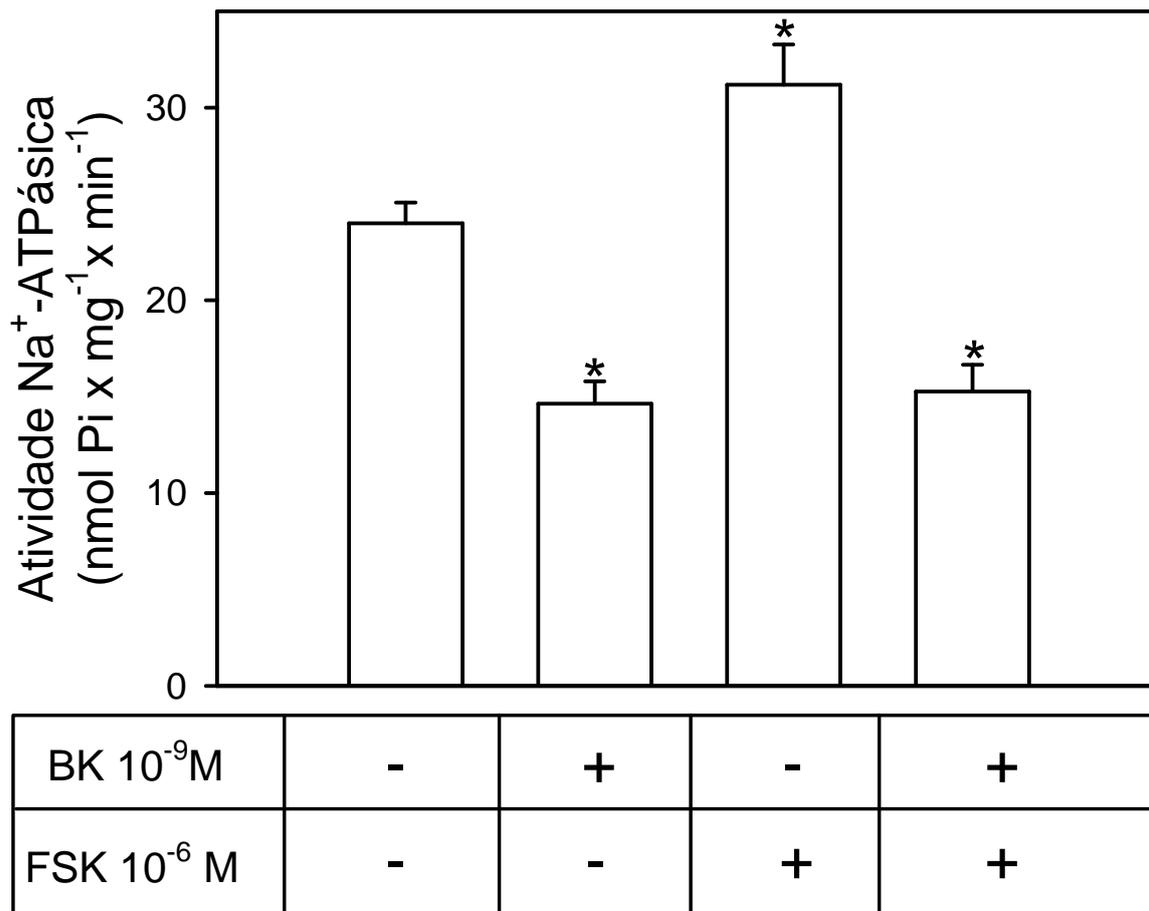
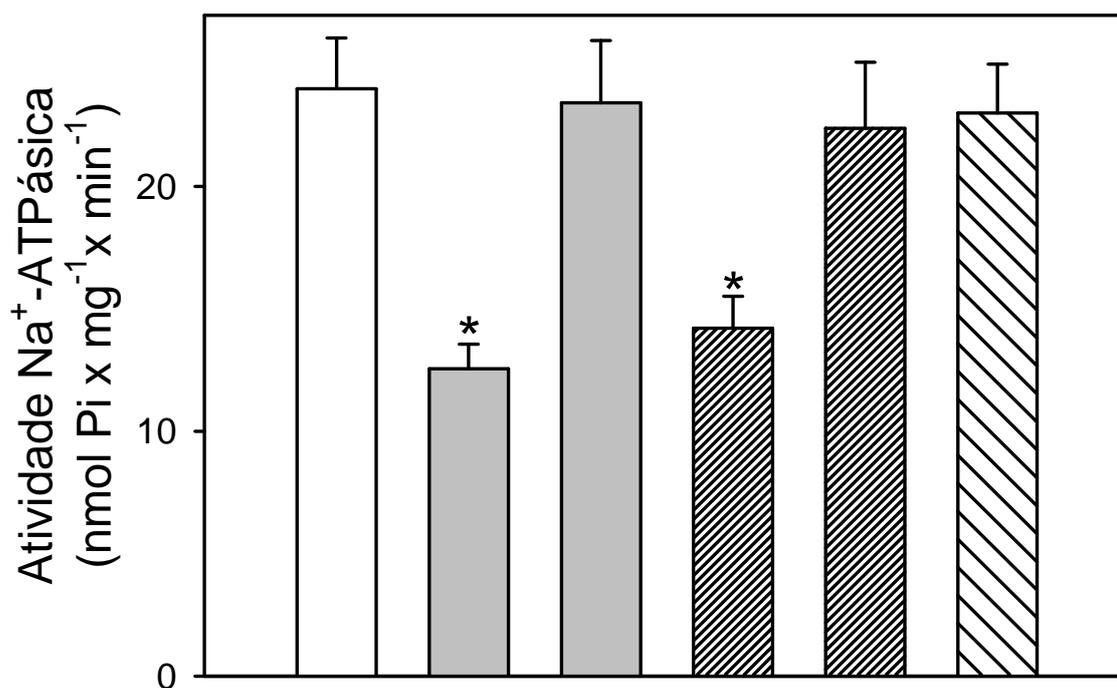


FIGURA 26: Efeito de FSK sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica por BK.

A medida da atividade Na⁺-ATPásica foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 20 minutos. Os resultados estão expressos como média \pm EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=5, $p \leq 0,05$).



BK 10 ⁻⁹ M	-	+	+	-	-	-
PGE ₂ 10 ⁻⁶ M	-	-	-	+	+	-
iPKA 10 ⁻⁸ M	-	-	+	-	+	+

FIGURA 27: Efeito do inibidor de PKA sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica por BK ou PGE₂.

A medida da atividade Na⁺-ATPásica foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. Tempo de reação: 20 minutos. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=7, p ≤ 0,05).

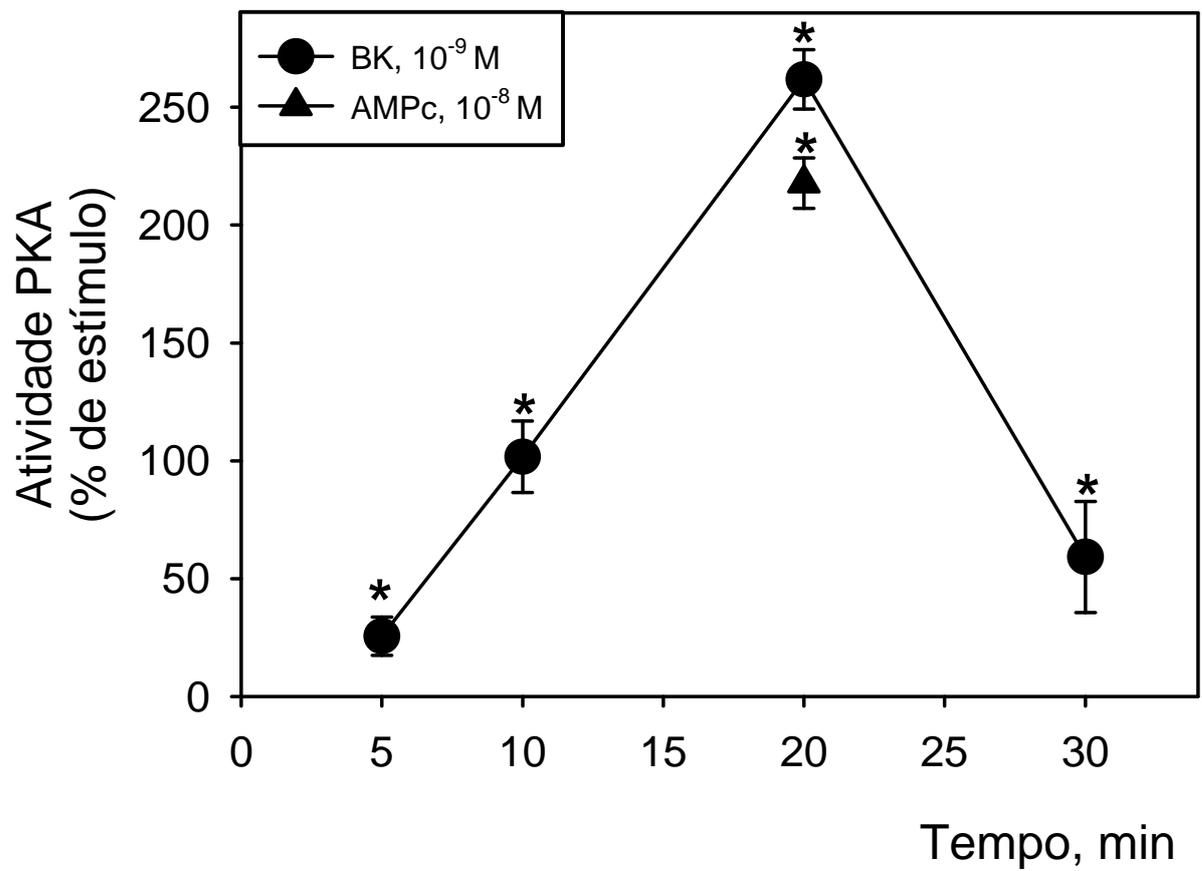


FIGURA 28: Curso temporal do efeito de BK sobre a atividade de PKA.

A medida da atividade de PKA foi realizada como descrita em "Materiais e Métodos". A porcentagem foi calculada em relação ao controle e os resultados estão expressos como média \pm EP. Valor absoluto do controle: $0,4134 \pm 0,04$ pmolEP/mgxmin
 *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=10, $p \leq 0,05$).

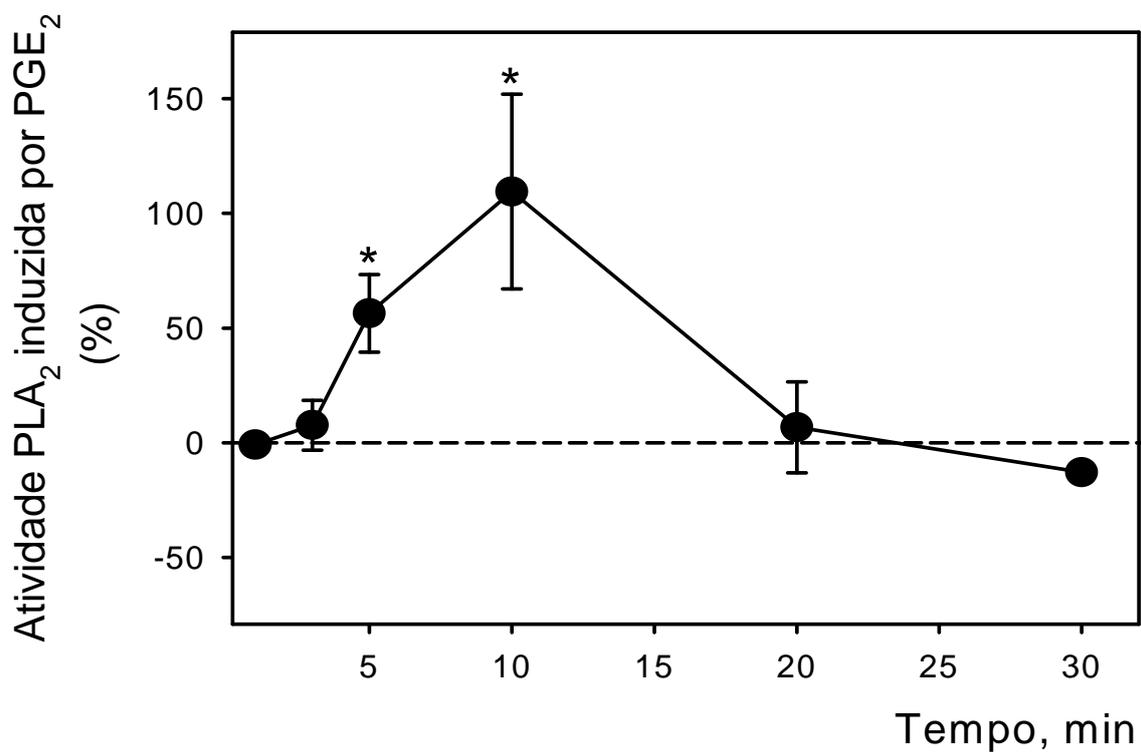


FIGURA 29: Curso temporal do efeito de PGE₂ sobre a atividade de PLA₂.

A medida da atividade de PLA₂ foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do (¹⁴C)ácido palmítico gerado a partir da ação da PLA₂. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=6, p ≤ 0,05).

reação. Nos tempos de 20 e 30 minutos a atividade retornou aos níveis do controle. Com o objetivo de confirmar que a PLA₂ envolvida neste efeito é uma iPLA₂, assim como foi visto no efeito de BK, foram realizados experimentos na presença de inibidores específicos desta isoforma, PACOCF₃ ou BEL. Estes compostos promoveram a reversão do efeito estimulatório da PGE₂ sobre a atividade de PLA₂ (FIGURA 30).

Com a intenção de verificar se a via AMPc/PKA também está envolvida no efeito de retroalimentação positiva de PGE₂, a atividade de PLA₂ foi medida na presença dos ativadores desta via de sinalização. No tempo de 10 minutos de reação foi possível observar que o efeito estimulatório de PGE₂ sobre a atividade de PLA₂ é mimetizado na presença dos ativadores da via AMPc/PKA (CTX 10⁻⁹M, FSK 10⁻⁶M, AMPc 10⁻⁸M) (FIGURA 31).

