

FERNANDA MAGALHÃES FERRÃO

**“EFEITOS DA ANGIOTENSINA II NA ATIVIDADE
Ca²⁺-ATPásica DAS CÉLULAS LLC-PK₁ MEDIADOS
ATRAVÉS DA MEMBRANA LUMINAL”**

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



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

EFEITOS DA ANGIOTENSINA II NA ATIVIDADE Ca^{2+} -
ATPásica DAS CÉLULAS LLC-PK₁ MEDIADOS ATRAVÉS
DA MEMBRANA LUMINAL

Fernanda Magalhães Ferrão

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

Orientadora: Prof^a. Dra. Jennifer Lowe
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Lucienne da Silva Lara Morcillo

RIO DE JANEIRO
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferrão, Fernanda Magalhães

Efeitos da angiotensina II na atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁ mediados através da membrana luminal/ Fernanda Magalhães Ferrão. Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2010.

102 páginas.

Orientadora: Jennifer Lowe

Co-Orientadora: Lucienne da Silva Lara Morcillo

Dissertação (Mestrado)-UFRJ / IBCCF / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2010.

Referências Bibliográficas: f. 87-102.

1. Angiotensina II; 2. Rim; 3. Ca^{2+} -ATPase; 4. LLC-PK₁; 5. Membrana luminal; 6. Receptores de angiotensina.

I. Lowe, Jennifer (Orientadora).

II. Lara, Lucienne da Silva (Co-Orientadora).

III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica).

IV. Efeitos da angiotensina II na atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁ mediados através da membrana luminal.

Fernanda Magalhães Ferrão

EFEITOS DA ANGIOTENSINA II NA ATIVIDADE Ca^{2+} -ATPásica DAS CÉLULAS LLC-
PK₁ MEDIADOS ATRAVÉS DA MEMBRANA LUMINAL

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA). APROVADA POR:

Prof^a. Dra. Jennifer Lowe (Orientadora)
Prof^a. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof^a. Dr^a. Lucienne da Silva Lara Morcillo (Co-orientadora)
Prof^a. Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas, ICB-UFRJ

Prof^a. Dra. Mariana Souza da Silveira
Prof^a. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof^a. Dra. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves
Prof^a. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas
Prof. Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas, ICB-UFRJ

Prof^a. Dra. Doris Rosenthal (Revisora)
Prof^a. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Rio de Janeiro
2010

Esta dissertação foi desenvolvida entre março de 2008 e fevereiro de 2010 sob a orientação da Prof^a. Jennifer Lowe e co-orientação da Prof^a. Lucienne da Silva Lara Morcillo no Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. O trabalho foi financiado com auxílios concedidos pelas seguintes agências de fomento: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação José Bonifácio (FUJB-UFRJ).

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, que me deu a vida, essa família e namorado tão maravilhosos, e amigos que estão sempre presentes. Porque tenho certeza de que esteve sempre ao meu lado, me confortando e me iluminando, mesmo nos momentos mais difíceis da minha vida.

- Aos meus pais Lílian e Rogério por terem me dado a vida e por fazerem parte dela, tornando cada dia de minha existência maravilhoso! Por me amarem tanto e acreditarem em mim. Por sua honestidade e carinho, que fizeram de mim um ser humano melhor. Por me ensinarem o que é certo e o que é errado, e por terem tanto caráter. Por estarem sempre por perto em todas as horas, boas e ruins, e me darem apoio nas horas tristes e desesperadoras. Por fazerem tudo que eu e a Mari precisamos, sem se importar. Vocês são o meu porto seguro e meu espelho. Tudo o que sou hoje é graças a vocês. Agradeço a Deus por ter me dado pais tão maravilhosos como vocês, não teria nenhum outro melhor! Enfim, obrigada por vocês serem tudo o que eu quero ser um dia. E obrigada por aturarem o meu mau humor, principalmente no final do mestrado!

- A minha irmã Mariana, por alegrar tanto a minha vida e ser tão boba quanto eu. Não imagino minha vida sem você como minha irmã. A gente briga, mas se ama, não é Mari!? Obrigada por ser minha companheira de aventuras e por escutar meus desabafos nas horas que eu mais preciso e por ser minha irmã/amiga/conselheira!

- Ao Rafael Lindoso por ser meu companheiro, amigo, e amor! Obrigada pela calma que você me passa nos momentos de desespero! Não existiria pessoa melhor para mim. Agradeço a Deus todos os dias por ter te encontrado. Obrigada por ser um bom ouvinte e conselheiro, e por me agüentar e estar comigo nos bons e maus momentos. Desculpa pelos erros que eu possa ter cometido ao longo desses 5 anos. Te amo muito pretinho!

- A minha orientadora Jennifer Lowe, pelas horas dedicadas a mim, seja corrigindo a minha dissertação, ou ao longo desses anos todos (e ainda vem mais!) me ensinando como a fazer pesquisa e a me tornar uma cientista cada vez melhor. Por ser essencial a minha formação, pelo carinho e amizade a mim dedicados e pelos puxões de orelha também! rs. Porque ensinar não é só passar a mão na cabeça! Enfim... Obrigada por tudo!

- A minha orientadora Lucienne Lara, pelas palavras e gestos de carinho, por estar sempre disposta a tirar as minhas dúvidas e por me ajudar sempre nessa longa jornada. E por ser amiga, além de orientadora.

- Ao professor Rafael Valverde, porque apesar de ser novo nesse título, está sempre disposto a me ajudar e a tirar dúvidas, além de ser amigo.

- Ao professor Marcelo Einicker por sempre me ajudar quando não tem ninguém mais por perto e por estar sempre de bom humor, tentando alegrar o nosso dia.

- Ao professor Adalberto Vieyra, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, por estar sempre interessado nos meus resultados, tirando todas minhas dúvidas com paciência e sabedoria. Por acreditar no meu trabalho e me dar chances de aumentar meus conhecimentos.

- A mestre Flávia Axelband (que pra mim é minha orientadora também!) por ter me aceitado no seu grupo de angiotensininas, ter me ensinado muita coisa que hoje eu sei (muita mesmo) e por ser uma mãe para mim (apesar de não ter

idade). Como não te chamar de orientadora, se você sempre esteve ao meu lado, me ajudando, acalmando e ensinando. Obrigada Flavinha!

- A amiga Juliana Dias, por me ajudar sempre nas horas que eu mais preciso, contribuindo muito na minha tese com os seus conhecimentos, e apesar de não ser minha aluna, dedica seu tempo para mim sempre que eu preciso.

- As alunas/amigas Luiza Helena, Dayana Freire e Jaíne, por sempre escutarem com atenção o que eu digo, por fazerem um trabalho maravilhoso no laboratório e por serem tão dedicadas.

-As técnicas Glorinha, Rosilane e Andréia, por estarem sempre dispostas quando eu preciso, e por alegrarem meus dias. A amiga Elaine Hilário, que, como o nome já diz, também alegra meus dias, Dayana Araújo, que mesmo não sendo minha aluna, me ajuda com as células, e não podia faltar a amiga Vanessa Baldez, que foi se aproximando aos pouquinhos e já conquistou meu coração, com sua bondade, sinceridade e bom humor!

- A todos os amigos de laboratório, por terem feito parte dessa jornada (e vão continuar fazendo!) e por terem feito dos meus dias de experimentos dias alegres. Muito obrigada pela amizade de todos vocês!

- Ao meu avô querido Manuel, por ter cuidado de mim sempre que meus pais não estavam por perto e pelo amor que você tem pelos seus netos. Quando lembro da minha infância, não posso deixar de lembrar de você. A sua casa sempre foi a minha segunda casa. Depois de crescida, descobri que meu avô é mais maravilhoso do que eu pensava, tão inteligente e bem humorado! Obrigada por se preocupar tanto comigo! Te amo muito vovô!

- A minha avó Zuleika, por também cuidar de mim quando meus pais viajavam por me receber de braços abertos quando eu para sua casa, por fazer o melhor feijão do mundo e todas as outras delícias que você cozinha! Obrigada por me alegrar sempre com sua presença, sua graça e bom humor, por se preocupar tanto com seus netos, sempre dando aquela ajudinha preciosa. Te amo muito vovó!

- Ao meu avô Maneco, que infelizmente nos deixou cedo e faz muita falta. Queria muito poder ter te conhecido melhor.

- A minha vizinha Madalena, que infelizmente nos deixou recentemente, por, assim como o vovô cuidar sempre de mim e minha irmã enquanto meus pais trabalhavam e por fazer de minha infância tão maravilhosa! Pode ter certeza que você é muito amada vovó!

- Aos meus tios e primos por alegrarem meus Natais, aniversários, férias, e outras tantas datas mais e por fazerem parte da minha vida.

- A todos os meus amigos, mas principalmente à Natália, Pedro e Vinícius, por estarem sempre presentes em minha vida e me fazerem rir, mesmo quando o mundo desaba em mim. Obrigada por todos os cinemas, pizzas, etc.

- A Professora Doris Rosenthal pela revisão dessa dissertação.

- Aos componentes da banca examinadora desta dissertação, que aceitaram avaliar meu trabalho, os professores Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves, Mariana Souza da Silveira e Luis Eduardo Menezes Quintas.

RESUMO

A angiotensina II (Ang II), um hormônio peptídico importante para as funções renais e cardiovasculares, é encontrada no interstício renal e no lúmen tubular em concentrações mais elevadas que a sistêmica. Nesses compartimentos, a Ang II estimula sinais intracelulares dependentes de Ca^{2+} , que estimulam a reabsorção de solutos e água.

Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram os efeitos deste hormônio em frações de membrana basolateral de túbulos renais, porém pouca informação é descrita na célula íntegra ou na membrana voltada para o lúmen tubular, onde possivelmente as altas concentrações de Ang II exerceriam papel essencial na regulação de solutos e água.

Desta forma, o objetivo principal desta dissertação foi investigar os efeitos da Ang II através da membrana luminal, avaliando a via de sinalização celular em resposta ao estímulo hormonal. Investigou-se o efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica de células LLC-PK₁, analisando os efeitos nas duas bombas de Ca^{2+} , PMCA e SERCA, identificando os receptores e proteína cinase envolvidos nesta resposta.

A Ang II modula a atividade Ca^{2+} -ATPásica dessas células via membrana luminal de maneira bifásica, estimulando a atividade em baixas concentrações (10^{-14} M a 10^{-10} M), mas não em altas concentrações (10^{-8} M a 10^{-6} M). Esse resultado é devido a regulação específica da atividade da SERCA, pois a PMCA não foi modulada por nenhuma concentração de Ang II, em nenhum tempo de incubação. O estímulo produzido na SERCA é rápido (30 seg) e persistente (30 min). A expressão dos receptores de angiotensina AT₁ e AT₂ nessas células e a formação de heterodímeros AT₁/AT₂ foi detectada. O efeito da Ang II na SERCA foi revertido na presença tanto de losartan, quanto de PD123319 (antagonistas de receptores AT₁ e AT₂, respectivamente), indicando que esse peptídeo atua via heterodímeros AT₁/AT₂ para estimular a atividade da SERCA. Foi demonstrado, também, que este estímulo é dependente de PKC.

Assim, a SERCA é a ATPase alvo da Ang II luminal para regular a homeostasia do Ca^{2+} no túbulo proximal e, sendo esse estímulo persistente, trata-se de uma importante forma de controlar as concentrações de Ca^{2+} intracelulares, no qual heterodímeros AT₁/AT₂ são essenciais. A Ang II possui diferentes formas de regulação sobre as bombas de Ca^{2+} , dependendo da membrana em que atua, visto que ela estimula a atividade da SERCA via membrana luminal e, conforme demonstrado nos resultados prévios, inibe a atividade da PMCA via membrana basolateral. O estímulo persistente da SERCA pela Ang II luminal pode ser uma forma de evitar a exacerbação dos efeitos desse hormônio, ou de aumentar o estoque de Ca^{2+} para uma resposta mais eficiente ao estímulo do agonista. Além de ser importante para regular o Ca^{2+} intracelular, conhecido segundo mensageiro, o estímulo prolongado da SERCA também seria uma forma de aumentar a reabsorção desse íon para o organismo pelas células do túbulo proximal.

ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II), an important peptide hormone for renal and cardiovascular functions, is found in renal interstitium and tubular lumen at higher concentrations than systemic Ang II. In these compartments, Ang II elicits Ca^{2+} -dependent intracellular signaling that stimulates solute and fluid reabsorption.

Previous results from our laboratory demonstrated the hormone effects on renal tubule basolateral membrane fractions, nevertheless there are few information described for intact cells or luminal side membrane, where high concentration of Ang II probably play an essential role on solute and water regulation.