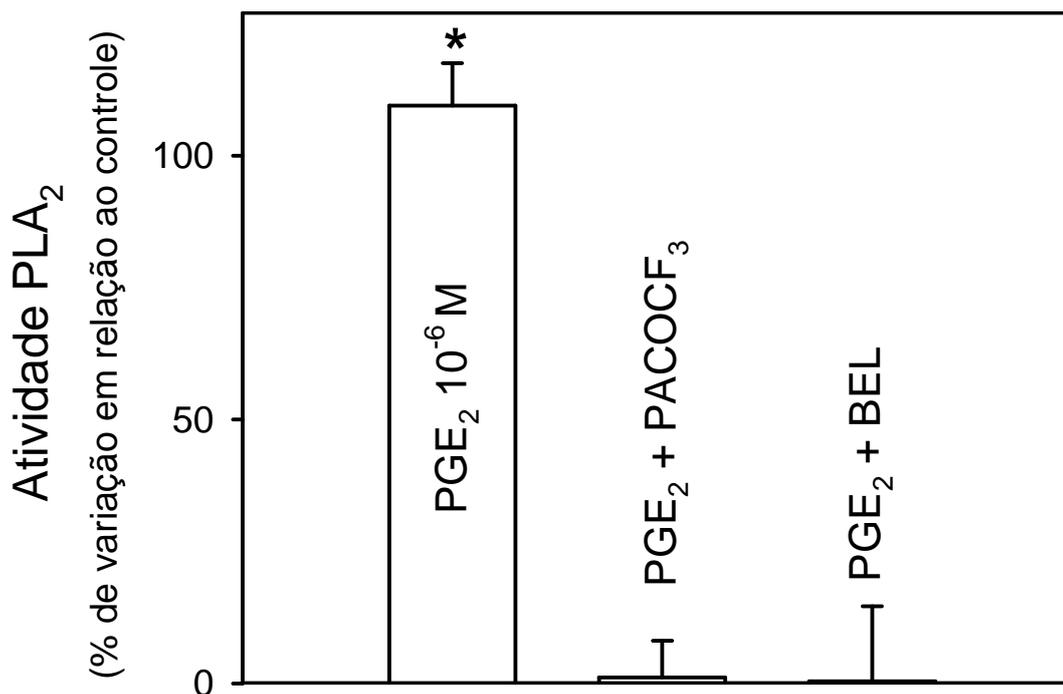


FIGURA 30: Efeito dos inibidores de iPLA₂ (PACOCF₃ 10⁻⁶M e BEL 10⁻⁶M) na modulação da atividade de PLA₂ por PGE₂.

A medida da atividade de PLA₂ foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do (¹⁴C)ácido palmítico gerado a partir da ação da PLA₂. Tempo de reação: 10 minutos. Os resultados estão expressos como média ± EP. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=4, p≤ 0,05).

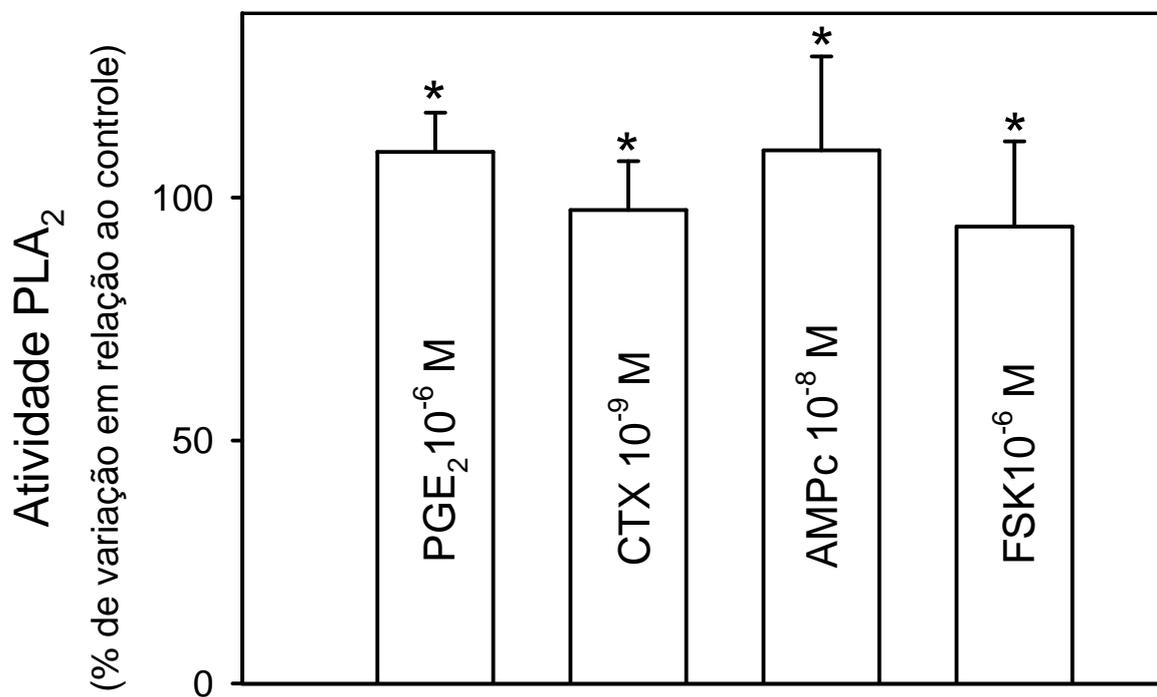


FIGURA 31: Efeito de PGE₂, CTX, AMPc e FSK na modulação da atividade de PLA₂.

A medida da atividade de PLA₂ foi realizada como descrita em “Materiais e Métodos”. A porcentagem foi calculada em relação ao controle a partir dos resultados obtidos em CPM provenientes do (¹⁴C)ácido palmítico gerado a partir da ação da PLA₂. Tempo de reação: 10 minutos. *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (n=4, p≤ 0,05).

5 DISCUSSÃO

O SKK tem um papel importante na regulação da pressão arterial e seus efeitos em parte são mediados por BK, que atua na regulação da resistência vascular periférica e na modulação da excreção renal de sódio, conseqüentemente do volume extracelular (KATORI & MAJIMA, 2006; TORNEL *et al.*, 2000). Nosso grupo tem mostrado que em parte os efeitos de BK na excreção renal de sódio é devido à modulação da reabsorção de sódio no túbulo proximal (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999a, 2003a, 2003b). Nesta tese foram estudados os mecanismos moleculares envolvidos na ação de BK, via receptor B₂, sobre a modulação da atividade Na⁺-ATPásica de túbulo proximal.

Dados prévios demonstraram que BK, assim como outros compostos que regulam a excreção renal de sódio, modula a atividade da Na⁺-ATPase, porém não interfere na atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase em MBL isolada de túbulo proximal (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997, 1999a, 2004; RANGEL *et al.*, 1999). A atividade da Na⁺-ATPase representa 1/10 da atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase (PROVERBIO *et al.*, 1989), o que sugere que esta enzima possa estar envolvida no ajuste fino da reabsorção de Na⁺, enquanto a (Na⁺+K⁺)ATPase seria responsável pela maior parte da reabsorção de Na⁺ no túbulo proximal. Os resultados alcançados nesta tese, juntamente com as observações anteriores do nosso laboratório, indicam que a Na⁺-ATPase está envolvida, pelo menos em parte, no efeito de BK sobre a reabsorção de Na⁺ no túbulo proximal (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999a, 2003a, 2003b).

A possibilidade que o efeito observado de BK, sobre a hidrólise de ATP, seja devido a uma ação sobre a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase pode ser descartado, uma vez que os experimentos foram sempre realizados na ausência de K⁺ e a atividade Na⁺-ATPásica é calculada pela diferença entre os valores de atividade obtidos na

ausência e presença de furosemide 2mM, sempre na presença de 1mM de ouabaína, inibidor específico da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$. Na maioria dos tecidos foi observado que a afinidade da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$ por ouabaína está na faixa de micromolar, contudo algumas preparações como túbulo proximal de rato apresentam afinidade menor (SWEADNER, 1989; BLANCO *et al.*, 1995). A sensibilidade da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$ para ouabaína depende da isoforma expressa em cada célula e é, também, tecido específica. Contudo, 1mM de ouabaína inibe completamente todas as isoformas da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$ (AKERA *et al.*, 1985; BLANCO *et al.*, 1995).

O furosemide é bem caracterizado por inibir o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$. Entretanto, o efeito observado do furosemide neste trabalho não pode ser associado com a inibição deste co-transportador porque este: 1) não é capaz de hidrolisar ATP; 2) não está presente no túbulo proximal; 3) na forma fosforilada apresenta peso molecular de 170 kDa, e o peso molecular do intermediário fosforilado da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ é 100 kDa (DE SOUZA *et al.*, 2007). Além disso, o possível efeito do furosemide em outras ATPases também pode ser descartado porque este inibidor não interfere nas atividades enzimáticas das $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$, $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ e Ecto-ATPase (CARUSO-NEVES *et al.*, 2002, SOUZA-LEITE *et al.*, 2007) e já foi demonstrado que o furosemide inibe a reabsorção de Na^+ em túbulos proximais (MALNIC *et al.*, 1969). Desta forma, é possível postular que este inibidor, na preparação usada neste trabalho, desempenha um papel como “inibidor específico” da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$.

Apesar do SKK estar localizado principalmente nos segmentos mais distais do néfron, BK têm um papel regulatório como substância parácrina e pode afetar a excreção de sódio por um efeito direto no transporte deste íon (HÉBERT *et al.*, 2005). Alguns trabalhos relatam o papel de BK na reabsorção de Na^+ no túbulo

proximal (ADER *et al.*, 1992; SHIMAMOTO & IIMURA, 1989), assim como a presença de receptor B₂ neste segmento (FIGUEROA *et al.*, 1995; MARIN-CASTAÑO *et al.*, 1996). Contudo, a via de sinalização celular envolvida na modulação da reabsorção de Na⁺ no túbulo proximal por BK ainda não foi elucidada.

Os resultados obtidos nesta tese mostram que BK, via receptor B₂, exerce um efeito bifásico tempo-dependente sobre a atividade da Na⁺-ATPase. Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que BK pode desencadear efeitos opostos dependendo do receptor com o qual interaja. Foi mostrado que BK através do receptor B₁ aumenta a atividade da Na⁺-ATPase, enquanto via B₂ promove inibição (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999a). Neste artigo foi proposto que o efeito estimulatório de BK seria mediado via receptor B₁, uma vez que na presença de antagonista do receptor B₂, BK estimula a atividade Na⁺-ATPásica em MBL. Também foi observado que DABK, agonista de B₁, estimula a atividade enzimática nesta preparação. No presente estudo pode-se descartar o possível envolvimento do receptor B₁ na fase estimulatória do efeito de BK. Uma vez que DALBK, antagonista específico de receptor B₁, foi utilizado em todos os experimentos, abolindo o estímulo da atividade enzimática mediado por BK. Além disso, a concentração de BK utilizada é compatível com o K_d deste peptídeo para o receptor B₂. BACHVAROV *et al.*, em 1995, observaram que o K_d de BK para o receptor B₂ expresso em células COS-1 é 2,1x10⁻⁹M. Nesta tese também foi observado que HOE140, antagonista específico de receptor B₂, aboliu tanto o efeito inibitório quanto o estimulatório de BK sobre a atividade da Na⁺-ATPase. A presença deste receptor já foi mostrada em tecido renal através de experimentos utilizando radioligante HOE 140, onde foi possível identificar o receptor B₂ em rim de ratos, inclusive em túbulo proximal (DEAN *et al.*, 1997, 1999)

É interessante ressaltar que o efeito bifásico de BK, via receptor B₂, demonstrado nesta tese, representa um importante mecanismo de ajuste fino da reabsorção de Na⁺ no túbulo proximal. Neste caso um mesmo receptor é acoplado a vias opostas e interdependentes onde dependendo do tempo BK teria efeito oposto. Este mecanismo representaria um alça independente da expressão de receptores, degradação de BK e interação com outra alça hormonal como o sistema renina-angiotensina.

Em trabalhos anteriores nosso grupo mostrou a presença da isoforma PI-PLCβ em MBL de túbulo proximal através do uso de anticorpo monoclonal (RANGEL *et al.*, 2005) e que a ativação da via PI-PLCβ/PKC, estimulada por diferentes agonistas, leva a um aumento da atividade da Na⁺-ATPase (LARA *et al.*, 2008; CARUSO-NEVES *et al.*, 2003b). Agora demonstramos que a PI-PLCβ está envolvida na fase estimulatória de BK sobre a Na⁺-ATPase, uma vez que 1) o efeito estimulatório de BK é revertido pelo inibidor específico U73122; 2) BK modula a atividade da PI-PLCβ de maneira tempo dependente, promovendo estímulo máximo em tempos de 15 segundos de reação; 3) a ativação desta fosfolipase é necessária para que ocorra o estímulo da iPLA₂ por BK.

Como a preparação utilizada é de MBL isolada de túbulo proximal, o papel de IP₃ na mobilização de Ca²⁺ intracelular não pode ser observado. Por outro lado, os efeitos de DAG são associados à ativação de PKC (BROSE & ROSENMUND, 2002). Em muitos casos a ativação de PKC envolve sua translocação do citosol para a membrana. No nosso sistema não é possível verificar este tipo de ativação, sendo necessária a presença de PKC associada à membrana. CHACKRAVARTHY *et al* em 1994 mostraram que membranas de diferentes tipos celulares apresentam constitutivamente PKC passível de estímulo por sinais que produzem DAG. Em

trabalhos anteriores de nosso laboratório, foi demonstrada a presença de PKC associada a MBL, ativada por forbol ester e insensível a Ca^{2+} (RANGEL *et al.*, 2001). De maneira similar, usando frações de membrana de miócitos ventriculares, STEER *et al.*, em 2002, mostraram que PMA aumenta a atividade de $iPLA_2$ através de ativação de PKC residente de membrana. Nesta tese foi observado que a inibição tanto de PI-PLC β , com U73122, quanto de PKC, com calfofina C, aboliu a ativação de $iPLA_2$ induzida por BK. Além disso, PMA (forbol ester), um ativador de PKC, aumenta a atividade de $iPLA_2$ de maneira similar a BK.