In this way, the main objective of this study was to investigate Ang II effects mediated by the luminal membrane, evaluating cellular signaling pathway in response to hormonal stimulus. The Ang II effect on Ca^{2+} -ATPase activity from LLC-PK₁ cells was investigated, analyzing its effects on the two Ca^{2+} pumps, PMCA and SERCA, identifying the receptors and protein kinase involved in this response.

Ang II modulates Ca^{2+} -ATPase activity from these cells via luminal membrane in a biphasic manner, stimulating the activity in low concentrations (10^{-14} M a 10^{-10} M), and with no effect in high concentrations (10^{-8} M a 10^{-6} M). This result is due to specific SERCA activity regulation, because PMCA was not modulated in either Ang II concentrations or incubation times. SERCA stimulus is rapid (30 seg) and persistent (30 min). The expression of AT₁ and AT₂ angiotensin receptors was detected in these cells as was AT₁/AT₂ heterodimers formation. Ang II effect on SERCA was reverted in the presence of both losartan and PD123319 (AT₁ and AT₂ receptors antagonists, respectively), indicating that this peptide acts via AT₁/AT₂ heterodimers to stimulate SERCA activity. This stimulus involves PKC regulatory phosphorylation.

In conclusion, SERCA is the target ATPase from luminal Ang II to regulate Ca^{2+} homeostasis in the renal proximal tubule, and as long as it is a persistent stimulus, it is an important way to control Ca^{2+} intracellular concentration, where AT₁/AT₂ are essential. Ang II regulates differently Ca^{2+} pumps, depending on the membrane involved, stimulating SERCA activity via luminal membrane and, as observed in previous results, inhibiting PMCA activity via basolateral membrane. The persistent luminal Ang II stimulus on SERCA can be a way to avoid the exacerbation of this hormone effects, or to increase Ca^{2+} intracellular store for a more efficient response to agonist stimulus. Besides its importance on regulating intracellular Ca^{2+} , an important second messenger, prolonged SERCA stimulus also would be a way to increase this ion reabsorption to the organism by proximal tubule cells.

ABREVIATURAS

AMPc: Adenosina 3',5' monofosfato cíclico

Ang I : Angiotensina I

Ang-(1-4) : Angiotensina-(1-4)

Ang-(1-5) : Angiotensina-(1-5)

Ang-(1-7) : Angiotensina-(1-7)

Ang II : Angiotensina II

Ang III : Angiotensina-(2-8)

Ang IV : Angiotensina-(3-8)

Ang-(3-4) : Angiotensina-(3-4)

Ang-(4-8) : Angiotensina-(4-8)

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

CAMK : Proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina

CPP : Carboxipeptidase P

DAG : Diacilglicerol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ECA : Enzima conversora de angiotensina

EDTA: Ácido etileno dinitrito tetraacético

EGTA: Ácido etilenoglicol-bis(amino etil éter)-N, N'tetraacético

GMPc : Guanidina monofosfato cíclico

GPCR : Receptores acoplados a proteína G

GRKs : Cinases de receptor acoplado a proteína G

HPLC : Cromatografia líquida de alta resolução

IP3 : Inositol trifosfato

JAK2 : Janus cinase 2

LLC-PK₁ : Linhagem celular de células epiteliais renais derivadas de túbulo proximal de porco

MAPK : Proteínas cinases ativadoras de mitose

MKP-1 : Proteína cinase fosfatase

NEP : Nephilisina

NO : Óxido nítrico

PD123319 : S-(+)-1-([4-(Dimethylamino)-3-methylphenyl]methyl)-5-(diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo(4,5-c)pyridine-6-ácido carboxílico

Pi :Fosfato inorgânico
PIP2 : Fosfoinosítido bifosfato
PKA : Proteína cinase A (dependente de AMPc)
PKC : Proteína cinase C
PLB : Fosfolamban
PLC : Fosfolipase C
PLA2 : Fosfolipase A2
PLD : Fosfolipase D
PMCA : Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática
PO : Proliloligopeptidase
PP2A : Serina/treonina fosfatase 2A
PRCP : Prolilcarboxipeptidase
SERCA : Ca²⁺-ATPase de retículo endosarcoplasmático
SFB : Soro fetal bovino
SLN : Sarcolipina
SHR : Ratos espontaneamente hipertensos
SRA : Sistema renina-angiotensina
STATs : Transdutores de sinal e ativadores da transcrição
TO : Thimet-oligopeptidase

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OS RINS E SUA IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA.....	1
TRANSPORTE DE ÂNIOS E SOLUTOS NO TÚBULO PROXIMAL.....	6
O ÍON Ca^{2+} E AS Ca^{2+} -ATPASES.....	10
HISTÓRICO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA).....	23
O SRA ATUAL.....	28
RECEPTORES DE ANGIOTENSINA.....	32
SRA INTRARENAL.....	40
RESULTADOS PRÉVIOS.....	44
OBJETIVOS.....	45
OBJETIVO GERAL.....	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
CULTURA DE CÉLULAS EPITELIAIS RENAIAS.....	47
TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA II E FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS EM CÉLULAS LLC- PK ₁	47
DOSAGEM DE ATIVIDADE DA Ca^{2+} -ATPASE DAS CÉLULAS LLC-PK ₁	49
IMUNOPRECIPITAÇÃO E WESTERN BLOTTING PARA DETECÇÃO DE AT ₁ E AT ₂ NAS CÉLULAS LLC-PK ₁ E A PRESENÇA DE HETERODÍMERO AT ₁ / AT ₂	50
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
RESULTADOS.....	52
EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA ATIVIDADE Ca^{2+} -ATPÁSICA TOTAL DAS CÉLULAS LLC-PK ₁	52
EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA ATIVIDADE DAS DUAS BOMBAS DE CÁLCIO DAS CÉLULAS LLC- PK ₁ : PMCA E SERCA.....	54
CURSO TEMPORAL DO EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA ATIVIDADE Ca^{2+} -ATPÁSICA TOTAL, PMCA E SERCA.....	57

ANÁLISE DO RECEPTOR ENVOLVIDO NO EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA ATIVIDADE DA SERCA DAS CÉLULAS LLC-PK ₁	59
IDENTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II AT ₁ E AT ₂ NAS CÉLULAS LLC-PK ₁ E A POSSÍVEL FORMAÇÃO DE HETERODÍMEROS	62
ANÁLISE DA VIA ATIVADA POR ANGIOTENSINA II PARA PROMOVER SEUS EFEITOS NA ATIVIDADE CA ²⁺ -ATPÁSICA DAS CÉLULAS LLC-PK ₁	66
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	83
PERSPECTIVAS FUTURAS	85
REFERÊNCIAS	87

Introdução

Os rins e sua importância fisiológica

Um animal é composto de diversos órgãos e sistemas, cujo bom funcionamento é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia do meio interno. Cada um possui diferentes funções e mecanismos de regulação que permitem que o organismo passe por diferentes situações sem alterar seu equilíbrio. Um dos principais mecanismos de regulação de um sistema são os hormônios, substâncias químicas produzidas em glândulas endócrinas, liberadas na corrente sanguínea e com efeitos fisiológicos longe do local de liberação. Em uma visão mais recente, estas mesmas substâncias químicas podem ser produzidas em células de tecidos não glandulares com função, além de endócrina, parácrina, autócrina e intrácrina (Re, 2003; Re & Cook, 2006). De uma forma abrangente, os hormônios são moléculas sinalizadoras que agem em praticamente todos os tipos celulares do organismo, com função de assegurar a homeostasia do meio interno (Machado, U.F. *in* Mello-Aires, 2008).

O rim é um órgão que contribui diretamente para a homeostasia do organismo, visto que ele responde de maneira específica a alterações de volume e composição do meio interno, assegurando a preservação da integridade funcional dos diferentes tecidos, órgãos e sistemas do organismo (Guyton & Hall, 2002). Muitas dessas respostas são especificamente moduladas por hormônios produzidos pelo próprio rim ou advindos da corrente sanguínea (Katz & Lindheimer, 1977).

A importância da função renal pode ser vista, primeiramente, pela quantidade de plasma que lhe é oferecida. Os rins são órgãos altamente vascularizados e recebem aproximadamente 25% do débito cardíaco (Mello-Aires, 2008a), apesar de corresponder a somente 0,5% do peso corpóreo. Além da excreção de produtos metabólicos e substâncias estranhas, os rins desempenham outras funções como a endócrina. Apesar de não serem glândulas, eles contribuem para a secreção de 1,25 diidroxicalciferol (hormônio envolvido na reabsorção de cálcio no túbulo renal e no depósito de cálcio no osso), eritropoetina (um fator de crescimento com ação única e específica de estimular a medula óssea a produzir glóbulos vermelhos), renina (enzima que dá início a cascata de proteólise do Sistema Renina Angiotensina – SRA - e que será discutida mais adiante) e a própria Angiotensina II (Ang II), visto que já foi demonstrado a presença dos componentes do sistema SRA nas células renais e a síntese de Ang II local (Yanagawa *et al.*, 1991; Guyton & Hall, 2002; Prieto-Carrasquero *et al.*, 2009).

A unidade funcional dos rins, responsável pelos processos de filtração, reabsorção e secreção, é o néfron. O rim humano é composto de cerca de 1 milhão de néfrons (Figura 1). Essa unidade tem início no glomérulo, um emaranhado de capilares envoltos pela cápsula de Bowman e continua com um extenso segmento tubular, formado por uma única camada de células epiteliais, até chegar ao ureter. Cada segmento tubular apresenta um tipo de célula epitelial diferente resultando numa função característica e específica de transporte de solutos e água (Guyton & Hall, 2002). Estes segmentos são divididos, então, de acordo com a composição celular em túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (Figura 1).

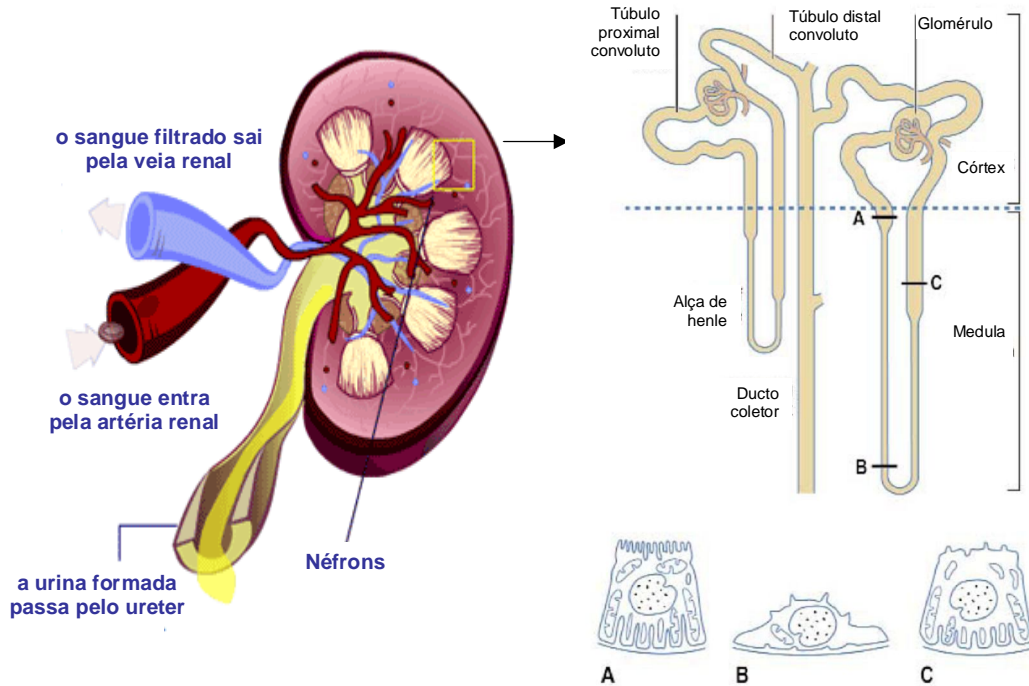


Figura 1. Esquema representando a anatomia do rim, explicitando a vascularização e a formação da urina. Em destaque a representação esquemática do néfron, a unidade funcional do rim, descrevendo os segmentos do néfron e sua posição em relação a região mais externa (córTEX) e mais interna (medula) do rim. As letras A, B e C representam as características de ultra-estrutura das células ao longo do néfron (túbulo proximal reto, ramo fino da alça de Henle e ramo ascendente espesso da alça de Henle, respectivamente) (Retirado de http://www.kidney.org.au/assets/images/kidney_still2.gif e Davies *et al.*, 2001).