Como mencionado na Introdução existem três tipos de PKC (NEWTON, 1995; WAY *et al.*, 2000): 1) convencionais, ativadas por Ca^{2+} e DAG; 2) novas, ativadas por DAG e independentes de Ca^{2+} e 3) atípicas, independentes de Ca^{2+} e DAG, e ativadas por outros sinalizadores. As seguintes observações indicam o envolvimento de uma PKC do tipo nova no efeito de BK sobre a Na^+ -ATPase: 1) em nosso meio reacional não foi adicionado cálcio e foi adicionado EGTA, o que permite descartar a participação de uma PKC convencional; 2) éster de forbol e DAG estimulam a PKC presente em nossa preparação o que permite descartar a participação de uma PKC atípica.

A ativação de PLA_2 pode depender da sua translocação para a membrana, mas também existem isoformas de PLA_2 com cinéticas de ativação distintas, localizadas na membrana plasmática em estado não ativado (SIX & DENNIS, 2000). A preparação utilizada nesta tese impede uma possível translocação da PLA_2 após sua ativação e, além disso, todos os experimentos foram realizados na ausência de Ca^{2+} e na presença de EGTA 1mM. Desta forma, o envolvimento de uma $cPLA_2$ (por exemplo $cPLA_2$ (α e β) do grupo IV) pode ser descartado, uma vez que sua ativação envolve sua translocação dependente de Ca^{2+} para a membrana plasmática (KUDO

& MURAKAMI, 2002, DAS *et al.*, 2003). Por outro lado, a isoforma cPLA₂ γ perde seu domínio C2 (independente de Ca²⁺) e pode estar associada constitutivamente a membrana celular através de domínio específico (SIX & DENNIS, 2000.). O peso molecular da cPLA₂ γ é 61 kDa (SIX & DENNIS, 2000), e no presente trabalho foi demonstrada a presença em MBL de somente uma banda em aproximadamente 85 kDa, utilizando anticorpo policlonal anti-iPLA₂. Além disso, a observação que PACOCF₃ e BEL abolem a atividade da PLA₂, associada a MBL e estimulada por BK, indica a presença da iPLA₂ do grupo VI em MBL de túbulo proximal. Esta hipótese é fortalecida por trabalhos que demonstram a presença, em córtex renal, de uma iPLA₂ do grupo VI, sensível a BEL, com peso molecular aproximado de 85kDa (MA *et al.*, 1999; TAY & MELENDEZ, 2004; CUMMINGS *et al.*, 2002; LARSSON FORSELL *et al.*, 1998). Porém, o envolvimento de uma cPLA₂ γ não pode ser completamente descartado, sendo necessários futuros experimentos para esclarecer esta questão.

A ativação de PLA₂ no túbulo proximal pode levar a um aumento ou mesmo a uma diminuição da reabsorção de sódio, dependendo do agonista e da distribuição celular da PLA₂ (LOPES *et al.*, 2004; BECKER *et al.*, 1997). Já foi observado que BK modula a atividade de PLA₂ dependente de Ca²⁺ em túbulos proximais isolados de coelho, BK estimula a atividade de cPLA₂, mas inibe a atividade de cPLA₂ associada à membrana plasmática (HARWALKAR *et al.*, 1998). Por outro lado, o papel da iPLA₂ ainda não é completamente conhecido, bem como os mecanismos moleculares envolvidos na sua ativação. Foi proposto que a iPLA₂ do grupo VI esteja envolvida no “turnover” de fosfolipídeos, crescimento celular e apoptose (BALSINDE *et al.*, 2006; WISTEAD *et al.*, 2000). Outros dados demonstram que iPLA₂, localizada em retículo endoplasmático de células de túbulos proximais, desempenha um papel

importante na proteção contra a peroxidação lipídica (CUMMINGS *et al.*, 2002). Contudo, o papel desta isoforma na reabsorção de sódio no túbulo proximal, assim como seu papel na modulação dos diferentes transportadores de sódio é completamente desconhecido. Nesta tese foi demonstrado que BK induz a ativação de uma iPLA₂ associada a MBL. Esses dados estão de acordo com a observação que BK, via receptor B₂, inibe a reabsorção de Na⁺ no túbulo proximal, mostrando uma correlação entre a excreção de sódio e a ativação de iPLA₂. Esses resultados permitem novas possibilidades de entendimento do papel desta enzima na excreção renal de sódio, assim como na regulação da pressão arterial.

Os mecanismos moleculares envolvidos na ativação da iPLA₂ são pouco conhecidos. Os resultados desta tese mostram que PKC é o elo de ligação entre a ativação de PI-PLC β e iPLA₂ por BK. Tem sido proposto que as fosfolipases PI-PLC β e PLA₂ sejam capazes de modular-se mutuamente, promovendo a regulação de múltiplas vias de sinalização nas membranas celulares (RAO *et al.*, 1996; SANO *et al.*, 2001). SCHWARTZ *et al.*, em 2003, demonstraram que PI-PLC β é regulada pelos produtos de PLA₂, lisofosfatidiletanolamina (LPE) e lisofosfatidilcolina (LPC). Por outro lado, a ativação do receptor B₂ por BK, em células mesangiais de ratos, está associada à ativação seqüencial de PLC e PLA₂ (BASCANDS *et al.*, 1994; CASTANO *et al.*, 1998). Além disso, várias fosfolipases podem estar envolvidas na produção de metabólitos gerados a partir da ação de PLA₂, como por exemplo na produção de prostaglandinas. A indução da fosfolipase depende do tipo de célula envolvida, do estímulo e do estado de ativação da célula antes da indução (LENNARTZ, 1999; MURAKAMI *et al.*, 1998; LIU & McHOWAT, 1998; BALSINDE & DENNIS 1996; DuBOURDIEU & MORGAN, 1990)

Já foi observado que BK ativa PLA₂ via PKC (HIGAKI *et al.*, 1999). LAL *et al.* (1997,1998) mostraram que a ativação de PLA₂ por BK é dependente de PKC e da ativação seqüencial de tirosinas cinases através da cascata de sinalização das MAPKs. Por outro lado, alguns autores não observaram o estímulo de PLA₂ por PKC e sim por outras cinases (LEVI *et al.*, 2007; XING *et al.*, 1997,1999). Em nosso modelo experimental, a adição de PMA aumenta a atividade da PLA₂. Esses dados podem indicar diferenças na sensibilidade de PLA₂ a fosforilação por PKC ou até mesmo devido à presença de diferentes isoformas de PKC em diferentes tipos celulares relacionadas a vias de sinalização distintas.

Entretanto, ainda uma questão precisa ser respondida: será que PKC medeia a ativação de iPLA₂ através de fosforilação direta ou esse efeito é mediado por outra proteína? Diferentes estudos sugerem o envolvimento de fosforilação na regulação desta enzima (TAY & MELENDEZ, 2004; YELLATURU & RAO, 2003; TANAKA *et al.*, 2000; AKIBA *et al.*, 1999, 2002; HEFNER *et al.*, 2000). Sabe-se que a região N-terminal da iPLA₂ é rica em resíduos de serina e treonina, que podem ser fosforilados por proteínas cinases (LARSSON *et al.*, 1998; YELLATURU & RAO, 2003; MURAKAMI & KUDO, 2004; TAY & MELENDEZ, 2004). Dados anteriores de nosso laboratório constataram a presença de PKC constitutiva capaz de fosforilar proteínas de membrana plasmática após ativação por DABK ou angiotensina II e PMA (CARUSO-NEVES *et al.*, 2003b, RANGEL *et al.*, 2001). Além disso, outros dados (DE SOUZA, 2006) mostraram que o ácido fosfatídico (LPA) promove aumento na atividade da Na⁺-ATPase de maneira dose dependente. O LPA é um metabólito proveniente da ação de PLA₂ sobre o ácido fosfatídico (PA). Neste recente trabalho foi mostrado que o efeito de LPA é dependente da ativação de PKC, uma vez que é revertido na presença de calfofina C. Como observado

anteriormente, o efeito máximo de ativação de PKC por BK em MBL ocorre no tempo de 3 minutos e a ativação de PLA₂ por BK já é observada neste tempo de reação, sendo máximo o efeito em 5 minutos (LÍBANO-SOARES *et al.*, 2008). Este perfil temporal poderia indicar que ocorrem eventos de fosforilação protéica na ativação de iPLA₂ por PKC.

Já foi descrita a participação de uma proteína, que possui homologia com as subunidades β de proteína G, na regulação da atividade de PLA₂ (RIBARDO *et al.*, 2001; PEITSCH *et al.*, 1993; BOMALASKI *et al.*, 1989). Esta proteína ativadora de PLA₂, denominada PLAA, já foi clonada, porém pouco é sabido sobre o papel desta proteína regulatória no controle da atividade da PLA₂. Já foi demonstrado que PLAA tem um papel importante na regulação da formação de eicosanóides, na etapa inicial de formação de AA, por um efeito mediado por PLC, PLD e PLA₂. Neste artigo foi observado aumento nos níveis de PGE₂ e além disso foi mostrado que é necessário que ocorra a fosforilação de PLAA para sua funcionalidade (RIBARDO *et al.*, 2001)

Desta forma, em nosso sistema, BK estaria ativando primeiramente a via PI-PLC β /PKC e a interdependência desta fase estimulatória com a fase inibitória poderia acontecer a partir da fosforilação de PLA₂ através de PKC ou da sua regulação por outras proteínas, como por exemplo PLAA.

Demonstramos que AA inibe a atividade da Na⁺-ATPase, de maneira similar e não aditiva ao efeito de BK, indicando que ambos atuam pela mesma via de sinalização. Já foi demonstrado que AA, de maneira dose dependente, é capaz de inibir a atividade Na⁺-ATPásica de MBL isolada de túbulos proximais (LÍBANO-SOARES *et al.*, 2008). Desta forma, é possível sugerir que o metabólito proveniente da ação de iPLA₂ envolvido no efeito de BK seria o ácido araquidônico.

Em condições basais tanto COX₁ como COX₂ podem ser responsáveis pela biossíntese de prostanóides no rim (QI *et al.*, 2006). Além disso, a fosforilação de PLA₂ e indução de COX₂ pela via de MAPK promove a produção rápida de PGE₂, que por sua vez pode estar envolvida na regulação da expressão gênica do receptor B₂ (SCHMIDLIN *et al.*, 2000). A expressão de COX₂ intrarenal pode estar aumentada em resposta à restrição de sódio, sugerindo que, além do seu papel conhecido nas respostas proliferativas e inflamatórias, essa enzima possa desempenhar um papel importante na regulação da homeostase de sal, volume e pressão arterial (YANG *et al.*, 1998; HARRIS *et al.*, 1994). Nesta tese foram utilizados inibidores não seletivos de COX, indometacina e diclofenaco, assim não é possível estabelecer qual a isoforma participante no efeito inibitório de BK e AA sobre a Na⁺-ATPase. Porém, é possível propor que a COX₂ esteja envolvida no efeito de BK e AA. Uma vez que já foi descrito que dependendo do estímulo e do tecido envolvidos tem-se duas vias biossintéticas de PGE₂: COX₁-cPGES (PGES citosólica) ou COX₂-mPGES (PGES associada à membrana plasmática) (MURAKAMI & KUDO, 2004; MURAKAMI *et al.*, 2000).

A importância dos prostanóides na função renal, pressão arterial e controle do volume é realçada pelos efeitos deletérios renais dos inibidores da COX (antiinflamatórios não-estereoidais) que, em alguns casos, podem gerar hipertensão, retenção de Na⁺ e edema, sugerindo uma função antihipertensiva e natriurética das prostaglandinas endógenas (BRATER, 1999)

Alguns efeitos fisiológicos conhecidos de BK, e outros metabólitos do SKK, são mediados através da produção de AA e prostaglandinas estimulada por BK. (JENKINS *et al.*, 2003). Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que PGE₂ inibe a atividade Na⁺-ATPásica de MBL de túbulo proximal de maneira dose

dependente e PGE₂ na presença de BK promove efeito inibitório sobre a atividade enzimática de maneira não aditiva (LOPES *et al.*, 2004).

Já foi observado que PGE₂ atua em receptores acoplados tanto a proteína Gi (inibitória) quanto Gs (estimulatória), ambas acopladas a adenilato ciclase (BREYER & BREYER, 2000). Em geral o efeito de PGE₂ no rim tem sido associado a uma ação no ducto coletor. Foram descritos efeitos distintos da PGE₂ no transporte em membrana basolateral: 1) estímulo da reabsorção basal de água; 2) inibição da reabsorção de água estimulada por vasopressina; 3) inibição da reabsorção de sódio (BREYER & BREYER, 2000). Contudo, pouco se sabe sobre a presença desses receptores no túbulo proximal, em particular, na membrana basolateral (HAO & BREYER, 2008). A partir dos dados demonstrados nesta tese é possível sugerir que BK, a partir da ativação de iPLA₂, promove a liberação de AA e este, via COX, estimularia a produção de PGE₂. Como já descrito anteriormente, PGE₂ pode atuar de maneira autócrina ou parácrina. Nesta tese foi observado que PGE₂ modula receptores metabotrópicos, indicando uma possível atuação autócrina de PGE₂ após sua produção por BK. Além disso, foi demonstrado que a via AMPc/PKA é deflagrada por PGE₂, provavelmente via EP₂ e/ou EP₄. O envolvimento de outras vias desencadeadas pelos receptores EP não pode ser descartado, assim como a produção de PGE₂ estimulada por BK necessita de futuros experimentos para ser confirmada.

Nossos resultados indicaram que CTX ou FSK promovem estímulo da atividade Na⁺-ATPásica. Este dado está de acordo com o que já foi mostrado anteriormente, que a ativação da via AMPc/PKA está relacionada à ativação da Na⁺-ATPase (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000b). Esses dados inicialmente podem parecer contraditórios, mas nosso grupo propõe que quando ocorre uma ativação prévia da

Na⁺-ATPase por PKC, a PKA passa a inibir a Na⁺-ATPase (LARA *et al.*, 2002; RANGEL *et al.*, 2002; CARUSO-NEVES *et al.*, 2000a). É possível sugerir que a ativação da Na⁺-ATPase por PKC poderia expor outros sítios de fosforilação por PKA, que estariam envolvidos no efeito inibitório. Este efeito é o contrário do observado quando não se tem a ativação prévia por PKC, ocorrendo o estímulo da Na⁺-ATPase por PKA. Isto explicaria porque CTX e FSK sozinhos estimulam a Na⁺-ATPase mas na presença de BK promovem a inibição enzimática. Na presença de BK ocorreria uma prévia ativação de PKC, em tempos curtos.