Outra estrutura importante dos rins é o aparelho justaglomerular (Figura 2). A alça tubular de cada néfron se dispõe de tal forma que o túbulo distal convoluto entra em contato com a arteríola aferente e eferente (responsáveis respectivamente pela entrada e saída do sangue no néfron). Nesse ponto, as células da arteríola aferente são conhecidas como células justaglomerulares e as células do túbulo distal de células da mácula densa. O aparelho justaglomerular é o responsável pela liberação da renina na circulação (Mello-Aires, 2008b).

O sangue é filtrado no glomérulo, formando o ultrafiltrado, que percorre os segmentos tubulares seguintes, onde ocorrerão processos de reabsorção (de água e solutos necessários ao organismo que retornam ao sangue) e processos de secreção (no qual solutos em excesso no organismo são adicionados à luz do túbulo para serem excretados na urina). No final desses segmentos a urina estará formada. Dos 600 mL de plasma que chegam aos rins por minuto, 120 mL são filtrados nos glomérulos. Apesar do grande volume de ultrafiltrado formado, em condições fisiológicas, apenas 1-2 mL de urina é eliminada pelo organismo por minuto. Isto garante que sejam excretados apenas substâncias desnecessárias ao organismo, sem que haja grandes alterações na composição e volume do meio extracelular (Mello-Aires, 2008a). Em condições nas quais ocorre alteração no meio interno como, por exemplo, aumento da ingestão de Na^+ , que promove um aumento do volume extracelular, há aumento na natriurese e diurese, re-estabelecendo os valores fisiológicos (Mello-Aires, 2008c).

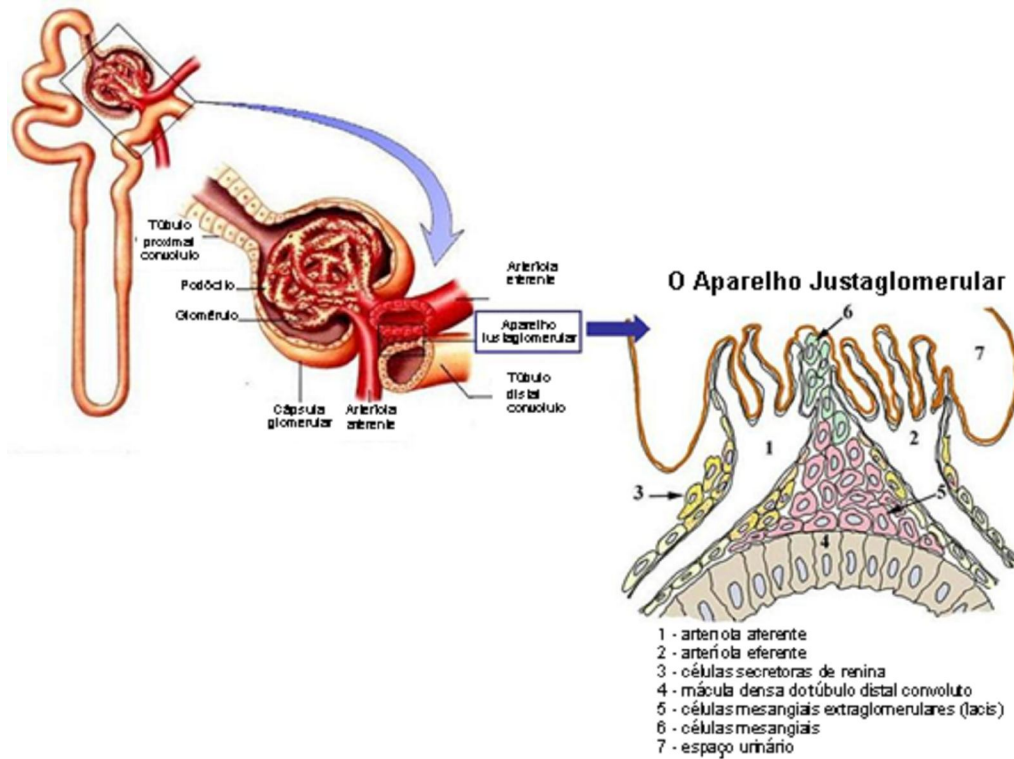


Figura 2. Representação esquemática do aparelho justaglomerular. O ponto de contato entre o túbulo distal convoluto e a arteriola aferente e eferente de cada néfron leva a formação do aparelho justaglomerular. Nesse ponto, as células do túbulo distal são conhecidas como células da mácula densa e as células da arteriola aferente, responsáveis por produzir e secretar a renina na circulação, são chamadas de células justaglomerulares (Adaptado de www.med.mun.ca/anatomyts/renal/akid3.htm e www2j.biglobe.ne.jp/~fkamiya/HB/C09_57.html).

Transporte de ânions e solutos no túbulo proximal

O túbulo proximal, primeiro segmento tubular e o modelo experimental utilizado no presente trabalho, é formado por epitélio cúbico simples. As células do epitélio tubular são unidas por junções do tipo aderentes (“tight junctions”) (Davies *et al.*, 2001), que são domínios especializados de membrana, que criam uma barreira seletiva à passagem paracelular de água e solutos pelo epitélio. Essa reabsorção que ocorre entre as células é conhecida como via paracelular, é passiva e resulta de difusão, eletrodifusão, ou osmose (Anderson, 2001). Estas junções permitem que a membrana plasmática se torne polarizada, sendo dividida em duas porções: a membrana luminal ou apical e a membrana basolateral. A membrana apical está voltada para a luz tubular e apresenta numerosas microvilosidades (borda em escova), aumentando sua superfície de contato e, conseqüentemente, sua área de reabsorção. A membrana basolateral está voltada para o interstício e apresenta invaginações, o que a aproxima de mitocôndrias localizadas no citosol, indicando uma elevada taxa de transporte ativo primário nessa membrana das células do túbulo proximal (Davies *et al.*, 2001). Além das diferenças na estrutura, estas membranas apresentam composição de transportadores e redes regulatórias diferentes, já que as junções aderentes evitam a difusão lateral dos constituintes da membrana (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003) (Figura 3).

Além da reabsorção via paracelular, os solutos também podem ser reabsorvidos via transcelular (através das células). As junções aderentes, e conseqüentemente a polarização das células desse segmento, permite que a membrana basolateral contenha ATPases, enzimas que bombeiam o íon contra o

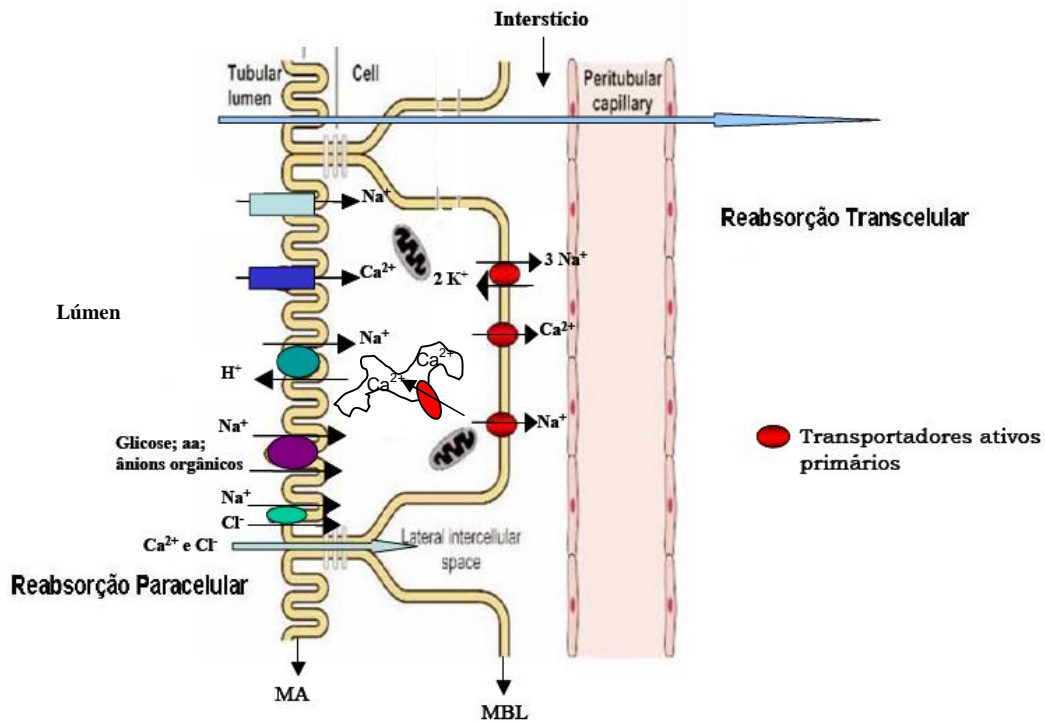


Figura 3. Mecanismo de reabsorção de solutos no túbulo proximal. Esse mecanismo pode ocorrer por duas vias: a paracelular, que ocorre entre as células e a via transcelular, que ocorre através das células. Nesta última via, os solutos atravessam duas barreiras: a membrana luminal e a membrana basolateral. Esse transporte vetorial é dependente de ATPases (em vermelho) que geram um gradiente eletroquímico, favorecendo a entrada luminal de solutos por meio de canais iônicos ou transportadores ativos secundários presentes, exclusivamente, na membrana luminal (Adaptado de Davies *et al.*, 2001).

seu gradiente de concentração, utilizando a energia resultante da hidrólise do ATP. Já a membrana luminal é composta de canais iônicos e transportadores ativos secundários (que não utilizam energia provinda diretamente da hidrólise do ATP e sim pela energia vinda do gradiente eletroquímico gerado pela ATPase, já que os íons vão à favor do seu gradiente de concentração). Essa distribuição dos transportadores nas membranas das células epiteliais permite o transporte vetorial dos diferentes íons no túbulo proximal, já que, em linhas gerais, as ATPases da membrana basolateral criam um gradiente eletroquímico favorável à entrada dos solutos pela membrana luminal através dos canais iônicos e/ou transportadores ativos secundários (Figura 3) (Mello-Aires, 2008c).

A maior parte da reabsorção de Na^+ (cerca de 2/3) ocorre no túbulo proximal pela via transcelular. As duas bombas de sódio, a $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ e a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, localizadas na membrana basolateral (Férraille & Doucet, 2001; Caruso-Neves *et al.*, 2002), bombeiam o Na^+ do citoplasma para o interstício criando um gradiente eletroquímico favorável à entrada de Na^+ pela membrana apical através do trocador $\text{Na}^+\text{/H}^+$, do co-transporte com glicose, aminoácidos, sulfato, fosfato e ânions orgânicos (Férraille & Doucet, 2001) e de canais iônicos sensíveis a amilorida (Willmann *et al.*, 1997).

A reabsorção de água acompanha a reabsorção de Na^+ através das células, pelas aquaporinas, canais de água presentes nas membranas apical e basolateral, que permitem que a água seja reabsorvida do ultrafiltrado de volta aos capilares peritubulares (Nielsen *et al.*, 2002).

Diversos hormônios e autacóides que regulam a atividade das bombas de Na^+ no túbulo proximal contribuem para o processo de reabsorção de água e manutenção do volume extracelular. Um exemplo é a Ang II que aumenta a

atividade de ambas ATPases de Na^+ e conseqüentemente de água, aumentando o volume extracelular (Rangel *et al.*, 1999; Caruso-Neves *et al.*, 2000; Féraille & Doucet, 2001; Lara *et al.*, 2002; Rangel *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2006).

Já o íon Ca^{2+} é reabsorvido nesse segmento do néfron principalmente pela via paracelular, cerca de 2/3, cabendo à via transcelular apenas 1/3 da reabsorção. O gradiente eletroquímico favorável à entrada de Ca^{2+} via canais iônicos presentes na membrana luminal (Bronner *et al.*, 1989; Friedman, 2000) é favorecido graças ao gradiente eletroquímico gerado por um transportador ativo primário. Nesse caso a Ca^{2+} -ATPase presente na membrana basolateral (PMCA) bombeia esse íon do citoplasma para o interstício e mantém as concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} baixas (Vieyra, 1996). Além disso, há seqüestro desse cátion para estoques intracelulares, como o retículo endoplasmático e mitocôndrias (Carafoli & Brini, 2000) (Figura 3). No caso do retículo, a Ca^{2+} -ATPase responsável por bombear o Ca^{2+} do citoplasma para dentro dessa organela, contra seu gradiente de concentração, é denominada SERCA. O gradiente eletroquímico é mantido também graças a proteínas citoplasmáticas de ligação ao Ca^{2+} , que mantêm baixas as concentrações do íon livre dentro da célula. Esse fato é importante por três razões: (1) favorece a reabsorção do Ca^{2+} do ultrafiltrado de volta para os capilares sanguíneos (contribuindo para a homeostasia do Ca^{2+}); (2) permite a mobilização intracelular de Ca^{2+} somente quando necessário, ativando vias intracelulares que dependem desse íon como segundo mensageiro; (3) manutenção da atividade basal dos transportadores Na^+ , uma vez que estes podem ser mediados por vias ativadas por Ca^{2+} .

Além do Na^+ e do Ca^{2+} , outros íons e solutos são reabsorvidos no túbulo proximal: K^+ , Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^- cerca de 70%, além da glicose e aminoácidos

(totalmente reabsorvidos). Fica evidente que o túbulo proximal é o segmento do néfron onde ocorre a reabsorção de grande parte do ultrafiltrado recém formado no glomérulo (Mello-Aires, 2008c). Apesar de não ser o segmento responsável pelo ajuste fino da composição e do volume da urina, pequenas alterações no processo de reabsorção nesse segmento podem ocasionar grandes distúrbios no conteúdo e volume do meio extracelular, e estar associadas a algumas patologias, como a hipertensão essencial e a insuficiência cardíaca congestiva (Doris, 2000; Semplicini *et al.*, 2002; Zhou & Frohlich, 2007).

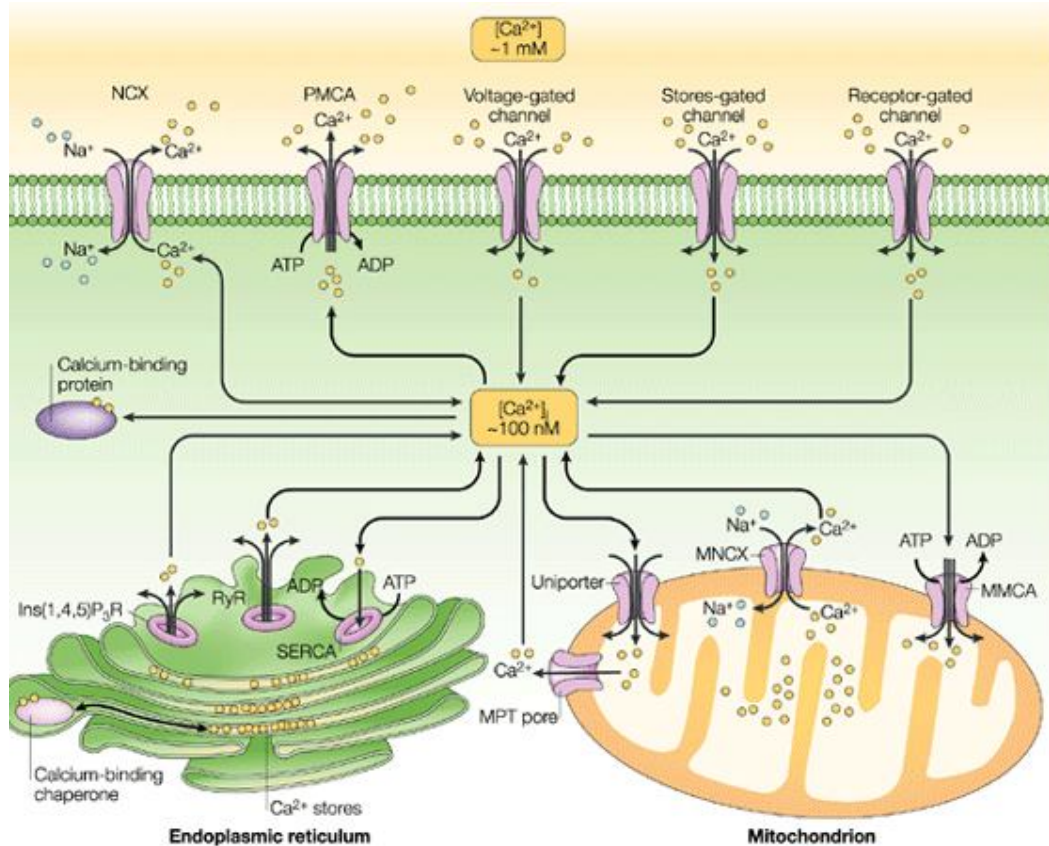
O íon Ca^{2+} e as Ca^{2+} -ATPases

Pelo cálcio ser o cátion de interesse no presente trabalho, se faz necessário um maior detalhamento sobre sua função e homeostasia. O íon Ca^{2+} é o mineral mais abundante do corpo humano. Sua primeira função conhecida foi a de constituir dentes e ossos, nos quais sua função era dita como apenas estrutural. Nos ossos, o Ca^{2+} é de grande importância, sendo que sua falta leva a doenças como o raquitismo, a osteomalácia e a osteoporose. Com o passar dos anos, o Ca^{2+} passou a ser considerado de íon com apenas funções estruturais, para íon essencial em diversas funções do organismo, em ambos meios extra e intracelular. Nesses compartimentos sua concentração é estritamente regulada. A variação desta concentração promove a ativação de vários processos (Carafoli, 1987). Por exemplo, no meio extracelular o aumento da concentração plasmática de Ca^{2+} promove a ativação de cascatas relacionadas com o processo de coagulação sanguínea. Já no meio intracelular, este íon está envolvido no acoplamento estímulo-resposta celular, como observado na contração muscular e liberação de neurotransmissores. O estímulo às células musculares ou neuronais

leva à liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares, ou sua entrada pela membrana plasmática, o que estimula a contração das fibras musculares e libera os neurotransmissores, respectivamente (Guyton & Hall, 2002).

No meio intracelular, a concentração de Ca^{2+} se mantém baixa devido: (1) ao tamponamento por proteínas de ligação ao cálcio intracelular e (2) armazenamento em estoques intracelulares. O íon Ca^{2+} é considerado um importante segundo mensageiro. A partir de um sinal extracelular (um hormônio, por exemplo) o cálcio armazenado é rapidamente liberado no citoplasma desencadeando diferentes respostas celulares (Carafoli, 1987; Guyton & Hall, 2002) (Figura 4). Essas respostas ocorrem porque algumas enzimas são ativadas pela ligação do Ca^{2+} e regulam respostas celulares críticas como, por exemplo secreção de hormônios, transcrição gênica, mitose e contração dos filamentos de actina/miosina (Malnic, G. *in* Mello-Aires, 2008; Yucha & Guthrie, 2003) (Figura 4).

A manutenção da concentração de Ca^{2+} extracelular é de fundamental importância para o correto funcionamento dos processos dos quais este íon participa. Sendo assim, o balanço de Ca^{2+} varia de acordo com a quantidade do íon absorvida pelo trato gastrointestinal e excretada pelos rins, e se mantém constante, pois a quantidade de cálcio ingerido, normalmente, é igual à soma da quantidade perdida nas fezes e da excretada na urina. Este balanço é regulado em três diferentes locais do organismo, o osso, o intestino e os rins (Yucha & Guthrie, 2003).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 4. Homeostasia intracelular do íon Ca^{2+} . A concentração intracelular do íon Ca^{2+} é precisamente regulada de forma que a sua concentração na forma livre seja 100 nM, enquanto no meio extracelular é de 1 mM. Após a ativação de um sinal externo, a concentração intracelular de Ca^{2+} aumenta por meio do influxo deste íon advindo do meio externo por meio de canais iônicos (canais operados por voltagem, ligante ou concentração) ou por meio da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (retículo endoplasmático e mitocôndrias). Ao término do sinal, o Ca^{2+} retorna aos seus estoques intracelulares, via Ca^{2+} -ATPase de retículo sarco-endoplasmático (SERCA), ou é removido da célula através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (PMCA). Voltage-gated channel, canais operados por voltagem; stores-gated channel, canais operados por “reserva”; receptor-gated channel, canais regulados por ligantes; ATP, adenosina 5'-trifosfato; ADP, adenosina 5'-difosfato; calcium-binding protein, proteínas de ligação ao cálcio; RyR, receptor de rianodina; Ins(1,4,5) P_3 R, receptor de inositol 1,4,5-trifosfato; MMCA, Ca^{2+} -ATPase de membrana de mitocôndria; MNCX, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de mitocôndria; MPT pore, poro de transição de permeabilidade mitocondrial (retirado de Syntichak e Tavernarakis, 2003).

Os rins possuem um importante papel na manutenção do balanço de Ca^{2+} , regulando sua excreção do corpo. Aproximadamente 50% de Ca^{2+} plasmático se encontra na forma ionizada ou ionizável (o restante se encontra complexada a proteínas plasmáticas) e, por conseguinte, esta é a parcela que pode ser filtrada no glomérulo. Em condições normais, cerca de 99% do Ca^{2+} filtrado são reabsorvidos pelos túbulos: aproximadamente 70% no túbulo proximal, 20% na alça de Henle, e 4-9 % no túbulo distal e túbulos coletores (Mello-Aires, 2008c).

A manutenção das baixas concentrações de Ca^{2+} intracelular nas células do túbulo proximal é importante para a reabsorção desse íon. Porém, além disso, o Ca^{2+} em baixa concentração intracelular permite que as vias que dependem desse íon como segundo mensageiro sejam ativadas somente quando há o estímulo e o conseqüente aumento desse íon no citoplasma.

O aumento de Ca^{2+} intracelular em resposta a determinados estímulos é devido ao aumento da entrada de Ca^{2+} extracelular ou de sua liberação dos estoques intracelulares, e, para que haja uma melhor resposta, as Ca^{2+} -ATPases dessas células têm suas atividades reguladas por diferentes estímulos (Assunção-Miranda *et al.*, 2005; Axelband *et al.*, 2009a). Altas concentrações de Ca^{2+} intracelular podem ser deletérias à célula, ativando processos como a apoptose, por exemplo. Sendo assim, são necessários mecanismos para a recuperação dos níveis de Ca^{2+} basais, como a extrusão de Ca^{2+} para o meio extracelular ou a recuperação dos estoques intracelulares. Os aumentos do Ca^{2+} intracelular podem ser na forma de picos rápidos e elevados (em respostas rápidas, como na liberação de neurotransmissores) ou como ondas rápidas e repetitivas (em respostas lentas, como na mitose) (Berridge *et al.*, 2003).

O aumento de Ca^{2+} intracelular leva o estímulo de vias de sinalização que dependem desse íon como segundo mensageiro através do estímulo de enzimas que são ativadas quando ligadas ao Ca^{2+} . Exemplo de enzima de sinalização celular que é ativada por Ca^{2+} é a proteína cinase C (PKC), que apresenta inúmeras isoformas. No caso, as PKCs clássicas (PKC α , PKC β , PKC γ), possuem domínios C2 de ligação ao Ca^{2+} (Parker & Murray-Rust, 2004), e são ativadas por essa ligação, levando a respostas celulares variadas, como modulação de ATPases, proliferação, diferenciação, apoptose, dentre outras (Alberts *et al.*, 2002). Outro exemplo de enzima ativada por Ca^{2+} é a proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina (CAMK), que sofre uma mudança conformacional após a ligação a Ca^{2+} /calmodulina, passando adiante o sinal iniciado pelo aumento de Ca^{2+} (Hook & Means, 2001).

Como dito anteriormente, a principal via de sinalização estimulada por Ang II ocorre via Ca^{2+} intracelular e vias estimuladas por ele, inclusive já foi descrito que a Ang II intracelular também leva à mobilização de Ca^{2+} no citoplasma, seja provindo do meio extracelular (De Mello, 1998; Eto *et al.*, 2002) ou dos estoques intracelulares (Zhuo *et al.*, 2006). Muitos dos efeitos de Ang II no transporte de Na^+ e, conseqüentemente, de água no túbulo proximal ocorrem via aumento de Ca^{2+} intracelular e ativação da PKC. Já foi demonstrado que a (Na^+ + K^+)-ATPase é sensível às mudanças do Ca^{2+} intracelular, e que a fosforilação dessa ATPase é dependente de Ca^{2+} e PKC (Ibarra *et al.*, 2002). Além disso, a outra importante bomba de Na^+ renal, a Na^+ -ATPase tem sua atividade estimulada por Ang II pela via AT_1 /PKC (que é dependente de Ca^{2+}) (Rangel *et al.*, 2002).