Diversos trabalhos na literatura relatam que agentes que promovem aumento nos níveis de AMPc podem aumentar a expressão de PLA₂ (VADAS *et al.*, 1996; KONIECZKOWSKI & SEDOR, 1993; PFEILSCHIFTER *et al.*, 1989, 1991; MÜHL *et al.*, 1991; SCHALKWIJK *et al.*, 1991). Por outro lado, também já foi demonstrado que o aumento nos níveis de AMPc pode inibir a expressão de PLA₂ (VIAL *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que PGE₂ promove retroalimentação positiva sobre a expressão de COX₂ (VICHAI *et al.*, 2005) e também foi demonstrado que a síntese de AA e PGE₂ pode ser estimulada por PMA e, além disso a PGE₂ é capaz de regular a produção de AA, via AMPc/PKA, sugerindo uma regulação autócrina (LEMIEUX *et al.*, 2003). Nossos resultados demonstram que existe uma alça modulatória que pode estar relacionada com a manutenção do efeito inibitório por BK. PGE₂ aumenta a atividade da iPLA₂, possivelmente promovendo uma retroalimentação positiva sobre a sua própria produção. Além disso, agentes que estimulam a via AMPc/PKA (CTX, FSK, AMPc), a mesma via envolvida no efeito de PGE₂ sobre a atividade Na⁺-ATPásica, mimetizam o efeito estimulatório de PGE₂ sobre a atividade de iPLA₂. Esses resultados indicam que PGE₂ ativa a iPLA₂, via

AMPC/PKA, sustentando o efeito inibitório de BK, via B₂, sobre a atividade Na⁺-ATPásica.

Como já abordado anteriormente, a fosforilação de PLA₂ em alguns tipos celulares pode ser acompanhada do aumento da sua atividade, podendo ser mediada por PKC, dependente ou independentemente da ativação de MAPK (LESLIE, 1997; KRAMER *et al.*, 1996; QIU & LESLIE, 1994; BORSCH-HAUBOLD *et al.*, 1995). Por outro lado, a fosforilação de PLA₂ por PKA ou PKG pode levar a sua inibição (MURTHY & MAKHLOUF, 1998), sugerindo que os resíduos fosforilados por PKC sejam distintos dos fosforilados por PKA ou PKG. Nesta tese foi observado que BK promove estímulo máximo da atividade de PKA no tempo de 20 minutos de reação. Condizente com o perfil temporal de modulação da Na⁺-ATPase por BK, via B₂, onde em 20 minutos observa-se o efeito inibitório que é sustentado até tempos posteriores a 30 minutos. Além disso PKA também está envolvida no efeito de retroalimentação positiva de PGE₂ sobre a atividade de iPLA₂. Os resultados aqui apresentados sugerem uma regulação da atividade de iPLA₂ tanto por PKC quanto por PKA. Essas cinases promovem o aumento da atividade da iPLA₂, possivelmente por fosforilação em resíduos específicos.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a modulação da Na⁺-ATPase envolve elementos constitutivos de membrana e pode representar um importante mecanismo de regulação rápida da reabsorção de sódio no túbulo proximal. Demonstramos pela primeira vez o envolvimento de iPLA₂ no transporte de íons, especificamente na reabsorção de Na⁺, bem como a interligação entre as vias deflagradas por BK e PGE₂ em membrana basolateral de túbulo proximal. Podemos concluir que um único

peptídio sinalizador é capaz de ativar diferentes vias de sinalização através do mesmo receptor. É interessante destacar que essas vias são interdependentes e podem levar a produção de autacóides, como PGE_2 , e a integração destes sinais converge em um evento final: a regulação da reabsorção de sódio. Esses resultados abrem novas possibilidades para o entendimento dos mecanismos moleculares desencadeados por BK e PGE_2 na regulação da excreção renal de sódio, bem como o papel dos diversos componentes desta via de sinalização neste processo.

Os resultados obtidos nesta tese demonstraram que: 1) a ativação da via PI-PLC β /PKC está envolvida na fase estimulatória do efeito de BK sobre a atividade Na^+ -ATPásica; 2) a ativação prévia da via PI-PLC β /PKC é necessária para que ocorra a ativação da PLA $_2$; 3) a PLA $_2$ envolvida pertence a família iPLA $_2$ e está associada a membrana basolateral; 4) o efeito inibitório de BK depende de AA e COX; 5) a inibição da Na^+ -ATPase por BK é modulada por PGE_2 , via AMPc/PKA; 6) PGE_2 é capaz de modular a iPLA $_2$, indicando um processo de retroalimentação positiva, também mediado pela via AMPc/PKA, sustentando o efeito final de inibição da reabsorção de sódio no túbulo proximal por BK.

A FIGURA 32 ilustra o modelo proposto para os mecanismos moleculares envolvidos na modulação da atividade Na^+ -ATPásica por bradicinina.

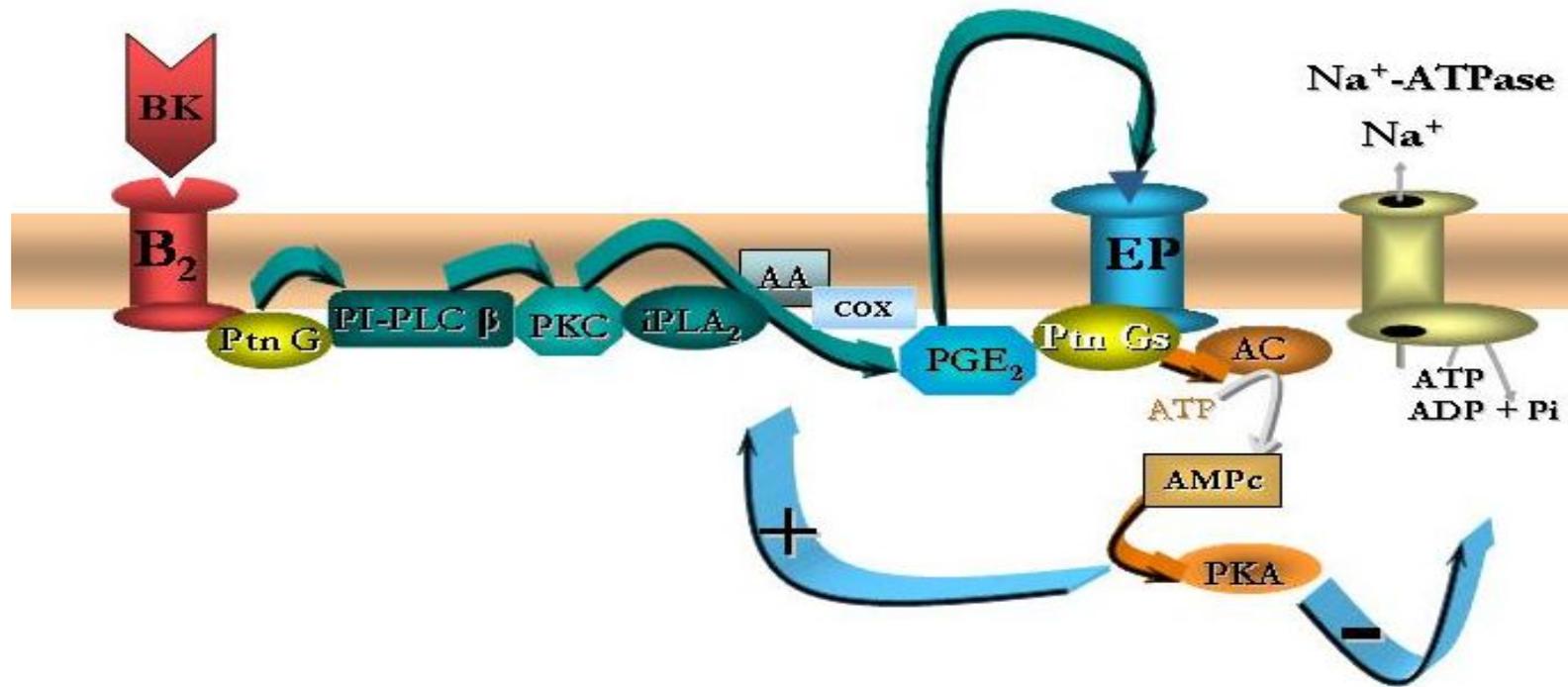


FIGURA 32. Modelo proposto para o mecanismo molecular envolvido na modulação da atividade Na⁺-ATPásica por bradicinina

REFERÊNCIAS

ABASSI, Z.A.; WINAVER, J.; SKORECKI, K.L. Control of extracellular fluid volume. In: BRENNER, B. M. & RECTOR, F. C. The Kidney. 7 ed. USA: W. B. Saunders Company, 2004.

ABELOUS, J.E.; BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 66: 511-512, 1909.

ABRAMOVITZ, M.; ADAM, M.; BOIE, Y.; CARRIÈRE, M.; DENIS, D.; GODBOUT, C.; LAMONTAGNE, S.; ROCHETTE, C.; SAWYER, N.; TREMBLAY, N.M.; BELLEY, M.; GALLANT, M.; DUFRESNE, C.; GAREAU, Y.; RUEL, R.; JUTEAU, H.; LABELLE, M.; OUIMET, N.; METTERS, K.M. The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta*.1483: 285-93, 2000.

ADER, J.L.; PRADDAUDE, F.; TRAN-VAN, T.; EMOND, C.; TACK, I.; REGOLI, D.; GIROLAMI, J.P. Direct effects of bradykinin on glomerular filtration and proximal tubule reabsorption in rat kidney. *Agents Actions Suppl.* 38: 128-33, 1992.

AKERA, T.; NG, Y.C.; SHIEH, I.S.; BERO, E.; BRODY, T.M.; BRASELTON, W.E. Effects of K⁺ on the interaction between cardiac glycosides and Na,K-ATPase. *Eur J Pharmacol.* 111: 147-57, 1985.

AKIBA, S.; OHNO, S.; CHIBA, M.; KUME, K.; HAYAMA, M.; SATO, T. Protein kinase C α -dependent increase in Ca²⁺-independent phospholipase A2 in membranes and arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D1 cells. *Biochem Pharmacol.* 63: 1969-77, 2002.

AKIBA, S.; MIZUNAGA, S.; KUME, K.; HAYAMA, M.; SATO, T. Involvement of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 in protein kinase C-dependent arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D1 cells. *J Biol Chem.* 274: 19906-12, 1999.

ARDAILLOU, N.; PLACIER, S.; ZHAO, J.; BAUDOUIN, B.; ARDAILLOU, R. Characterization of B2-bradykinin receptors in rabbit principal cells of the collecting duct. *Exp. Nephrol.* 6: 534-541, 1998.

ARENSTEIN, I.R., CARUSO-NEVES, C., ONUCHIC, L.F.; LOPES, A.G. Mechanisms of cell volume regulation in the proximal segment of the Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*. *J. Membr. Biol.* 146: 47-57, 1995.

ALONSO, M.A.; MILLÁN, J. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci.* 114: 3957-65, 2001.

AUSTIN, S.C.; FUNK, C.D. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 58: 23-58, 1999.

BACHVAROV, D.R.; SAINT-JACQUES, E.; LARRIVÉE, J.F.; LEVESQUE, L.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 275: 1623-30, 1995.

BAE, S.W.; KIM, H.S.; CHA, Y.N.; PARK, Y.S.; JO, S.A.; JO, I. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 981-987, 2003.

BALSINDE, J.; BALBOA, M.A. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells, *Cell. Signal.* 17: 1052–1062, 2005.

BALSINDE, J.; DENNIS, E.A. Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem.* 271:6758-65, 1996.

BALSINDE, J.; DENNIS, A.E. Function and Inhibition of Intracellular Calcium-independent Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 272: 16069-16072, 1997.

BALSINDE, J.; PÉREZ, R.; BALBOA, M.A. Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 1344-50, 2006.

BASCANDS, J.L.; PECHER, C.; ROUAUD, S.; EMOND, C.; TACK, J.L.; BASTIE, M.J.; BURCH, R.; REGOLI, D.; GIROLAMI, J.P. Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol.* 264: F548-56, 1993.

BASCANDS, J.L.; PECHER, C.; BOMPART, G.; RAKOTOARIVONY, J.; TACK, J.L.; GIROLAMI, J.P. Bradykinin-induced in vitro contraction of rat mesangial cells via a B2 receptor type. *Am. J. Physiol.* 267: F871-878, 1994.

BECKER, B.N.; CHENG, H.F.; HARRIS, R.C. Apical ANG II-stimulated PLA2 activity and Na⁺ flux: a potential role for Ca²⁺-independent PLA2. *Am J Physiol.* 273: F554-62, 1997.

BERTUCCIO, C.A.; ARRIZURIETA, E.E.; IBARRA, F.R.; MARTÍN, R.S. Mechanisms of PKC-dependent Na⁺ K⁺ ATPase phosphorylation in the rat kidney with chronic renal failure. *Ren Fail.* 29: 13-22, 2007.

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 44: 1-80, 1992.

BIE, P.; WAMBERG, S.; KJOLBY, M. Volume natriuresis vs. pressure natriuresis. *Acta Physiol Scand* 181: 495–503, 2004.

BIOLLAZ, J.; WAEBER, B.; DIEZI, J.; BURNIER, M.; BRUNNER, H.R. Lithium infusion to study sodium handling in unanesthetized hypertensive rats. *Hypertension* 8: 117-21, 1986.

BLAIS, C. JR; MARC-AURÈLE, J.; SIMMONS, W.H.; LOUTE, G.; THIBAUT, P.; SKIDGEL, R.A.; ADAM, A. Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* 20: 421-30, 1999.

BLAIS, C. JR; MARCEAU, F.; ROULEAU, J.L.; ADAM, A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* 21: 1903-40, 2000.

BLANCO, G.; KOSTER, J.C.; SÁNCHEZ, G.; MERCER, R.W. Kinetic properties of the alpha 2 beta 1 and alpha 2 beta 2 isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 34 :319-25, 1995.