Uma das formas de controlar a concentração de Ca^{2+} intracelular é através da regulação das atividades das Ca^{2+} -ATPases. Existem duas Ca^{2+} -ATPases

principais, amplamente distribuídas em praticamente todas as células eucarióticas: a PMCA e a SERCA. No caso do túbulo proximal renal, a PMCA (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase), está presente exclusivamente na membrana basolateral e a SERCA [SR (sarcoplasmic reticulum)/ER (endoplasmic reticulum) Ca^{2+} -ATPase] no retículo. A SERCA participa do transporte em massa do Ca^{2+} , enquanto a PMCA faz o ajuste fino de suas concentrações (Strehler *et al.*, 2007). Ambas são membros da família das P-ATPases, pertencendo a subfamília tipo II. As P-ATPases estão, em sua maioria, envolvidas com o transporte ativo de cátions através de membranas biológicas, incluindo a PMCA, SERCA, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, Na^+ -ATPase e as H^+ -ATPases (Axelsen & Palmgren, 1998). Elas utilizam a energia da hidrólise do ATP para transportar íons contra o gradiente de concentração, formando um intermediário fosforilado no resíduo de ácido aspártico durante o ciclo catalítico, e são inibidas por vanadato (inibidor não específico das P-ATPases) (Vieyra *et al.*, 1986; East, 2000).

Durante o ciclo catalítico, essas enzimas apresentam dois estados conformacionais principais, E_1 e E_2 , sendo o Ca^{2+} o ativador e o Mg^{2+} é o co-fator necessário à atividade da enzima. A enzima se liga ao Ca^{2+} com alta afinidade na conformação E_1 , sofrendo alterações conformacionais, favorecendo a ligação com alta afinidade do ATP complexado ao Mg^{2+} . A ligação β , γ do ATP é quebrada (Pickart & Jencks, 1984; Jencks, 1989; Jencks, 1995) e a fosforila γ -terminal é transferida para o resíduo de ácido aspártico no sítio catalítico da enzima (Shull & Greeb, 1988), formando o complexo $\text{Ca}^{2+}E_1\text{-P}$, intermediário fosforilado característico das P-ATPases. A enzima, então, sofre uma nova mudança conformacional, transitando para uma fosfoenzima de baixa energia com baixa afinidade para o Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}E_2\text{-P}$), permitindo o transporte e a liberação do Ca^{2+}

no meio extracelular (PMCA) ou no retículo (SERCA). Após a liberação do Ca^{2+} , a fosfoenzima se torna suscetível ao ataque nucleofílico da água, o que leva a desfosforilação para o estágio E_2 , permitindo que a enzima seja regenerada para um novo ciclo, transitando da forma E_2 para a E_1 através de uma mudança conformacional acelerada pelo ATP, completando assim seu ciclo (De Meis & Carvalho, 1976) (Figura 5).

A estrutura comum de todas as Ca^{2+} -ATPases compreende a presença de dez segmentos transmembrana com suas porções $-\text{NH}_2$ e $-\text{COOH}$ terminais voltadas para o lado intracelular da membrana, sendo que mais da metade de sua massa está voltada para o lado citoplasmático. A PMCA de túbulos proximais tem peso molecular de aproximadamente 140 kDa (Gmaj *et al.*, 1983) e já foi demonstrado, pelo nosso laboratório, que está localizada exclusivamente em cavéolas (Tortelote *et al.*, 2004). Possui baixa capacidade de transporte e alta afinidade por Ca^{2+} . Existem quatro isoformas conhecidas da PMCA expressas em mamíferos: PMCA 1, PMCA 2, PMCA 3 e PMCA 4. Além disso, essas isoformas podem sofrer “splicing” alternativos, levando a formação de cerca de 20 variantes de PMCA (Strehler & Zacharias, 2001). Esses “splicings” podem levar a variação de domínio de ligação a calmodulina, domínio fosforilado por proteínas cinases e domínio responsivo a fosfolípídeos ácidos, levando à formação de diferentes PMCAs, com diferentes características e mecanismos regulatórios. Por exemplo, as PMCAs 2 e 3, que são expressas em células excitáveis, como cardiomiócitos e neurônios, são mais rápidas que as PMCAs 1 e 4, expressas em todos os tipos celulares (“housekeeping”) (Stauffer *et al.*, 1995; Filoteo *et al.*, 1997; Strehler *et al.*, 2007).

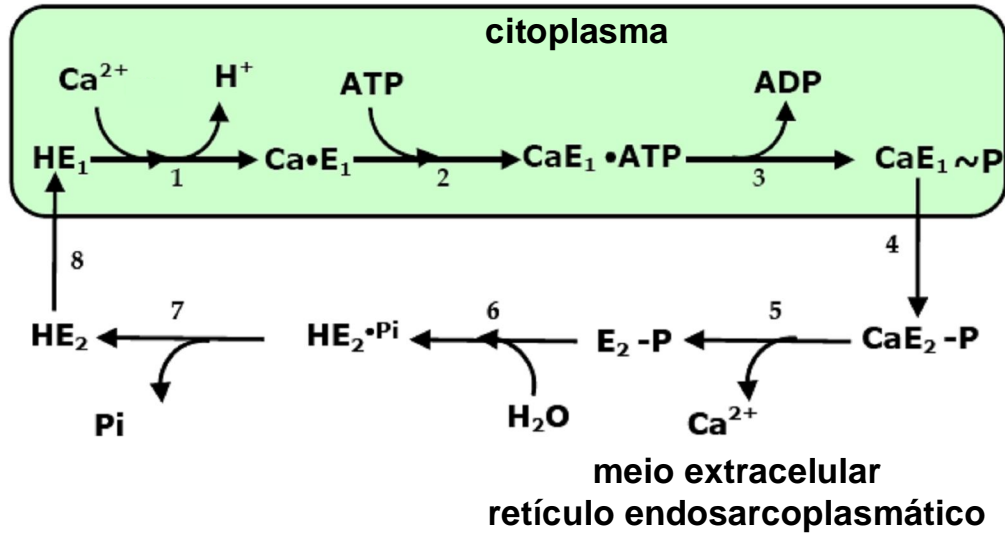
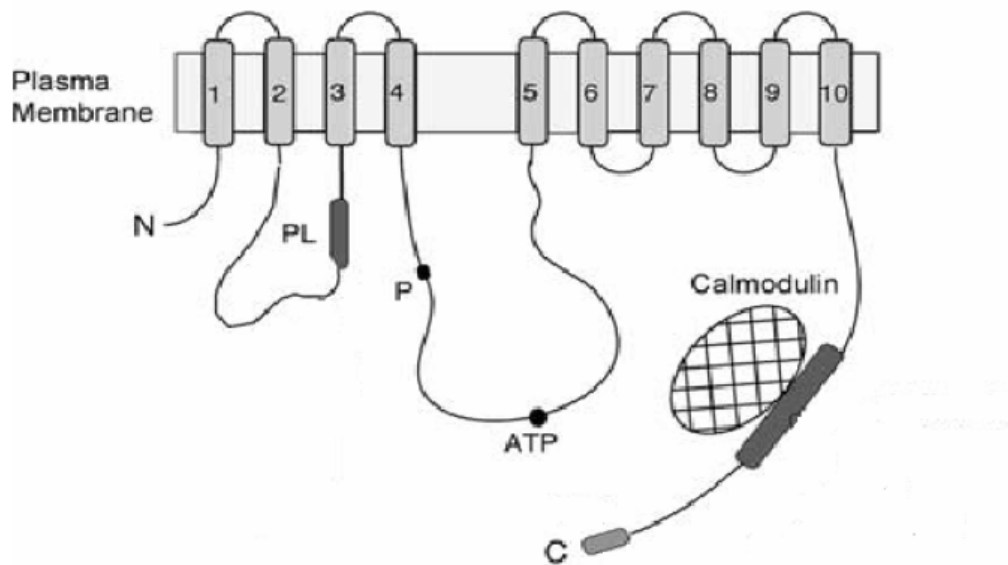


Figura 5. Diagrama do ciclo enzimático das Ca^{2+} -ATPases (PMCA e SERCA). E_1 e E_2 , as duas conformações das bombas. A ligação do íon Ca^{2+} na face citosólica em troca do H^+ remanescente da água participante de um evento de hidrólise em um ciclo prévio (1) permite a ancoragem de uma molécula de ATP (2), que tem sua fosforila γ -terminal quebrada e ligada a um resíduo de ácido aspártico presente no sítio catalítico para formar o intermediário $\text{Ca}^{2+}\text{E}_1\sim\text{P}$ (3). A enzima fosforilada sofre uma mudança conformacional (transição para $\text{Ca}^{2+}\text{E}_2\text{-P}$) (4) que resulta no transporte do Ca^{2+} para o meio extracelular ou para dentro do retículo (5). Esta mudança permite o acesso de uma molécula de água ao centro ativo (6) e a hidrólise da ligação acil-fosfato, liberando Pi das ATPases (7) que, conseqüentemente, voltam ao estado conformacional inicial, com o sítio de ligação de Ca^{2+} voltado para o citosol (8), possibilitando a retomada do ciclo de catálise (Modificado de Carafoli & Brini, 2000).

A PMCA apresenta três domínios principais, que são o domínio de ligação ao ATP (localizado no sítio catalítico) responsável pela ligação ao ATP e pela quebra da ligação β , γ do mesmo, sendo o fosfato γ -terminal transferido ao resíduo de aspartato localizado nesse mesmo domínio, formando o intermediário acil-fosfato (Asp-P). Este domínio está localizado na maior alça citoplasmática localizada entre as hélices transmembrana 4 e 5 (Carafoli & Brini, 2000). O outro domínio desta ATPase está localizado entre as hélices transmembranas 2 e 3. Este domínio possui sítios de interação com fosfolípídeos acídicos, sendo a PMCA regulada por essas ligações. Além disso, ele é o “domínio de transdução”, desempenhando importante papel na transmissão intramolecular das mudanças conformacionais que ocorrem durante o ciclo catalítico da bomba (responsável pelo deslocamento do Ca^{2+} ao longo da ATPase, do meio intra para o extra celular) (Brodin *et al.*, 1992). O último domínio está localizado na porção citoplasmática C-terminal e é a região regulatória da PMCA, contendo o domínio de ligação a calmodulina e os sítios de fosforilação a PKC e PKA (Brodin *et al.*, 1992; Carafoli *et al.*, 1992); é considerado um domínio “auto-inibitório” da enzima, onde a região C-terminal se liga após a primeira hélice transmembrana da bomba, bloqueando o sítio catalítico. Após a ligação de Ca^{2+} -calmodulina nessa região, há uma mudança conformacional, aumentando a afinidade da bomba por Ca^{2+} e sua atividade (Caride *et al.*, 1999) (Figura 6A).

Como dito anteriormente, splicings alternativos permitem que diferentes isoformas de PMCA sejam reguladas de diferentes maneiras. Porém, em geral, a PKA ativa as diferentes isoformas de PMCA (Carafoli, 1991), inclusive já foi demonstrado, pelo nosso laboratório, que a PKA ativa a PMCA por uma via dependente de CAMKII (Valverde *et al.*, 2005), e a PKC ativa ou inibe,

A



B

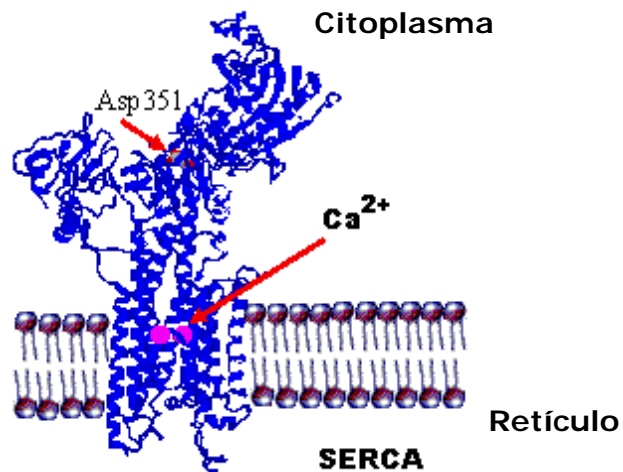


Figura 6. Esquema da PMCA (A) e da SERCA (B). Na PMCA (A) estão indicados os segmentos transmembrana (1-10), o domínio de ligação a fosfolipídeos acídicos (PL), o sítio de fosforilação do ácido aspártico (P), o sítio de ligação de ATP (ATP), e o domínio auto-inibitório de ligação da calmodulina (Calmodulin) na porção C-terminal. Na SERCA (B) estão indicados o sítio de ligação para Ca^{2+} e o resíduo de fosforilação Asp351 (Retirado de: figura6B- Arredouani, 2004; e figura 6A- Strehler *et al.*, 2007).

dependendo da isoforma presente (Zylinska & Soszynski, 2000; Strehler *et al.*, 2007). O nosso laboratório já demonstrou que, em fração de membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ovelha, a Ang II inibe a atividade da PMCA via PKC (Assunção-Miranda *et al.*, 2005; Axelband *et al.*, 2009a).