BLANCO, G.; MERCER, R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275: F633-F650, 1998.

BLAUKAT, A.; ALLA, S.A.; LOHSE, M.J.; MÜLLER-ESTERL, W. Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem.* 271: 32366-74, 1996.

BLAUKAT, A.; BARAC, A.; CROSS, M.J.; OFFERMANN, S.; DIKIC, I. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of G α_q and G α_i signals. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6837-6848, 2000.

BOUMENDIL-PODEVIN, E.F.; PODEVIN, R.A. Prostaglandin E2 transport in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 812: 91-7, 1985.

BOMALASKI, J.S.; BAKER, D.; RESURRECCION, N.V.; CLARK, M.A. Rheumatoid arthritis synovial fluid phospholipase A2 activating protein (PLAP) stimulates human neutrophil degranulation and superoxide ion production. *Agents Actions* 27: 425-7, 1989.

BONVALET, J.P.; PRADELLES, P.; FARMAN, N. Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *Am J Physiol* 253: F377-87, 1987.

BORSCH-HAUBOLD, A.G.; KRAMER, R.M.; WATSON, S.P. Cytosolic phospholipase A2 is phosphorylated in collagen- and thrombin-stimulated human platelets independent of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem* 270: 25885-25892, 1995.

BOS, C.L.; RICHEL, D.J.; RITSEMA, T.; PEPPELENBOSCH, M.P.; VERSTEEG, H.H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1187-205, 2004.

BOUMENDIL-POVEDIN, E.F.; PODEVIN, R.A. Isolation of basolateral and brush-border membranes from the rabbit kidney cortex. Vesicle integrity and membrane sidedness of basolateral fraction. *Biochem. Biophys. Acta*, 728: 39-49, 1983.

BRATER, D.C. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: focus on cyclooxygenase-2-selective inhibition. *Am J Med* 107: 65S-70S; discussion 70S-71S, 1999.

BREYER, M.D.; BREYER, R.M. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F12-23, 2000.

BREYER, M.D.; BREYER, R.M. G Protein-Coupled Prostanoid Receptors and the Kidney. *Annu. Rev. Physiol* 63: 579-605, 2001.

BREYER, M.D.; HARRIS, R.C. Cyclooxygenase 2 and the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10: 89-98, 2001. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F1-11, 2001.

BROSE, N.; ROSENMUND, C. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci.* 115: 4399-411, 2002.

BROWN, W.J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic.* 4: 214-221, 2003.

CAMICI, M. Renal glomerular permselectivity and vascular endothelium. *Biomed Pharmacother.* 59: 30-7, 2005.

CAMPBELL, D.J. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz J Med Biol Res.* 33: 665-77, 2000.

CAMPBELL, D.J. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28: 1060-5, 2001.

CARUSO-NEVES, C.; FRANCISCO-PEDRO, L.G.; SOUZA, L.P.; CHAGAS, C.; LOPES, A.G. Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 1329: 336-344, 1997.

CARUSO-NEVES, C.; MEYER-FERNANDES, J.R.; SAAD-NEHME, J.; PROVERBIO, F.; MARÍN, R.; LOPES, A.G., Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comp. Bioche. Physiol.* 119: 807-811, 1998a.

CARUSO-NEVES, C.; EINICKER-LAMAS, M.; CHAGAS, C.; OLIVEIRA, M.M.; VIEYRA, A.; LOPES, A.G. Trypanossoma cruzi epimastigotes express the ouabain- and vanadate-sensitive (Na⁺+K⁺)ATPase activity. *Z. Naturforsch.* 53: 1049-1054, 1998b.

CARUSO-NEVES, C.; SIQUEIRA, A.S.E.; ISO-COHEN, G.; LOPES, A.G. Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 1431: 483-491, 1999a.

CARUSO-NEVES, C.; EINICKER-LAMAS, M.; CHAGAS, C.; OLIVEIRA, M.M.; VIEYRA, A.; LOPES, A.G. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in Trypanossoma cruzi epimastigotes. *Z. Naturforsch.* 54: 100-104, 1999b.

CARUSO-NEVES, C.; LARA, L.S.; RANGEL, L.B.; GROSSI, A.L.; LOPES, A.G. Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim Biophys Acta.* 1467: 189-97, 2000a

CARUSO-NEVES, C.; RANGEL, L.B.A.; VIVES, D.; VIEYRA, A.; COKA-GUEVARA, S.; LOPES, A.G. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity is an effector protein for cAMP in basolateral membranes of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 1468: 107-114, 2000b.

CARUSO-NEVES, C.; SILVA, I.V.; MORALES, M.M.; LOPES, A.G. Cytoskeleton elements mediate the inhibition of the (Na⁺+K⁺)ATPase activity by PKC in *Rhodnius prolixus* malpighian tubules during hyperosmotic shock. *Arch Insect Biochem Physiol.* 48: 81-8, 2001.

CARUSO-NEVES, C.; COELHO-SOUZA, S.A.; VIVES, D.; GOES, G.; LARA, L.S.; LOPES, A.G. Modulation of ouabain-insensitive Na⁽⁺⁾-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg⁽²⁺⁾, MgATP and furosemide. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 1586-93, 2002.

CARUSO-NEVES, C.; PROVENZANO, K.; LUZ, F.F.; SANTOS, F.M.; FERNANDES, M.S.; LEÃO-FERREIRA, L.R.; LOPES, A.G. Bradykinin counteracts the stimulatory effect of angiotensin-(1-7) on the proximal tubule Na⁺ -ATPase activity through B2 receptor. *Regul Pept.* 110: 207-12, 2003a.

CARUSO-NEVES, C.; MALAQUIAS, A.T; LOSS, F.F.; CORREA DA COSTA, V.M.; GOMES, V.O.; LOPES, A.G. Bradykinin B1 receptor stimulates the proximal tubule Na⁺-ATPase activity through protein kinase C pathway. *Regul. Pept.* 115: 195-201, 2003b.

CARUSO-NEVES, C.; VIVES, D.; DANTAS, C.; ALBINO, C.M.; FONSECA, L.M.; LARA, L.S.; ISO M.; LOPES A.G. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase of proximal tubule is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1660: 93-98, 2004.

CASTANO, M.E.; SCHANSTRA, J.P.; HIRTZ, C.; PESQUERO, J.B.; PECHER, C.; GIROLAMI, J.P.; BASCANDS, J.L. B2 kinin receptor upregulation by cAMP is associated with BK-induced PGE₂ production in rat mesangial cells. *Am J Physiol.* 274: F532-40, 1998.

CHAKRAVARTHY, B.R.; WHITFIELD, J.F.; DURKIN, J.P. Inactive membrane protein kinase Cs: a possible target for receptor signalling. *Biochem J.*304: 809-16, 1994.

CHAI, K.X.; NI, A.; WANG, D.; WARD, D.C.; CHAO, J.; CHAO, L. Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics.* 31: 51-7, 1996.

CHAN, B.S.; SATRIANO, J.A.; PUCCI, M.; SCHUSTER, V.L. Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and *Xenopus*

oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT". *J Biol Chem.* 273: 6689-97, 1998.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 13926-31, 2002.

CHAO, J.; CHAO, L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Exp Physiol.* 90: 291-8, 2005.

CHIBALIN, A.V.; OGIMOTO, G.; PEDEMONTE, C.H.; PRESSLEY, T.A.; KATZ, A.I.; FÉRAILLE, E.; BERGGREN, P.O.; BERTORELLO, A.M. Dopamine-induced endocytosis of Na⁺,K⁺-ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J Biol Chem.* 274: 1920-7, 1999.

CHINI, B.; PARENTI, M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol.* 32: 325-38, 2004.

CHIOLERO, A.; MAILLARD, M.; NUSSBERGER, J.; BRUNNER, H.R.; BURNIER, M. Proximal sodium reabsorption: An independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension.* 36: 631-7, 2000.

COHEN-LURIA, R.; MORAN, A.; RIMON, G. Cyclooxygenase inhibitors suppress inhibitory effect of PGE₂ on Na-K-ATPase in MDCK cells. *Am J Physiol.* 267: F94-8, 1994.

CORBALÁN-GARCÍA, S.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 633-654, 2006.

COSTA-NETO, C.M.; DILLENBURG-PILLA, P.; HEINRICH, T.A.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; PEREIRA, M.G.; REIS, R.I.; SOUZA, P.P. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *Int Immunopharmacol.* 8: 135-42, 2008.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 429: 161-76, 2001.

COYNE, D.W.; MORRISON, A.R. In: J1991 In: J.H. Stein, F. N. Ziyadeh, S. Goldfarb (Eds.), *Hormones, Autacoides, and the Kidney*, Churchill Livingstone, New York, pp.263-280, 1991.

CUI, Y.; KÖNIG, J.; BUCHHOLZ, J.K.; SPRING, H.; LEIER, I.; KEPPLER, D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol.* 55: 929-37, 1999.

CUMMINGS, B.S.; MCHOWAT, J.; SCHNELLMANN, R.G. Role of an endoplasmic reticulum Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in oxidant-induced renal cell death. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283: F492-8, 2002.

CUTHBERT, A.W.; MARGOLIUS, H.S. Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. *Br J Pharmacol.* 75: 587-98, 1982.

DAS, S.; RAFTER, J.D.; KIM, K.P.; GYGI, S.P.; CHO, W. Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A(2) activation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 278: 41431-42, 2003.

DE SOUZA, A.M.; LOPES, A.G.; PIZZINO, C.P.; FOSSARI, R.N.; MIGUEL, N.C.; CARDOZO, F.P.; ABI-ABIB, R.; FERNANDES, M.S.; SANTOS, D.P.; CARUSO-NEVES, C. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na⁺-ATPase activity through AT2 receptor. *Regul Pept.* 120: 167-75, 2004.

DE SOUZA, A.M. Mecanismos moleculares envolvidos no efeito de angiotensina II sobre a atividade Na⁺-ATPásica: participação de vias seqüenciais de fosfolipases. *Tese de doutorado*, IBCCF, UFRJ, 2006.

DE SOUZA, A.M.; CARVALHO, T.L., SABINO, P.M., VIVES, D., FONTES, C.F., LOPES, A.G., CARUSO-NEVES, C. Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na(+) -ATPase in MDCK I cells. *Biochimie.* 89:1425-32, 2007.

DE WEERD, W.F.; LEEB-LUNBERG, L.M. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G α subunits G α q and G α l in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272: 17858-17866, 1997.

DEAN, R.; MURONE, C.; LEW, R.A.; ZHUO, J.; CASLEY, D., MÜLLER-ESTERL, W.; ALCORN, D.; MENDELSON, F.A. Localization of bradykinin B2 binding sites in rat kidney following chronic ACE inhibitor treatment. *Kidney Int.* 52:1261-70, 1997.

DEAN, R.; MARIC, C.; ALDRED, G.P.; CASLEY, D.; ZHUO, J.; HARRIS, P.; ALCORN, D.; MENDELSON, F.A. Rat renomedullary interstitial cells possess

bradykinin B2 receptors in vivo and in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 26: 48-55, 1999.

DÉCARIE, A.; RAYMOND, P.; GERVAIS, N.; COUTURE, R.; ADAM, A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol*. 271: H1340-7, 1996.

DEL CASTILLO, J.R.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F. Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase activity of the kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 692: 61-68, 1982.

DENDORFER, A.; WOLFRUM, S.; WELLHÖNER, P.; KORSMAN, K.; DOMINIAK, P. Intravascular and interstitial degradation of bradykinin in isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol*. 122: 1179-87, 1997.

DENDORFER, A.; WOLFRUM, S.; DOMINIAK, P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn J Pharmacol*. 79: 403-26, 1999.

DI CAMPO, V.; HENRÍQUEZ, L. M.; PROVERBIO, T.; MARÍN, R.; PROVERBIO, F. Na⁺-ATPase activity, cell ion and water contents of kidney cortex slices from rats on a high Na⁺ diet. *Biomed. Biochem. Acta* 50: 1213-1216, 1991.

DODSON, A.M.; RHODEN, K.J. Bradykinin increases Na(+)-K(+) pump activity in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 133: 1339-45, 2001.

DUBOURDIEU, D.J.; MORGAN, D.W. Multiple pathways for signal transduction in the regulation of arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta*.1054: 326-32, 1990.

DUNCAN, A.M.; KLADIS, A.; JENNINGS, G.L.; DART, A.M.; ESLER, M.; CAMPBELL, D.J. Kinins in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 278: R897-904, 2000.

DURAN, M.J.; PIERRE, S.V.; CARR, D.L.; PRESSLEY, T.A. The isoform-specific region of the Na,K-ATPase catalytic subunit: role in enzyme kinetics and regulation by protein kinase C. *Biochemistry*. 43: 16174-83, 2004.

EGGERICKX, D.; RASPE, E.; BERTRAND, D.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a human bradykinin B2 receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 187: 1306-1313, 1992.

eL-DAHR, S.; YOSIPIV, I.V.; MUCHANT, D.G.; CHEVALIER, R.L. Salt intake modulates the developmental expression of renal kallikrein and bradykinin B2 receptors. *Am J Physiol.* 270: F425-31, 1996.

eL-DAHR, S.S.; FIGUEROA, C.D.; GONZALEZ, C.B.; MÜLLER-ESTERL, W. Ontogeny of bradykinin B2 receptors in the rat kidney: implications for segmental nephron maturation. *Kidney Int.* 51: 739-49, 1997.

ENJYOJI, K.; KATO, H.; HAYASHI, I.; OH-ISHI, S.; IWANAGA, S. Purification and characterization of rat T-kininogens isolated from plasma of adjuvant-treated rats. Identification of three kinds of T-kininogens. *J Biol Chem.* 263: 973-9, 1988.

ERSAHIN, C.; SIMMONS, W.H. Inhibition of both aminopeptidase P and angiotensin,-converting enzyme prevents bradykinin degradation in the rat coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 30: 96-101, 1997.

EVANS, R.G.; MAJID, D.S.; EPEL, G.A. Mechanisms mediating pressure natriuresis: what we know and what we need to find out. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32:400-9, 2005.

FARMER, S.G.; ENSOR, J.E.; BURCH, R.M. Evidence that cultured airway smooth muscle cells contain bradykinin B2 and B3 receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 4: 273-7, 1991.