A outra bomba de Ca^{2+} , a SERCA, possui basicamente as mesmas características da PMCA. É uma P-ATPase e, assim como a PMCA, a SERCA também forma um intermediário fosforilado de alta energia durante seu ciclo catalítico, sendo o resíduo fosforilado Asp-351; apresenta o mesmo ciclo, dez domínios transmembrana, a maior parte da massa no citoplasma; possui diferentes isoformas e características estruturais semelhantes à PMCA, embora apresente apenas 55% de homologia com esta. A principal diferença observada entre essas duas bombas, é a sua localização celular (retículo ou membrana plasmática) (Foletti *et al.*, 1995) (Figura 6B).

A SERCA apresenta peso molecular entre 100 e 115 kDa e é codificada por três genes primários diferentes, originando SERCA 1, SERCA 2 e SERCA 3. Assim como a PMCA, a SERCA também apresenta diferentes isoformas: SERCA 1a, SERCA 1b, SERCA 2a, SERCA 2b, SERCA 2c e diferentes isoformas de SERCA 3 (Bobe *et al.*, 2004; Dally *et al.*, 2006; Lipskaia *et al.*, 2009), que apresentam diferentes afinidades ao Ca^{2+} e velocidade de transporte, expressas em diferentes tipos celulares, dependendo das funções do tecido. Sendo assim, a SERCA 1a e SERCA 1b estão presentes em músculo esquelético rápido de adulto e neonato, respectivamente. A SERCA 2a está presente em músculo liso e coração, enquanto a SERCA 2b está presente em todos os tipos celulares, por isso é chamada de “housekeeping”. As isoformas da SERCA 3 são expressas em várias células e tecidos, musculares e não musculares, como cérebro, estômago,

útero, coração, intestino grosso, baço e rim (Wu *et al.*, 1995; Bobe *et al.*, 2004; Dally *et al.*, 2006). Os diferentes subtipos de SERCA transportam Ca^{2+} com velocidade e afinidades diferentes, sendo que a SERCA 2b apresenta a maior afinidade pelo Ca^{2+} , porém velocidade baixa, a SERCA 1 e SERCA 2a apresentam afinidades um pouco menores e equivalentes entre si e $V_{\text{máx}}$ alta, enquanto a SERCA 3 tem a menor afinidade entre todas as isoformas. No rim, já foi demonstrada a expressão da SERCA 2b (“housekeeping”) e da SERCA 3 (Dode *et al.*, 1998; Dally *et al.*, 2006).

Diferentemente da PMCA, que não possui inibidor específico, existem alguns fármacos com capacidade de inibir a SERCA (a PMCA não é sensível a esses fármacos). A tapsigargina, uma lactona sesquiterpênica extraída da planta *Thapsia garganica*, é o inibidor mais potente e específico das bombas SERCA (Rasmussen *et al.*, 1978; Christensen, 1982; Christensen, 1988). A tapsigargina interage com a conformação E_2 da SERCA promovendo uma inibição irreversível da atividade da enzima.

A SERCA não apresenta o domínio auto-inibitório na sua porção C-terminal, e não é modulada pela calmodulina. Porém, algumas moléculas são capazes de regular o funcionamento da SERCA. O fosfolamban (PLB) e a sarcolipina (SLN), por exemplo, interagem fisicamente com a bomba SERCA, inibindo sua atividade por promover uma associação cineticamente desfavorável à ATPase (diminuem sua afinidade pelo Ca^{2+} e sua velocidade máxima). Quando o PLB e a SLN são fosforilados, a bomba volta a ser estimulada. O PLB é fosforilado pela PKA e pela CAMKII (alguns estudos mostram que ele pode ser fosforilado *in vitro* pela PKC) (Tada *et al.*, 1975; Le Peuch *et al.*, 1979; Iwasa & Hosey, 1984; Movsenian *et al.*, 1984). Já o mecanismo regulatório da SLN ainda não foi totalmente elucidado.

Essas duas proteínas de ligação e regulação da atividade da SERCA (PLB e SLN) não regulam todas as isoformas da SERCA em todos os tecidos, já que elas só são expressas nos tecidos cardíacos e musculares (Odermatt *et al.*, 1998). Porém, em células não musculares a SERCA pode ser regulada por mecanismos que independem do PLB e da SLN, seja por interação com outras proteínas ou por fosforilação direta por proteínas cinases. Já foi sugerida a presença de proteína análoga ao PLB no cérebro, e a regulação da atividade da SERCA por PKC em neurônio (já que nunca foi demonstrado que a SERCA seja fosforilada diretamente por PKC) suporta fortemente essa idéia (Dou & Joseph, 1996; Usachev *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que as SERCAs 2 (a e b) podem ser moduladas diretamente através da fosforilação pela CAMK, o que leva ao estímulo da atividade dessa bomba (Toyofuku *et al.*, 1994). Ainda não foi demonstrada a fosforilação direta da SERCA por PKA ou PKC.

A SERCA é regulada por hormônios que controlam as funções cardiovasculares como, por exemplo, a Ang II. Já foi demonstrado que a Ang II é capaz de diminuir a expressão da SERCA 2 em cardiomiócitos ventriculares (Ju *et al.*, 1996). Porém, apesar do fato da Ang II aumentar a concentração de Ca^{2+} nas células de túbulos proximais renais (Zhuo *et al.*, 2006), seu efeito na atividade da SERCA nessas células ainda não é conhecido.

Além da SERCA e da PMCA, as células também expressam a SPCA (Ca^{2+} -ATPase da via secretória), localizada no complexo de golgi. Assim como a PMCA e a SERCA, a SPCA também é uma P-ATPase, e apresenta duas isoformas conhecidas, a SPCA 1 (“housekeeping”) e a SPCA 2. Essa ATPase, responsável por bombear o Ca^{2+} do citoplasma para dentro do complexo de golgi, é menor do que a PMCA e a SERCA, e possui maior afinidade ao Ca^{2+} do que essas duas

ATPases. Ela também bombeia o Mn^{2+} , que é cofator de diversas enzimas no lúmen do complexo de golgi (Brini & Carafoli, 2009).

No túbulo proximal, a SERCA e a PMCA participam do controle da concentração do Ca^{2+} intracelular, podendo ser excelentes alvos de hormônios e autacóides que modulam o transporte de Na^+ e água através de vias que dependem de Ca^{2+} como segundo mensageiro como, por exemplo, a Ang II.

Histórico do Sistema Renina Angiotensina (SRA)

A pressão sanguínea foi medida pela primeira vez em 1733 por Stephen Hales. Nesse caso, a técnica utilizada foi a inserção de um tubo de latão na artéria carótida de cavalo. Posteriormente surgiu a técnica de medida de pressão utilizada até hoje, com o auxílio do estetoscópio, inventado por Laennec em 1815, e introduzida por Nicolai Korotkov em 1905. Desde então, a pressão sanguínea vem sendo bem estudada e diversas substâncias capazes de alterá-la foram descobertas. A primeira idéia da regulação da pressão sanguínea veio da descoberta de um princípio pressor por Tigerstedt e Bergman em 1898, que foi chamado de “renina”, por ter sido extraído do rim (Tigerstedt & Bergman, 1898). Graças a essa descoberta, Goldblatt e colaboradores foram capazes de descrever uma hipertensão reno-vascular em animais, nos quais a artéria renal era obstruída, parcialmente, através da utilização de um grampo (Goldblatt *et al.*, 1934). Posteriormente, uma substância vasoconstritora foi isolada do sangue venoso renal de rim isquêmico de cachorro hipertenso com o mesmo modelo experimental de Goldblatt (Braun-Menendez *et al.*, 1940). Essa substância foi chamada de “hipertensina”. Uma descoberta similar foi feita, simultânea e independentemente, após a injeção de renina em animal intacto, sendo a

substância vasoconstritora isolada chamada de “angiotonina”. Em paralelo foi isolado um “ativador de renina”, que depois se provou ser o angiotensinogênio (Page & Helmer, 1940). As substâncias pressoras nomeadas de “hipertensina” por Braun-Menendez e colaboradores na Argentina (Braun-Menendez *et al.*, 1940) e de “angiotonina” por Page e Helmer nos Estados Unidos (Page & Helmer, 1940) foram posteriormente isoladas e se verificou serem a mesma substância, um octapeptídeo cujo precursor era o angiotensinogênio (Elliott & Peart, 1956; Skeggs *et al.*, 1956; Bumpus *et al.*, 1957). Em 1958, Page e Braun-Menéndez concordaram em unir os dois nomes de suas descobertas (“angiotonina” e “hipertensina”, respectivamente) em um termo híbrido para o octapeptídeo pressor: angiotensina (De Gasparo *et al.*, 2000).

Em 1987, um comitê formado pela Sociedade Internacional de Hipertensão, Associação Americana do Coração e a Organização Mundial da Saúde propuseram a abreviação do termo angiotensina para Ang, usando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I), como referência para a numeração dos aminoácidos de todos os peptídeos de angiotensina (Dzau *et al.*, 1987).

Após a descoberta da angiotensina II (Ang II), muitos estudos foram e ainda vêm sendo realizados para compreender os mecanismos de sua síntese, estrutura e função. Graças a esses estudos, hoje em dia, a cascata que leva a formação da Ang II e o sistema renina angiotensina (SRA) já estão bem caracterizados. Porém, nossos conceitos a respeito das diferentes ações biológicas do SRA vêm sofrendo alterações, com estudos descrevendo novos componentes desse sistema que incluem novas enzimas, novos peptídeos biologicamente ativos e novos locais de síntese, tornando esse sistema cada vez maior e complexo.

A Ang II é um hormônio autacóide (com ação na célula que é produzida e nas células adjacentes) octapeptídico, cuja seqüência de aminoácidos é, em humanos, cavalos e porcos, $\text{NH}_2\text{-Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-COOH}$. Em bovinos, o resíduo de isoleucina na posição 5 é substituído por valina (ver revisão De Gasparo *et al.*, 2000). A Ang II é um hormônio de fundamental importância para o funcionamento do organismo, sendo responsável pela manutenção da homeostase do meio interno, controlando o balanço hidroeletrolítico, o tônus vascular, o volume extracelular e a pressão arterial.

A formação da Ang II no SRA sistêmico se inicia com a liberação dos grânulos de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. Existem três mecanismos que acarretam esta liberação de renina: a queda da pressão da perfusão renal, a baixa concentração de NaCl nas células da mácula densa e a queda da pressão sanguínea sistêmica, ativando a inervação simpática (Mello-Aires, 2008d).

Dois segundos mensageiros são importantes para que ocorra a liberação da renina: o cálcio e o AMPc. A queda da concentração de cálcio no citosol e o aumento do AMPc (via adenilato ciclase) elevam a secreção de renina (Mello-Aires, 2008d; Ortiz-Capisano *et al.*, 2007). Porém, ainda não se sabe se esses dois segundos mensageiros agem independente ou sequencialmente.

A liberação da renina pelas células justaglomerulares é apenas o início no SRA. A renina é uma enzima glicoprotéica (carboxipeptidase), que é liberada via exocitose. Primeiramente ela é sintetizada nas células justaglomerulares como pré-pró-renina, com 401 resíduos de aminoácidos (Peach, 1977; Griendling *et al.*, 1993). Após a sua tradução, a pré-pró-renina tem um peptídeo de 20 aminoácidos clivado de sua estrutura no retículo endoplasmático. Esse peptídeo de 20

aminoácidos clivado é estocado no complexo de Golgi na forma de grânulos, onde vai ser convertido na renina ativa. Essa renina ativa é que vai ser liberada por exocitose pelas células justaglomerulares quando há o estímulo. A renina cliva o angiotensinogênio, seu substrato e o único precursor conhecido dos peptídeos de angiotensina.