FATHY, D.B.; KYLE, D.J.; LEEB-LUNDBERG, L.M. High-affinity binding of peptide agonists to the human B1 bradykinin receptor depends on interaction between the peptide N-terminal L-lysine and the fourth extracellular domain of the receptor. *Mol Pharmacol.* 57: 171-9, 2000.

FÉRAILLE, E.; CARRANZA, M.L.; GONIN, S.; BÉGUIN, P.; PEDEMONTE, C.; ROUSSELOT, M.; CAVERZASIO, J.; GEERING, K.; MARTIN, P.Y.; FAVRE, H. Insulin-induced stimulation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. *Mol Biol Cell.* 10: 2847-59, 1999.

FÉRAILLE, E.; BÉGUIN, P.; CARRANZA, M.L.; GONIN, S.; ROUSSELOT, M.; MARTIN, P.Y.; FAVRE, H.; GEERING, K. Is phosphorylation of the alpha1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C? *Mol Biol Cell.* 11: 39-50, 2000.

FÉRAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphate-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* 81: 345-418, 2001.

FIELD, J.L.; HALL, J.M.; MORTON, I.K. Putative novel bradykinin B3 receptors in the smooth muscle of the guinea-pig taenia caeci and trachea. *Agents Actions Suppl.* 38: 540-5, 1992.

FIGUEROA, C.D.; GONZALEZ, C.B.; GRIGORIEV, S.; ABD ALLA, S.A.; HAASEMANN, M.; JARNAGIN, K.; MULLER-ESTERL, W. Probing for the bradykinin B2 receptor in rat kidney by anti-peptide and anti-ligand antibodies. *J Histochem Cytochem.* 43: 137-48, 1995.

FOGAÇA, S.E.; MELO, R.L.; PIMENTA, D.C.; HOSOI, K.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A. Differences in substrate and inhibitor sequence specificity of human, mouse and rat tissue kallikreins. *Biochem J.* 380: 775-81, 2004.

FUKAMI, K. Structure, regulation and function of phospholipase C isoenzymes. *J. Biochem.* 131: 293-299, 2002.

FURUTO-KATO, S.; MATSUMOTO, A.; KITAMURA, N.; NAKANISHI, S. Primary structures of the mRNAs encoding the rat precursors for bradykinin and T-kinin. Structural relationship of kininogens with major acute phase protein and alpha 1-cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 260:12054-9, 1985.

GABRA, B.H.; COUTURE, R.; SIROIS, P. Functional duality of kinin receptors in pathophysiology. *Med Sci (Paris)* 19: 1101-10, 2003.

GOMES-QUINTANA, E. Mecanismos moleculares envolvidos na excreção renal de Na⁺: ativação seqüencial dos sistemas PLC/PKC e PLA₂/PGE₂ na regulação da Na⁺-ATPase por bradicinina. Tese de doutorado, IBCCF, UFRJ, 2004.

GRUBMEYER, C.; PENEFSKY, H.S. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256: 3718-3727, 1981.

HAASEMANN, M.; CARTAUD, J.; MULLER-ESTERL, W.; DUNIA, I. Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J Cell Sci.* 111: 917-28, 1998.

HALLER, H.; LINDSCHAU, C.; LUFT, L.C. Role of protein kinase C in intracellular signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 733: 313-324, 1994.

HALLER, H.; MAASCH, C.; LINDSCHAU, C.; BRANCHMANN, M.; BUCHNER, K.; LUFT, F.C. Intracellular targeting and protein kinase C in vascular smooth muscle cells: specific effects of different membrane-bound receptors. *Acta Physiol. Scand.* 164: 599-609, 1998.

HAO, C.M.; BREYER, M.D. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol.*70: 357-77, 2008.

HARRIS, R.C.; MCKANNA, J.A.; AKAI, Y.; JACOBSON, H.R.; DUBOIS, R.N.; BREYER, M.D. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 94: 2504-10, 1994.

HARWALKAR, S.; CHANG, C.H.; DULIN, N.O.; DOUGLAS, J.G. Role of phospholipase A2 isozymes in agonist-mediated signaling in proximal tubular epithelium. *Hypertension.* 31: 809-14, 1998.

HÉBERT, R.L.; REGOLI, D.; XIONG, H.; BREYER, M.D.; PLANTE, G.E. Bradykinin B2 type receptor activation regulates fluid and electrolyte transport in the rabbit kidney. *Peptides.* 26: 1308-16, 2005. .

HECQUET, C.; BECKER, R.P.; TAN, F.; ERDÖS, E.G. Kallikreins when activating bradykinin B2 receptor induce its redistribution on plasma membrane. *Int Immunopharmacol.* 2: 1795-806, 2002

HECQUET, C.; TAN, F.; MARCIC, B.M.; ERDÖS, E.G. Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol Pharmacol.* 58: 828-36, 2000.

HEDIGER, M.A.; MOUNT, D.B.; ROLFS, A. The molecular basis of solute transport. In: BRENNER, B. M. & RECTOR, F. C. The Kidney. 7 ed. USA: W. B. Saunders Company, 2004

HEFNER, Y.; BORSCH-HAUBOLD, A.G.; MURAKAMI, M.; WILDE, J.I.; PASQUET, S.; SCHIELTZ, D.; GHOMASHCHI, F.; YATES, JR 3RD; ARMSTRONG, C.G.; PATERSON, A.; COHEN, P.; FUKUNAGA, R.; HUNTER, T.; KUDO, I., WATSON, S.P., GELB. M.H. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem.*275: 37542-51, 2000.

HERZIG, M.C.; NASH, N.R.; CONNOLLY, M.; KYLE, D.J.; LEEB-LUNDBERG, L.M. The N terminus of bradykinin when bound to the human bradykinin B2 receptor is adjacent to extracellular Cys20 and Cys277 in the receptor. *J Biol Chem.* 271: 29746-51, 1996.

HIGAKI, T.; SAWADA, S.; KONO, Y.; IMAMURA, H.; TADA, Y.; YAMASAKI, S.; TORATANI, A.; SATO, T.; KOMATSU, S.; AKAMATSU, N.; TAMAGAKI, T.; TSUDA, Y.; TSUJI, H.; NAKAGAWA, M. A role of protein kinase C in the regulation of cytosolic phospholipase A(2) in bradykinin-induced PGI(2) synthesis by human vascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 58: 144-5, 1999.

HOROWITZ, J.; PERLMAN, R.L. Phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. *Method Enzymol* 141:169-175, 1987.

HWANG, J.I.; HEO, K.; SHIN, K.J.; KIM, E.; YUN, C.; RYU, S.H.; SHIN, H.S., SUH, P.G. Regulation of phospholipase C β 3 activity by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory effector 2. *J. Biol. Chem.* 275: 16632-16637, 2000.

IIZUMI, K.; MIKAMI, Y.; HASHIMOTO, M.; NARA, T.; HARA, Y.; AOKI, T. Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 738-746, 2006.

IKEMOTO, F.; SONG, G.B.; TOMINAGA, M.; KANAYAMA, Y.; YAMAMOTO, K. Angiotensin-converting enzyme in the rat kidney. Activity, distribution, and response to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nephron.* 55: Suppl 1:3-9, 1990.

INSEL, P.A.; HEAD, B.P.; PATEL, H.H.; ROTH, D.M.; BUNDEY, R.A.; SWANEY, J.S. Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem Soc Trans.* 33: 1131-4, 2005.

IRISH, J.M. Secretion of prostaglandin E2 by rabbit proximal tubules. *Am J Physiol.* 237: F268-73, 1979.

IWAI, N.; MATSUNAGA, M.; KITA, T.; TEI, M.; KAWAI, C. Detection of low molecular kininogen messenger RNA in human kidney. *J Hypertens Suppl.* 6: S399-400, 1988.

JAKOBSSON, P.J.; THORÉN, S.; MORGENSTERN, R.; SAMUELSSON, B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 7220-5, 1999.

JENKINS, D.W.; SELLERS, L.A.; FENIUK, W.; HUMPHREY, P.P. Characterization of bradykinin-induced prostaglandin E2 release from cultured rat trigeminal ganglion neurones. *Eur J Pharmacol.* 469: 29-36, 2003.

JORGENSEN, P.L.; PEDERSEN, P.A. Structure-function relationships of Na(+), K(+), ATP, or Mg(2+) binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 1505: 57-74, 2001.

JULIEN, C.; CHAPUIS, B.; CHENG, Y.; BARRÈS, C. Dynamic interactions between arterial pressure and sympathetic nerve activity: role of arterial baroreceptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285: R834-41, 2003.

KANAI, N.; LU, R.; SATRIANO, J.A.; BAO, Y.; WOLKOFF, A.W.; SCHUSTER, V.L. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science*. 268: 866-9, 1995.

KANG, D.S.; LEEB-LUNDBERG, L.M. Negative and positive regulatory epitopes in the C-terminal domains of the human B1 and B2 bradykinin receptor subtypes determine receptor coupling efficacy to G(q/11)-mediated [correction of G(9/11)-mediated] phospholipase Cbeta activity. *Mol Pharmacol*. 62: 281-8, 2002.

KATAN, M. Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 1436: 5-17, 1998.

KATORI, M.; MAJIMA, M.; ODOI-ADOME, R.; SUNAHARA, N.; UCHIDA, Y. Evidence for the involvement of a plasma kallikrein-kinin system in the immediate hypotension produced by endotoxin in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*. 98: 1383-91, 1989.

KATORI, M.; MAJIMA, M. The renal kallikrein-kinin system: its role as a safety valve for excess sodium intake, and its attenuation as a possible etiologic factor in salt-sensitive hypertension. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 40: 43-115, 2003.

KATORI, M.; MAJIMA, M. A missing link between a high salt intake and blood pressure increase. *J Pharmacol Sci* 100: 370-390, 2006.

KENNEDY, C.R.J.; HEBERT, R.L.; DO, M.T.; PROULX, P.R. Bradykinin-stimulated arachidonic acid release from MDCK cells is not protein kinase C dependent. *Am. J. Physiol*. 273: C1605-C1612, 1997.

KHUNDMIRI, S.J.; DEAN, W.L.; MCLEISH, K.R.; LEDERER, E.D. Parathyroid hormone-mediated regulation of Na⁺-K⁺-ATPase requires ERK-dependent translocation of protein kinase Calpha. *J Biol Chem*. 280: 8705-13, 2005.

KIMURA, H.; TAKEDA, M.; NARIKAWA, S.; ENOMOTO, A.; ICHIDA, K.; ENDOU, H. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther.* 301: 293-8, 2002.

KIROYTCHEVA, M.; CHEVAL, L.; CARRANZA, M.L.; MARTIN, P.Y.; FAVRE, H.; DOUCET, A.; FÉRAILLE, E. Effect of cAMP on the activity and the phosphorylation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in rat thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* 55: 1819-31, 1999.

KITA, Y.; OHTO, T.; UOZUMI, N.; SHIMIZU, T. Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta.* 1761: 1317-22, 2006.

KONIECZKOWSKI, M.; SEDOR, J.R. Cell-specific regulation of type II phospholipase A2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 92: 2524-32, 1993.

KOPP, U.C.; FARLEY, D.M.; CICHA, M.Z.; SMITH, L.A. Activation of renal mechanosensitive neurons involves bradykinin, protein kinase C, PGE(2), and substance P. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278: R937-46, 2000.

KRAMER, R.M.; ROBERTS, E.F.; UM, S.L.; BÖRSCH-HAUBOLD, A.G.; WATSON, S.P.; FISHER, M.J.; JAKUBOWSKI, J.A. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem.* 271: 27723-9, 1996.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 3-58, 2002.

LAL, M.A.; KENNEDY, C.R.; PROULX, P.R.; HEBERT, R.L. Bradykinin-stimulated cPLA₂ phosphorylation is protein kinase C dependent in rabbit CCD cells. *Am J Physiol.* 273: F907-15, 1997.

LAL, M.A.; PROULX, P.R.; HEBERT, R.L. A role for PKC epsilon and MAP kinase in bradykinin-induced arachidonic acid release in rabbit CCD cells. *Am J Physiol.* 274: F728-35, 1998.

LARA, L.S.; BICA, R.B.; SENA, S.L.; CORREA, J.S.; MARQUES-FERNANDES, M.F.; CARUSO-NEVES, C. Angiotensin-(1-7) reverts the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na⁽⁺⁾-ATPase activity via a A779-sensitive receptor. *Regul. Pept.* 103:17-22, 2002.

LARA, L.S.; CAVALCANTE, F.; AXELBAND, F.; DE SOUZA, A.M.; LOPES, A.G.; CARUSO-NEVES, C. Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT₂-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na⁺-ATPase by Ang-(1-7). *Biochem J.* 395: 183-90, 2006.

LARA, L.S.; CORREA, J.S.; LAVELLE, A.B.; LOPES, A.G., CARUSO-NEVES, C. The angiotensin receptor type 1-Gq protein-phosphatidyl inositol phospholipase C{beta}-protein kinase C pathway is involved in activation of proximal tubule Na⁺-ATPase activity by angiotensin(1-7) in pig kidneys. *Exp Physiol.* 93:639-47, 2008.

LARSSON, P.K.; CLAEISSON, H.E.; KENNEDY, B.P. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A₂ and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem.* 273: 207-14, 1998.

LARSSON FORSELL, P.K.; RUNARSSON, G.; IBRAHIM, M.; BJÖRKHOLM, M.; CLAEISSON, H.E. On the expression of cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ (88kDa) in immature and mature myeloid cells and its role in leukotriene synthesis in human granulocytes. *FEBS Lett.* 434: 295-9, 1998.

LAZARENO, S.; GHARAGOZLOO, P.; KUONEN, D.; POPHAM, A.; BIRDSALL, N.J. Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. *Mol Pharmacol* 53: 573-89, 1998. Erratum in: *Mol Pharmacol* 55: 194, 1999.

LAZARUS, M.; KUBATA, B.K.; EGUCHI, N.; FUJITANI, Y.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 397: 336-41, 1998.

LEEB-LUNDBERG, L.M.; MATHIS, S.A. Guanine nucleotide regulation of B₂ kinin receptors. Time-dependent formation of a guanine nucleotide-sensitive receptor state from which [³H]bradykinin dissociates slowly. *J Biol Chem.* 265: 9621-7, 1990.

LEMIEUX, L.I.; RAHAL, S.S.; KENNEDY, C.R. PGE₂ reduces arachidonic acid release in murine podocytes: evidence for an autocrine feedback loop. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284: C302-9, 2003.

LENNARTZ, M.R. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 31: 415-30, 1999.

LESLIE, C.C. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 272: 16709-12, 1997.

LEVI, R.; SEYEDI, N.; SCHAEFER, U.; ESTEPHAN, R.; MACKINS, C.J.; TYLER, E.; SILVER, R.B. Histamine H3-receptor signaling in cardiac sympathetic nerves: Identification of a novel MAPK-PLA2-COX-PGE2-EP3R pathway. *Biochem Pharmacol.* 73: 1146-56, 2007.

LÍBANO-SOARES, J.D.; GOMES-QUINTANA, E.; MELO, H.K.; QUEIROZ-MADEIRA, E.P.; ROUBACH, R.G.; LOPES, A.G.; CARUSO-NEVES, C. B2 receptor-mediated dual effect of bradykinin on proximal tubule Na⁺-ATPase: Sequential activation of the phosphoinositide-specific phospholipase C β /protein kinase C and Ca²⁺-independent phospholipase A2 pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1778: 1316-23, 2008.

LIEBMANN, C.; OFFERMANN, S.; SPICHER, K.; HINSCH, K.D.; SCHNITTLER, M.; MORGAT, J.L.; REISSMANN, S.; SCHULTZ, G.; ROSENTHAL, W. A high-affinity bradykinin receptor in membranes from rat myometrium is coupled to pertussis toxin-sensitive G-proteins of the Gi family. *Biochem Biophys Res Commun.* 167: 910-7, 1990.

LIEBMANN, C.; GRANESS, A.; ADOMEIT, A.; NAWRATH, S. The adenylate cyclase-inhibiting bradykinin receptor in guinea pig ileum membranes exhibits an unique antagonist profile. *Eur J Pharmacol.* 289: 403-7, 1995.

LIEBMANN, C. Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol Chem.* 382: 49-55, 2001.

LIU, S.J.; MCHOWAT, J. Stimulation of different phospholipase A2 isoforms by TNF- α and IL-1 β in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 275: H1462-72, 1998.

LOPES, A.G.; SOARES, A.C.; SANTOS, D.P.; FERNADES, M.S.; LEÃO-FERREIRA, L.R.; QUINTANA-GOMES, E.; CARUSO-NEVES, C. PLA₂/PGE₂ are involved in the inhibitory effect of bradykinin on the angiotensin-(1-7)-stimulated Na⁺-ATPase activity of the proximal tubule. *Regul. Pept.* 117: 37-41, 2004.

LORTIE, M.; REGOLI, D.; RHALEB, N.E.; PLANTE, G.E. The role of B1- and B2-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am J Physiol.* 262: R72-6, 1992.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

LU, R.; KANAI, N.; BAO, Y.; SCHUSTER, V.L. Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *J Clin Invest.* 98: 1142-9, 1996.

LUNDWALL, A.; BRATTSAND, M. Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci.* 2008 DOI: 10.1007/s00018-008-8024-3

LEMIEUX, L.I.; RAHAL, S.S.; KENNEDY, C.R. PGE2 reduces arachidonic acid release in murine podocytes: evidence for an autocrine feedback loop. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: 302-309, 2003.

MA, Z.; WANG, X.; NOWATZKE, W.; RAMANADHAM, S.; TURK, J. Human pancreatic islets express mRNA species encoding two distinct catalytically active isoforms of group VI phospholipase A2 (iPLA2) that arise from an exon-skipping mechanism of alternative splicing of the transcript from the iPLA2 gene on chromosome 22q13.1. *J Biol Chem.* 274: 9607-16, 1999.

MAHABEER, R.; BHOOLA, K.D. Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol Ther.* 88: 77-89, 2000.

MAIA, J.C.C.; GOMES, S.L.; JULIANI, M.H. Em: MOREL, C.M., editor, Genes of antigens of parasites: a laboratory manual proceeding. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 145-157, 1983.

MALAQUIAS, A.T.; OLIVEIRA, M.M. Phospholipid signalling pathways in *Trypanosoma cruzi* growth control. *Acta. Trop.* 73: 93-108, 1999.

MALNIC, G.; ENOIKIBARA, H.; MELLO AIRES, M.; LACAZ VIEIRA, F. Effect of furosemid and NaCl-loading on chloride excretion in single nephrons of rat kidneys. *Pflugers Arch.* 309: 21-37, 1969.

MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50: 357-386, 1998.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 845-52, 2004.

MARCHETTI, J.; ROSEAU, S.; ALHENC-GELAS, F. Angiotensin I converting enzyme and kinin-hydrolyzing enzymes along the rabbit nephron. *Kidney Int.* 31: 744-751, 1987.

MARGOLIUS, H.S. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension*. 26: 221-9, 1995.

MARIEB, E.N. Human Anatomy and Physiology. 5th edition. Benjamin Cummings: San Francisco. 2001.

MARÍN, R.; PROVERBIO, P.; PROVERBIO, F. Active sodium transport in basolateral membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 814: 363-373, 1985.

MARIN CASTAÑO, M.E.; PRADDAUDE, F.; BOMPART, G.; GIROLAMI, J.P.; BASCANDS, J.L. RT-PCR microlocalization of bradykinin B2 receptor mRNA in microdissected rat nephron segments. *Immunopharmacology*. 33: 171-3, 1996.

MELLO-AIRES, M. Visão morfofuncional do rim. In: _____. Fisiologia. 3 ed. Guanabara Koogan, 2008.

MELLO-AIRES, M. Excreção renal de solutos. In: _____. Fisiologia. 3 ed. Guanabara Koogan, 2008

MELLO-AIRES, M. Função tubular. In: _____. Fisiologia. 3 ed. Guanabara Koogan, 2008

MELLO-AIRES, M. Papel do rim na regulação do volume e da tonicidade do fluido extracelular. In: _____. Fisiologia. 3 ed. Guanabara Koogan, 2008

MENKE, J. G.; BORKOWSKI, J. A.; BIERILO, K.K.; MacNEIL, T.; DERRICK, A. W.; SCHNECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMEYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269: 21583-6, 1994.

MOOLENAAR, W.H.; KRANENBURG, O.; POSTMA, F.R.; ZONDAG, G.C. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol*. 9: 168-73, 1997.

MORDASINI, D.; BUSTAMANTE, M.; ROUSSELOT, M.; MARTIN, P.Y.; HASLER, U.; FÉRAILLE, E. Stimulation of Na⁺ transport by AVP is independent of PKA phosphorylation of the Na-K-ATPase in collecting duct principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289:F1031-9, 2005.

MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J. Pharmacol. Sci.* 99: 6–38, 2005.

MORETTI, R.; MARTÍN, M.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F.; MARÍN, R. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 623-626, 1991.

MORRIS, A.J.; MALBON, C.C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.* 79: 1373-430, 1999.

MÜHL, H.; GEIGER, T.; PIGNAT, W.; MÄRKI, F.; VAN DEN BOSCH, H.; VOSBECK, K.; PFEILSCHIFTER, J. PDGF suppresses the activation of group II phospholipase A2 gene expression by interleukin 1 and forskolin in mesangial cells. *FEBS Lett.* 291: 249-52, 1991.

MUNOZ, C.M.; COTECCHIA, S.; LEEB-LUNDBERG, L.M. B2 kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors. *Arch Biochem Biophys.* 301: 336-44, 1993.

MURAKAMI, M.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; KUWATA, H.; WINSTEAD, M.V.; TISCHFIELD, J.A.; KUDO, I. The functions of five distinct mammalian phospholipase A2S in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A2S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem.* 273: 14411-23, 1998.

MURAKAMI, M.; NARABA, H.; TANIOKA, T.; SEMMYO, N.; NAKATANI, Y.; KOJIMA, F.; IKEDA, T.; FUEKI, M.; UENO, A.; OH, S.; KUDO, I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275: 32783-32792, 2000.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; TANIOKA, T.; KUDO I. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 383-99, 2002.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res.* 43: 3-35, 2004.

MURTHY, K.S.; MAKHLOUF, G.M. Differential regulation of phospholipase A2 (PLA2)-dependent Ca²⁺ signaling in smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. Inhibitory phosphorylation of PLA2 by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273: 34519-26, 1998.

NAKHOSTINE, N.; RIBUOT, C.; LAMONTAGNE, D.; NADEAU, R.; COUTURE, R. Mediation by B1 and B2 receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol*. 110: 71-6, 1993.

NARKAR, V.; HUSSAIN, T.; LOKHANDWALA, M. Role of tyrosine kinase and p44/42 MAPK in D(2)-like receptor-mediated stimulation of Na(+), K(+)-ATPase in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 282: F697-702, 2002.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. 79: 1193-226, 1999.

NEWTON, A.C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem*. 270: 28495-28498, 1995.

NIES, A.T.; KÖNIG, J.; CUI, Y.; BROM, M.; SPRING, H.; KEPPLER, D. Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur J Biochem*. 269: 1866-76, 2002.

NODA, M.; KARIURA, Y.; AMANO, T.; MANAGO, Y.; NISHIKAWA, K.; AOKI, S.; WADA, K. Kinin receptors in cultured rat microglia. *Neurochem Int*. 45: 437-42, 2004.

NOVOTNY, E.A.; BEDNAR, D.L.; CONNOLLY, M.A.; CONNOR, J.R.; STORMANN, T.M. Mutation of aspartate residues in the third extracellular loop of the rat B2 bradykinin receptor decreases affinity for bradykinin. *Biochem Biophys Res Commun*. 201: 523-30, 1994.

PALMIERI, F.E.; BAUSBACK, H.H.; CHURCHILL, L.; WARD, P.E. Kinin and enkephalin conversion by an endothelial, plasma membrane carboxypeptidase. *Biochem Pharmacol*. 35: 2749-56, 1986.

PAMPALAKIS, G.; SOTIROPOULOU, G. Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1776: 22-31, 2007.

PEITSCH, M.C.; BORNER, C.; TSCHOPP, J. Sequence similarity of phospholipase A2 activating protein and the G protein beta-subunits: a new concept of effector protein activation in signal transduction? *Trends Biochem Sci*. 18: 292-3, 1993.

PFEILSCHIFTER, J.; PIGNAT, W.; MÄRKI, F.; WIESENBERG, I. Release of phospholipase A2 activity from rat vascular smooth muscle cells mediated by cAMP. *Eur J Biochem*. 181: 237-42, 1989.

PFEILSCHIFTER, J.; LEIGHTON, J.; PIGNAT, W.; MÄRKI, F.; VOSBECK, K. Cyclic AMP mimics, but does not mediate, interleukin-1- and tumour-necrosis-factor-stimulated phospholipase A2 secretion from rat renal mesangial cells. *Biochem J.* 273: 199-204, 1991.

PIZARD, A.; MARCHETTI, J.; ALLEGRINI, J.; ALHENC-GELAS, F.; RAJERISON, R.M. Negative cooperativity in the human bradykinin B2 receptor. *J Biol Chem.* 273: 1309-15, 1998.

PLANTE, G.E.; BISSONNETTE, M.; SIROIS, M.G.; REGOLI, D.; SIROIS, P. Renal permeability alteration precedes hypertension and involves bradykinin in the spontaneously hypertensive rat. *J. Clin. Invest.* 89: 2030-2032, 1992.

POPOVA, L.G.; BALNOKIN, Y.V.; DIETZ, K.L.; GIMMLER, H. Na⁺-ATPase from the plasma membrane of the marine alga *Tetraselmis (Platymonas) viridis* forms a phosphorylated intermediate. *FEBS Lett.* 426: 161-164, 1998.

PRADO, G.N.; TAYLOR, L.; ZHOU, X.; RICUPERO, D.; MIERKE, D.F.; POLGAR, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J. Cell. Physiol.* 193: 275-286, 2002.

PROVERBIO, F.; CONDESCU-GUIDI, M.; WHITTEMBURY, G. Ouabain-insensitive Na⁺ stimulation of an Mg⁺²-dependent ATPase in kidney tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 394: 281-292, 1975.

PROVERBIO, F.; PROVERBIO, T.; MARIN, R.; PROVERBIO, T. Na⁺-ATPase is a different entity from the (Na⁺ + K⁺)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 858: 202-5, 1986.

PROVERBIO, F.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T. The "second" sodium pump and cell volume. *Curr Top Memb Transp* 34: 105-120, 1989

PROVERBIO, F.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T. The ouabain-insensitive sodium pump. *Comp. Biochem. Physiol.* 99 A(3): 279-283, 1991.

QI, Z.; CAI, H.; MORROW, J.D.; BREYER, M.D. Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension.* 48: 323-8, 2006.

QIU, Z.H.; LESLIE, C.C. Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A2. *J Biol Chem.* 269: 19480-7, 1994.

QUITTERER, U.; ZAKI, E.; ABDALLA, S. Investigation of the extracellular accessibility of the connecting loop between membrane domains I and II of the bradykinin B2 receptor. *J Biol Chem.* 274: 14773-8, 1999.

RANGEL, L.B.A.; CARUSO-NEVES, C.; LARA, L.S.; BRASIL, F.L.; LOPES, A.G. Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1416: 309-319, 1999.

RANGEL, L.B.A.; MALAQUIAS, A.T.; LARA, L.S.; SILVA, I.V.; DE SOUZA, A.M.; LOPES, A.G.; CARUSO-NEVES, C. PKC-Induced phosphorylation modulates the Na⁺-ATPase activity from proximal tubules. *Biochim. Biophys. Acta* 1512: 90-97, 2001.

RANGEL, L.B.; CARUSO-NEVES, C.; LARA, L.S.; LOPES, A.G. Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na⁺-ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochim Biophys Acta.*1564: 310-6, 2002.

RANGEL, L.B.; LOPES, A.G.; LARA, L.S.; CARVALHO, T.L.; SILVA, I.V.; OLIVEIRA, M.M.; EINICKER-LAMAS, M.; VIEYRA, A.; NOGAROLI, L.; CARUSO-NEVES, C. PI-PLCbeta is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. *Regul Pept.* 127: 177-82, 2005.