Na visão clássica, o angiotensinogênio, uma globulina, é sintetizado e liberado pelo fígado, sendo clivado, pela renina, sistemicamente. A ação da renina sobre o angiotensinogênio forma a angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo (Peach, 1977; Jagadeesh, 1999) (Figura 7). A partir daí, a Ang I sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), levando a formação da Ang II (Figura 7). Duas formas distintas de ECA são expressas em humanos, a forma somática, que é particularmente abundante na superfície endotelial das veias pulmonares e também é expressa em outros tipos de células, como em algumas células do músculo liso, monócitos, linfócitos T e adipócitos, e a forma testicular (El-Dorry *et al.*, 1982). As duas formas estão presentes na superfície celular como ectoenzimas, hidrolisando os peptídeos circulantes. Além disso, uma forma solúvel de ECA também está presente no plasma e em outros fluidos corporais (Hooper *et al.*, 1987). Todos os tipos de ECA hidrolisam outros peptídeos circulantes como, por exemplo, a bradicinina que é inativada quando hidrolisada pela ECA (Yang *et al.*, 1970). A ECA somática (massa molecular de 180 kDa) é uma glicoproteína composta de dois sítios catalíticos (domínio COOH-terminal e domínio NH₂-terminal), já a ECA testicular é menor (90 – 110 kDa) e contém apenas um sítio catalítico, que corresponde ao domínio carboxi da ECA somática. No SRA clássico, a Ang I é convertida em Ang II na circulação pulmonar, pela ação da ECA somática, presente nas células endoteliais das veias pulmonares,

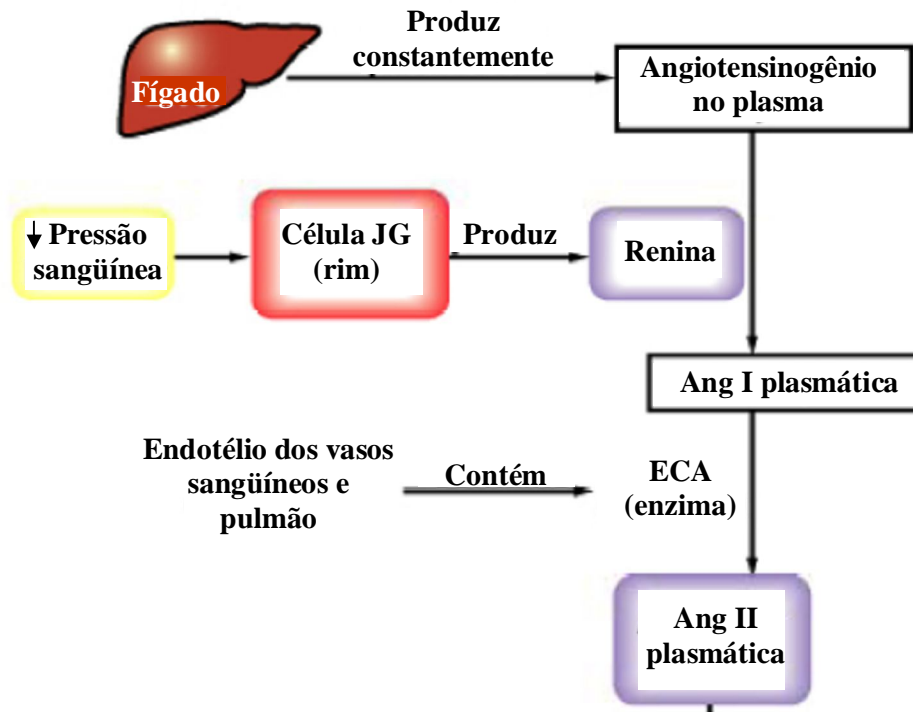


Figura 7. Visão clássica do SRA. A Ang II era tida como produzida apenas de forma sistêmica, sendo o angiotensinogênio, produzido apenas pelo fígado, clivado pela renina, produzida nas células justaglomerulares, levando a formação da Ang I, clivada pela ECA formando a Ang II, considerada o único peptídeo com ação biológica desse sistema. JG, justaglomerulares.

que retira os dois últimos aminoácidos de Ang I, formando o octapeptídeo Ang II (Soubrier *et al.*, 1993) (Figura 7).

O SRA atual

Na visão clássica, acreditava-se que a Ang II era formada apenas de forma sistêmica, como descrito no item anterior, e era considerada o único peptídeo ativo do sistema. Porém, ao longo dos anos, essa visão vem sendo reformulada. Por exemplo, o angiotensinogênio, o polipeptídeo precursor da Ang II, era tido como sintetizado somente no fígado, porém, atualmente, já foi demonstrado que tecidos como o coração, o endotélio, os rins e o tecido adiposo também sintetizam este polipeptídeo (ver revisão Kumar *et al.*, 2007). Assim, além do SRA sistêmico, hoje já se tem conhecimento do SRA tecidual. Ou seja, além da Ang II que é formada na circulação, provinda do angiotensinogênio hepático e da renina do aparelho justaglomerular, existe a formação local desse peptídeo na cascata de proteólise limitada tecidual. Isso ocorre quando o tecido tem todos os componentes necessários para a biossíntese da Ang II, como o mRNA para renina, o angiotensinogênio e a ECA, em quantidades detectáveis. Diversos estudos relatam a existência de uma cascata do SRA tecidual. Esses componentes do SRA podem ser encontrados em tecidos e órgãos como cérebro, coração, vasculatura, tecido adiposo, gônadas, pâncreas, placenta, rins, entre outros (Speth *et al.*, 1999; Engeli *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2000; Bader *et al.*, 2001; Sernia, 2001; Morimoto & Sigmund, 2002). A Ang II tecidual também tem ação no local de sua síntese, aumentando a sua própria concentração e contribuindo para a sustentação do seu efeito local. Tem sido demonstrado que,

quando esse fenômeno é mantido a longo prazo, ocorre a ativação de processos inflamatórios associados a lesão tecidual (Navar, 2009).

Além do SRA sistêmico e tecidual, também existe o SRA intracelular, ou intrácrino, que é caracterizado pela presença dos componentes do sistema (angiotensinogênio, renina e ECA) e a síntese da Ang II dentro de uma única célula. A presença dos componentes do SRA já foi confirmada em diferentes tipos celulares, como em células renais corticais de rato, cromafins adrenais medulares, e células da glândula pituitária (Hunt *et al.*, 1992; Vila-Porcile & Corvol, 1998; Wang *et al.*, 2002). Além disso, existem evidências de que a Ang II extracelular, quando se liga ao receptor de membrana do tipo 1 (AT₁), é internalizada junto com seu receptor em várias células, como células do músculo liso vascular e células epiteliais renais (Griendling *et al.*, 1987; Anderson & Peach, 1994; Schelling & Linas, 1994; Hein *et al.*, 1997; Thekkumkara & Linas, 2002). A presença de Ang II intracelular já foi confirmada em vários tipos celulares, como em cardiomiócitos e em células renais (De Mello, 1998; Zhuo *et al.*, 2006).

A Ang II intracelular, seja internalizada junto com o receptor, ou sintetizada dentro da célula, desempenha funções intracelulares, como regular a comunicação celular, a expressão gênica e o crescimento celular (Filipeanu *et al.*, 2001). Sítios de ligação de Ang II intracelular (receptores de angiotensina) foram demonstrados no núcleo de células renais e de hepatócitos, e na cromatina (Re *et al.*, 1984; Booz *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 1992; Pendergrass *et al.*, 2006). O sítio de ligação da Ang II no núcleo é considerado “AT₁-like”, já a natureza do sítio de ligação na cromatina ainda é desconhecida. Esses sítios de ligação intracelular (nuclear) são funcionais, uma vez que a incubação da Ang II em núcleos isolados de hepatócitos levou a modulação da expressão gênica (Re & Parab, 1984;

Eggena *et al.*, 1993). Além disso, já foi descrita a translocação do AT₁ de membrana plasmática para o núcleo, após a ligação com Ang II (Bkaily *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2006). Porém, não se sabe se o receptor do tipo AT₁ (“AT₁-like”) nuclear representa o receptor de membrana internalizado (Kumar *et al.*, 2007).

O primeiro estudo sugerindo efeitos funcionais para a Ang II intracelular foi no ano de 1971, quando Robertson e Khairallah demonstraram a localização de Ang II injetada no núcleo de células musculares cardíacas e lisas, acompanhada de mudanças ultraestruturais celulares (Robertson & Khairallah, 1971). Depois, vários estudos demonstraram outras funções para a Ang II intracelular em diferentes tipos celulares. Por exemplo, foi demonstrado que a Ang II se liga em fragmentos de cromatina, resultando no aumento da síntese de RNA (Re *et al.*, 1984; Re & Parab, 1984). Foi demonstrado também que a microinjeção de Ang II em células do músculo liso vascular de rato, levou ao aumento de cálcio citosólico e nuclear, secundário ao influxo do cálcio extracelular (Haller *et al.*, 1996). Em células de túbulo proximal de rim de coelho, a Ang II microinjetada levou à mobilização de cálcio provindo dos estoques intracelulares, como o retículo endoplasmático, via receptor AT₁ intracelular (Zhuo *et al.*, 2006).

Dessa forma, na visão clássica, quando se acreditava que só existia o SRA sistêmico, e que a Ang II era produzida apenas na circulação, ela era considerada um hormônio de função endócrina. Porém, hoje já se sabe que a Ang II produzida intracelularmente possui atividade parácrina/autócrina/intrácrina.

Por tudo que foi exposto, fica evidente que o SRA é muito mais complexo do que se imaginava há 40 anos atrás. Desde então, novas enzimas, novas vias de proteólise e novos peptídeos vêm sendo descritos (Figura 8).

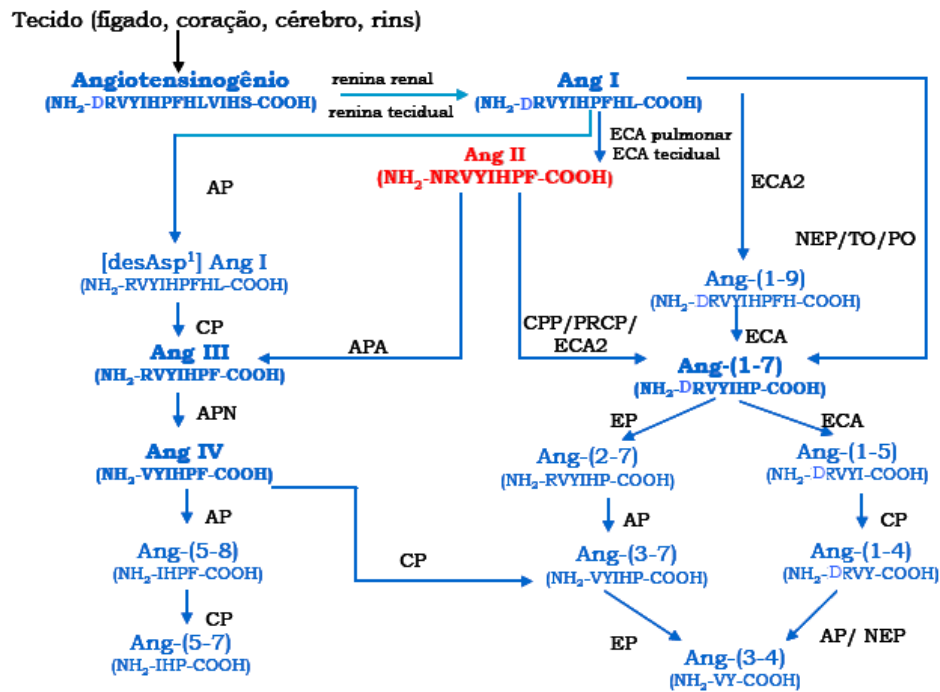


Figura 8. Esquema representando a visão atual do SRA. As siglas das setas representam as enzimas peptidases responsáveis pela hidrólise controlada dos peptídeos derivados da Ang I. AP, aminopeptidase; APA, aminopeptidase A; APN, aminopeptidase N; CP, carboxipeptidase; EP, endopeptidase; ACE ou ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; CPP, carboxipeptidase P; PRCP, prolilcarboxipeptidase; NEP, neprilisina; TO, thimetoligopeptidase; PO, prolil-oligopeptidase (Adaptado de Axelband *et al.*, 2009b).

Receptores de angiotensina

Os peptídeos do SRA atuam via receptores localizados nas células alvo para promoverem seus efeitos. Existem dois tipos principais de receptores de angiotensina, o receptor do tipo 1 (AT₁) e o receptor do tipo 2 (AT₂), classificados por suas diferentes afinidades por vários antagonistas não peptídicos (Timmermans *et al.*, 1993). Ambos são membros dos receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs), porém estimulam vias de sinalização completamente diferentes, levando a efeitos opostos (De Gasparo *et al.*, 2000).

Os principais efeitos conhecidos da Ang II ocorrem via estímulo do receptor AT₁. O gene que codifica esse receptor, abreviado de AGTR1, está localizado no cromossomo 3q. O AT₁ contém 359 aminoácidos, tem peso molecular de 41 kDa (Curnow *et al.*, 1992), e é antagonizado por bifenilimidazolis, como o losartan e o cadesartan (Timmermans *et al.*, 1993; Jagadeesh, 1999; Schmidt e Schieffer, 2003). O receptor AT₁ está amplamente distribuído em órgãos e tecidos do animal adulto, dentre os quais se destacam o sistema cardiovascular (células musculares cardíacas, toda extensão vascular, incluindo as arteríolas aferentes e eferentes e as células mesangiais) e o rim (Paxton *et al.*, 1993; Harrison-Bernard *et al.*, 1997). No rim, o AT₁ se localiza nas membranas luminal e basolateral dos segmentos tubulares do néfron, nos podócitos glomerulares, nas células da mácula densa (Paxton *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1998) (Figura 9).