RAO, C.V.; SIMI, B.; WYNN, T.T.; GARR, K.; REDDY, B.S. Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A2, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats. *Cancer Res.* 56: 532-7, 1996.

REBECCHI, M.J.; PENTYALA, S.N. Structure, function and control of phosphoinositide specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80: 1291-1335, 2000.

REGOLI, D.; RHALEB, N.E.; DRAPEAU, G.; DION, S. Kinin receptor subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 6: S30-8, 1990.

RIBARDO, D.A.; CROWE, S.E.; KUHL, K.R.; PETERSON, J.W.; CHOPRA, A.K. Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A2-activating protein and by activation of phospholipase C and D. *J Biol Chem.* 276: 5467-75, 2001.

RICUPERO, D.; TAYLOR, L.; POLGAR, P. Interactions of bradykinin, calcium, G-protein and protein kinase in the activation of phospholipase A2 in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Agents Actions* 40: 110-118, 1993.

ROCHA-E-SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-273, 1949.

RODRIGUEZ, J.A.; VIO, C.P.; PEDRAZA, P.L.; MCGIFF, J.C.; FERRERI, N.R. Bradykinin regulates cyclooxygenase-2 in rat renal thick ascending limb cells. *Hypertension.* 44: 230-5, 2004.

ROJKJAER, R.; SCHMAIER, A.H. Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cell membranes. *Immunopharmacology* 43: 109-14, 1999.

ROLLER, A.; BÄHR, O.R.; STREFFER, J.; WINTER, S.; HENEKA, M.; DEININGER, M.; MEYERMANN, R.; NAUMANN, U.; GULBINS, E.; WELLER, M. Selective potentiation of drug cytotoxicity by NSAID in human glioma cells: the role of COX-1 and MRP. *Biochem Biophys Res Commun.* 259: 600-5, 1999.

ROQUES, B.P.; NOBLE, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M.C.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.* 45: 87-146, 1993.

ROSCHER, A.A.; MANGANIELLO, V.C.; JELSEMA, C.L.; MOSS, J. Autoregulation of bradykinin receptors and bradykinin-induced prostacyclin formation in human fibroblasts. *J Clin Invest.* 74: 552-8, 1984.

SACKTOR, B.; ROSEMBLOOM, I.L.; LIANG, C.T.; CHENG, L. Sodium gradient- and potassium plus potassium gradient-dependent glutamate uptake in renal basolateral membrane vesicles. *J. Membr. Biol.* 60: 63-71, 1981.

SAKAMOTO, W.; SATOH, F.; GOTOH, K.; UEHARA, S. Ile-Ser-bradykinin (T-kinin) and Met-Ile-Ser-bradykinin (Met-T-kinin) are released from T-kininogen by an acid proteinase of granulomatous tissues in rats. *FEBS Lett.* 219: 437-40, 1987.

SANGSREE, S.; BROVKOVYCH, V.; MINSHALL, R.D.; SKIDGEL, R.A. Kininase I-type carboxypeptidases enhance nitric oxide production in endothelial cells by generating bradykinin B1 receptor agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: H1959-68, 2003.

SANO, A.; ZHU, X.; SANO, H.; MUNOZ, N.M.; BOETTICHER, E.; LEFF, A.R. Regulation of eosinophil function by phosphatidylinositol-specific PLC and cytosolic PLA2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281: L844-51, 2001.

SAUVANT, C.; HOLZINGER, H.; GEKLE, M. Prostaglandin E2 inhibits its own renal transport by downregulation of organic anion transporters rOAT1 and rOAT3. *J Am Soc Nephrol*. 17: 46-53, 2006.

SCALERA, V.; STORELLI, C.; STORELLI-JOSS, C.; HAASE, W.; MURER, H. A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small-intestinal epithelial cells. *Biochem J*. 186: 177-81, 1980.

SCHALKWIJK, C.; PFEILSCHIFTER, J.; MÄRKI, F.; VAN DEN BOSCH, H. Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A2 in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 174: 268-75, 1991.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 1761: 1246-59, 2006.

SCHMAIER, A.H. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 109: 1007-9, 2002.

SCHMAIER, A.H. Assembly, activation, and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system. *Int Immunopharmacol*. 8: 161-5, 2008.

SCHMIDLIN, F.; LOEFFLER, S.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y.; GIES, J.P. PLA2 phosphorylation and cyclooxygenase-2 induction, through p38 MAP kinase pathway, is involved in the IL-1beta-induced bradykinin B2 receptor gene transcription. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 361: 247-54, 2000.

SCHNERMANN, J.; CHOU, C.L.; MA, T.; TRAYNOR, T.; KNEPPER, M.A.; VERKMAN, A.S. Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 9660-4, 1998.

SCHWARTZ, Z.; SHAKED, D.; HARDIN, R.R.; GRUWELL, S.; DEAN, D.D.; SYLVIA, V.L.; BOYAN, B.D. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ causes a rapid increased in phosphatidylinositol-specific PLC β activity via phospholipase A2-dependent production of lysophospholipid. *Steroids*. 68: 423-437, 2003.

SELDIN, D.W.; GEIBISCH, G. (eds). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2 ed. New York: Raven Press, 1992.

SHIMAMOTO, K.; IIMURA, O. Physiological role of renal kallikrein-kinin system in human. *Adv Exp Med Biol*. 247A: 87-96, 1989.

SCHUSTER, V.L. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 633-47, 2002.

SIX D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 1-19, 2000.

SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator. *Int Immunopharmacol.* 7: 1888-99, 2007.

SKIDGEL, R.A.; TAN, F. Structural features of two kininase I-type enzymes revealed by molecular cloning. *Agents Actions Suppl.* 38: 359-67, 1992.

SKOU, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 394-401, 1957.

SMITH, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J.* 259: 315-24, 1989.

SMITH, J.A.; DAVIS, C.L.; BURGESS, G.M. Prostaglandin E2-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3250-3258, 2000.

SOUZA DOS SANTOS, R.A.; PASSAGLIO, K.T.; PESQUERO, J.B.; BADER, M.; SIMÕES E SILVA, A.C. Interactions between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension.* 38: 660-4, 2001.

SOUZA-LEITE, M.; THOMAZ, R.; FONSECA, F.V.; PANIZZUTTI, R.; VERCESI, A.E.; MEYER-FERNANDES, J.R. Trypanosoma brucei brucei: biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp. Parasitol* 115: 315-323, 2007.

STEER, S.A.; WIRSIG, K.C.; CREER, M.H.; FORD, D.A.; McHOWAT, J. Regulation of membrane-associated iPLA2 activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C1621-6, 2002.

SUZUKI, Y.; UENO, S.; OHNUMA, R.; KOYAMA, N. Cloning, sequencing and functional expression in Escherichia coli of the gene for a P-type Na⁺-ATPase of a facultatively anaerobic alkaliphile, Exiguobacterium aurantiacum. *Biochim. Biophys. Acta* 1727: 162-168, 2005.

SWEADNER, K.J. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 988: 185-220, 1989.

TANAKA, H.; TAKEYA, R.; SUMIMOTO, H. A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A₂. *Biochem Biophys Res Commun*. 272: 320-6, 2000.

TANIKAWA, N.; OHMIYA, Y.; OHKUBO, H.; HASHIMOTO, K.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; ITO, S.; WATANABE, K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 291: 884-889, 2002.

TANIOKA, T.; NAKATANI, Y.; SEMMYO, N.; MURAKAMI, M.; KUDO, I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biol Chem*. 275: 32775-82, 2000.

TAY, H.K.; MELENDEZ, A.J. Fc gamma RI-triggered generation of arachidonic acid and eicosanoids requires iPLA₂ but not cPLA₂ in human monocytic cells. *J. Biol. Chem*. 279: 22505-22513, 2004.

THRASHER, T.N. Baroreceptors, baroreceptor unloading, and the long-term control of blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288: R819-27, 2005.

THRASHER, T.N. Arterial baroreceptor input contributes to long-term control of blood pressure. *Curr Hypertens Rep*. 8: 249-54, 2006.

TORTELOTE, G.G.; VALVERDE, R.H.; LEMOS, T.; GUILHERME, A.; EINICKER-LAMAS, M.; VIEYRA, A. The plasma membrane Ca²⁺ pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae. *FEBS Lett*. 576: 31-5, 2004.

TORNEL, J.; MADRID, M.I.; GARCÍA-SALOM, M.; WIRTH, K.J.; FENOY, F.J. Role of kinins in the control of renal papillary blood flow, pressure natriuresis, and arterial pressure. *Circ Res*. 86: 589-95, 2000.

TOUHEY, S.; O'CONNOR, R.; PLUNKETT, S.; MAGUIRE, A.; CLYNES, M. Structure-activity relationship of indomethacin analogues for MRP-1, COX-1 and COX-2 inhibition. identification of novel chemotherapeutic drug resistance modulators. *Eur J Cancer*. 38: 1661-70, 2002.

TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 23: 177-83, 2002.

UNDERWOOD, K.W.; SONG, C.; KRIZ, R.W.; CHANG, X.J.; KNOPF, J.L.; LIN, L.L. A novel calcium-independent phospholipase A₂, cPLA₂-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA₂. *J Biol Chem.* 273: 21926-32, 1998.

VADAS, P.; STEFANSKI, E.; WLOCH, M.; GROUX, B.; VAN DEN BOSCH, H.; KENNEDY, B. Secretory non-pancreatic phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 expression by tracheobronchial smooth muscle cells. *Eur J Biochem.* 235: 557-63, 1996.

VAN AUBEL, R.A.; PETERS, J.G.; MASEREEUW, R.; VAN OS, C.H.; RUSSEL, F.G. Multidrug resistance protein mrp2 mediates ATP-dependent transport of classic renal organic anion p-aminohippurate. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279: F713-7, 2000.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; HILKMANN, H.; DE WIDT, J.; VAN DER BEND, R.L. Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblasts. II. Phosphatidylcholine breakdown by phospholipases C and D; involvement of protein kinase C. *J Biol Chem.* 266: 10344-50, 1991.

VANHOOF, G.; DE MEESTER, I.; VAN SANDE, M.; SCHARPÉ, S.; YARON, A. Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 30: 333-8, 1992.

VIAL, D.; ARBIBE, L.; HAVET, N.; DUMAREY, C.; VARGAFTIG, B.; TOUQUI, L. Down-regulation by prostaglandins of type-II phospholipase A₂ expression in guinea-pig alveolar macrophages: a possible involvement of cAMP. *Biochem J.* 330: 89-94, 1998.

VICHAJ, V.; SUYARNSESTHAKORN, C.; PITTAYAKHAJONWUT, D.; SRIKLUNG, K.; KIRTIKARA, K. Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites. *Inflamm Res.* 54: 163-72, 2005.

WANG, T.; PENTYALA, S.; ELLIOTT, J.; DOWAL, L.; GUPTA, E. REBECCHI, M. J.; SCARLATA, S. Selective interaction of the C2 domain of phospholipase C β 1 and β 2 with activated Gq. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 96: 7843-7846, 1999.

WAY, K. J.; CHOU, E.; KING, G. L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 181-187, 2000.

WELSH, C.; DUBYAK, G.; DOUGLAS, J.G. Relationship between phospholipase C activation and prostaglandin E₂ and cyclic adenosine monophosphate production in rabbit tubular epithelial cells. Effects of angiotensin, bradykinin, and arginine vasopressin. *J Clin Invest.* 81: 710-9, 1988.

WHITTEMBURY, G.; PROVERBIO, F. Two models of Na extrusion in cells from guinea-pig kidney cortex slices. *Pflügers Arch.*, 316: 1-25, 1970.

WILLIAMS, R.L. Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 255-267, 1999.

WINSTEAD, M.V.; BALSINDE, J.; DENNIS, E.A. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 1488: 28-39, 2000.

YANG, T.; SINGH, I.; PHAM, H.; SUN, D.; SMART, A.; SCHNERMANN, J.B.; BRIGGS, J.P. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol.* 274: F481-9, 1998.

YANG, C.H.; MOSIOR, M.; JOHNSON, A.C.; CHEN, Y.; DENNIS, A.E. Group-specific assays that distinguish between the four types of mammalian phospholipase A2. *Analyt. Biochem.* 269: 278-288, 1999a

YANG, H.C.; MOSIOR, M.; NI, B.; DENNIS, E.A. Regional distribution, ontogeny, purification, and characterization of the Ca²⁺-independent phospholipase A2 from rat brain. *J. Neurochem.* 73: 1278–1287, 1999b.

YANAGA, F.; HIRATA, M.; KOGA, T. Evidence for coupling of bradykinin receptors to a guanine-nucleotide binding protein to stimulate arachidonate liberation in the osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *Biochim Biophys Acta.* 1094: 139-46, 1991.

YELLATURU, C.R.; RAO, G.N. A requirement for calcium-independent phospholipase A2 in thrombin-induced arachidonic acid release and growth in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278: 43831-43837, 2003.

XING, M.; POST, S.; OSTROM, R.S.; SAMARDZIJA, M.; INSEL, P.A. Inhibition of phospholipase A2-mediated arachidonic acid release by cyclic AMP defines a negative feedback loop for P2Y receptor activation in Madin-Darby canine kidney D1 cells. *J Biol Chem.* 274: 10035-8, 1999.

XING, M.; TAO, L.; INSEL, P.A. Role of extracellular signal-regulated kinase and PKC alpha in cytosolic PLA₂ activation by bradykinin in MDCK-D1 cells. *Am J Physiol.* 272: C1380-7, 1997.

ZAGER, R.A.; JOHNSON, A.; HANSON, S.; DELA ROSA, V. Altered cholesterol localization and caveolin expression during the evolution of acute renal failure. *Kidney Int.* 61: 1674-83, 2002.

ZHANG, Y.; DONG, C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci.* 64: 2771-89, 2007.

APÊNDICE - ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO

Líbano-Soares, J.D.; Gomes-Quintana, E.; Melo, H.K.; Queiroz-Madeira, E.P.; Roubach, R.G.; Lopes, A.G.; Caruso-Neves, C. B₂ receptor-mediated dual effect of bradykinin on proximal tubule Na⁺-ATPase: Sequential activation of the phosphoinositide-specific phospholipase C β /protein kinase C and Ca²⁺-independent phospholipase A₂ pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1778: 1316-23, 2008.

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](#)