Em ratos (Iwai & Inagami, 1992) e em camundongos (Sasamura *et al.*, 1992) foram identificados dois subtipos do receptor AT₁, o AT_{1A} e o AT_{1B}. Já os humanos só expressam um único tipo de receptor AT₁. A ligação da Ang II no receptor AT₁ induz mudança conformacional do mesmo, promovendo a ativação da proteína G a ele acoplada, levando à ativação de vias de sinalização através de enzimas efetoras de membrana plasmática, como a fosfolipase C (PLC), fosfolipase D (PLD), fosfolipase A₂ (PLA₂), adenilato ciclase, e canais iônicos, como canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L e T (De Gasparo *et al.*, 2000). A proteína G acoplada ao receptor AT₁ é do tipo G_q ou G_i. No caso da ligação da proteína G_i ao receptor AT₁, sua ativação leva à inibição da atividade da adenilato ciclase e à diminuição da produção do AMPc (Crane *et al.*, 1982; Pobiner *et al.*, 1985; Pobiner *et al.*, 1991).

Os principais efeitos da Ang II ocorrem via receptor AT₁ acoplado a proteína G_q, levando à ativação da enzima efetora de membrana PLC, que hidrolisa o fosfoinositídeo bifosfato (PIP₂) de membrana em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), o que leva ao aumento de níveis de Ca²⁺ intracelular e à ativação da PKC (Dinh *et al.*, 2001). Além disso, a ativação do receptor AT₁ também culmina na ativação de cascatas de sinalização intracelular que se estendem ao núcleo, regulando a transcrição gênica e a expressão de proteínas que controlam as respostas de crescimento e a proliferação celular. Nesse caso, ocorre ativação de proteínas intracelulares como a MAPK, JAK2 e STATs (Bernstein & Marrero, 1996).

A atividade biológica da Ang II é dependente da aromaticidade do resíduo C-terminal Phe⁸. Os resíduos Tyr⁴, His⁶, Arg² e o terminal carboxi carregado também são essenciais para a ativação do receptor (Khosla *et al.*, 1974). Já os

resíduos N-terminais são importantes para a ligação ao receptor e a duração da ação da Ang II, mas não são especificamente necessários para a atividade biológica. Por exemplo, a angiotensina-(2-8) [Ang-(2-8)] (Ang III), formada pela depleção do resíduo Asp¹, é quase tão potente quanto a Ang II, já a angiotensina-(3-8) [Ang-(3-8)] (Ang IV) e a angiotensina-(4-8) [Ang-(4-8)], possuem eficácia biológica, mas são agonistas fracos, já que o receptor AT₁ possui baixa afinidade por esses agonistas (De Gasparo *et al.*, 2000). Os aminoácidos do receptor AT₁ que são essenciais para a ligação da Ang II inclui os quatro resíduos de cisteína que formam as duas pontes dissulfeto externas e diversos outros resíduos localizados nas regiões expostas do receptor (De Gasparo *et al.*, 2000).

A ativação de muitos receptores de membrana plasmática por seu agonista é seguida da internalização do complexo em vesículas revestidas por clatrina, com degradação do receptor e reciclagem da membrana plasmática (De Gasparo *et al.*, 2000). Existem evidências de que os mecanismos de sinalização intracelular ativados por esses receptores não participam necessariamente do processo de internalização. Nesse caso, as mudanças conformacionais que ocorrem pela ligação ao agonista levariam à endocitose do receptor, independentemente da transdução do sinal via proteína G (De Gasparo *et al.*, 2000). Um exemplo de endocitose do receptor AT₁ ocorre via β -arrestina. Nesse caso, o receptor ativado por Ang II também ativa e é substrato das cinases de receptor acoplado a proteína G (GRKs). Após a fosforilação da GRK, a β -arrestina é atraída e se liga no receptor, desligando o sinal ativado pela proteína G, internalizando o receptor e induzindo uma via de sinalização independente da proteína G, como MAPK, por exemplo (Anborgh *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2003; Violin *et al.*, 2006).

O receptor de angiotensina AT₁ medeia as principais ações fisiológicas conhecidas da Ang II nas células renais, cardiovasculares, neuronais, endócrinas, hepáticas e em outras células alvo. Os principais efeitos promovidos por Ang II, via receptor AT₁, são a regulação da pressão arterial (vasoconstrição), retenção de sódio e água (anti-natriurese e anti-diurese), sede, secreção hormonal (estimula liberação de aldosterona e vasopressina), estimulação simpática, proliferação celular e remodelamento cardíaco (De Gasparo *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2006).

No rim, a Ang II via AT₁ constringe as arteríolas eferentes e aferentes e estimula a contração das células mesangiais, promovendo assim a redução do fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular, com diminuição da carga de Na⁺ filtrado (Navar *et al.*, 1996). Em baixas concentrações, a Ang II estimula a atividade da bomba de Na⁺ sensível à ouabaína de túbulos proximais (aumentando a reabsorção de sódio e água) e, em altas concentrações, ela inibe essa atividade; além disso, ela ativa a bomba de Na⁺ insensível à ouabaína (ver revisão Caruso-Neves *et al.*, 2001; Féraillé & Doucet, 2001). A Ang II também estimula a atividade do trocador Na⁺/H⁺ de membrana luminal nesse mesmo segmento, no ramo grosso ascendente e túbulo distal, e de canais de Na⁺ (ENaC) na membrana luminal do ducto coletor cortical inicial (Mello-Aires, 2008d).

O outro receptor de angiotensina, AT₂, apresenta apenas 34% de homologia ao receptor AT₁. Ele é composto de 363 aminoácidos e seu gene, o AGTR2, está localizado no cromossomo X em humanos. A homologia entre os dois receptores está localizada principalmente nos domínios hidrofóbicos, que formam as sete hélices transmembrana. Os resíduos localizados nesses domínios helicoidais, que são considerados essenciais para a ligação de Ang II no AT₁, são

preservados no AT₂. As divergências entre os dois receptores são observadas principalmente na terceira alça intracelular e na cauda C-terminal (De Gasparo *et al.*, 2000).

O receptor AT₂ é altamente expresso durante o desenvolvimento fetal, e poucos dias após o nascimento, sua expressão diminui rapidamente até níveis baixos (é menos expresso que o AT₁), porém detectáveis (Gross *et al.*, 2004). Este receptor é encontrado principalmente no coração e nos vasos sanguíneos; nos rins é localizado nas células do túbulo proximal, no ducto coletor e nos glomérulos (Carey *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 1998).

O receptor AT₂ é antagonizado por diferentes substâncias: PD123319, PD123177 e o CGP42112A, e é insensível ao losartan (Timmermans *et al.*, 1993; Jagadeesh, 1999; Schmidt e Schieffer, 2003). A via de sinalização ativada quando ocorre o estímulo do receptor AT₂ é completamente diferente da via estimulada pelo receptor AT₁. Estudos com ¹²⁵I-Sar¹-Ang II indicaram que o receptor AT₂ está ligado a proteína G_{iα2} ou G_{iα3} (Zhang & Pratt, 1996). A ativação do AT₂ acoplado à proteína G_i leva à geração de guanidina monofosfato cíclico (GMPc) e óxido nítrico (NO), com conseqüente vasodilatação. Essa vasodilatação pode ser um efeito direto, com a ativação do AT₂, ou indireto, já que a ativação do AT₂ leva a ativação do sistema caliceína-cinina, aumentando a síntese de bradicinina, que ativa seu receptor B₂ e leva a formação de NO e GMPc, com conseqüente vasodilatação (Siragy & Carey, 1996; Siragy & Carey, 1997).

Além da geração de NO e GMPc, a ativação do AT₂ também ativa proteínas tirosina fosfatases, como a serina/treonina fosfatase 2A (PP2A), proteína cinase fosfatase (MKP-1), e SHP-1 tirosina fosfatase, resultando na inativação de MAPK, como as ERKs (p42 e p44) (Horiuchi *et al.*, 1999). Existem

evidências de que o receptor AT₂ é capaz de abrir o canal de K⁺, ativar a fosfolipase A₂ (PLA₂) e a geração de prostaglandinas, estimular a produção de ceramida e inibir a atividade da enzima Na⁺-ATPase renal via proteína G_{i/o} (De Gasparo *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 2006).

Ao contrário do receptor AT₁, o AT₂ tem se mostrado resistente à internalização em resposta a ligação do agonista, sugerindo que o AT₂ permanece disponível na membrana plasmática sem dessensibilização a respostas prolongadas (Csikos *et al.*, 1998).

As ações vasculares do receptor AT₂ podem ser aumentadas pelo bloqueio do receptor AT₁. Nesse caso, a Ang II leva a resposta hipotensora aguda em animais normais (Barber *et al.*, 1999; Carey *et al.*, 2001). Assim sendo, alguns dos efeitos benéficos, que ocorrem quando há o bloqueio do AT₁, nos vasos sanguíneos, coração e rins, parecem ser mediados, pelo menos em parte, pelo AT₂ (Carey *et al.*, 2000). Por exemplo, a ação hipotensora do bloqueio do AT₁, com losartan, foi completamente extinta pela inibição do AT₂ com PD123319 em ratos com hipertensão renovascular (Siragy & Carey, 1999), indicando que o AT₂ participa dessa ação hipotensora na presença do losartan. Além da vasodilatação, o AT₂ também possui efeito antiproliferativo e apoptótico em células do músculo liso vascular (Suzuki *et al.*, 2002).

No coração, o AT₂ inibe o crescimento e o remodelamento, induz a vasodilatação e, em algumas patologias cardíacas, como na falência cardíaca ou infarto do miocárdio, ele tem sua expressão aumentada (Ohkubo *et al.*, 1997; Schneider & Lowell, 2001). Já foi demonstrado que a expressão aumentada do receptor AT₂ em cardiomiócitos atenua a fibrose intersticial cardíaca induzida por

Ang II via aumento de bradicinina/NO/GMPc, sem efeito na hipertrofia do cardiomiócito (Kurusu *et al.*, 2003).

No rim, o AT₂, ao contrário do AT₁, induz a natriurese, a diurese e a vasodilatação. A ativação do AT₂ inibe a atividade da enzima (Na⁺+K⁺)ATPase de túbulo proximal, em rim de rato, por via dependente de NO/GMPc (Hakan & Hussain, 2006); além disso, a ativação do receptor AT₂ com altas doses de Ang II inibiu a reabsorção de NaHCO₃⁻ pelas células de túbulo proximal em camundongos (Haithcock *et al.*, 1999), aumentando a perda renal de Na⁺.

Ou seja, em termos fisiológicos, os principais efeitos de Ang II ocorrem via receptor AT₁, porém, em certos casos, como em altas concentrações desse peptídeo ou na presença de alguns metabólitos de angiotensina, o receptor AT₂ é ativado e estimula efeitos opostos aos do receptor AT₁, impedindo a exacerbação de seus efeitos.

Muitos receptores acoplados à proteína G podem formar homodímeros ou heterodímeros, inclusive entre receptores de hormônios vasoativos diferentes. Sendo assim, já foi demonstrado a formação de heterodímeros estáveis dos receptores de angiotensina e bradicinina AT₁/B₂. Nesse caso, as principais proteínas acopladas ao receptor AT₁ (G_{qα} e G_{iα}) estão com a ativação aumentada, e a endocitose dos dois receptores dificultada com a heterodimerização (AbdAlla *et al.*, 2000). Foi demonstrado também que em mulheres com pré-eclâmpsia, há um aumento na formação de heterodímeros AT₁/B₂, contribuindo para a hipertensão dessas mulheres (AbdAlla *et al.*, 2001b). Além disso, os receptores de angiotensina AT₁ e AT₂ podem formar homodímeros AT₁/AT₁ ou AT₂/AT₂ ou podem formar heterodímeros AT₁/AT₂. Já foi demonstrado que, em heterodímeros AT₁/AT₂, o AT₂ estabiliza ou induz uma conformação no

receptor AT₁ que não permite mais realizar a mudança conformacional necessária para ativação da proteína G a ele acoplada. Esses resultados demonstraram que a ligação do AT₁ com o AT₂ inibe a ativação do AT₁ (AbdAlla *et al.*, 2001a). Porém, já foi demonstrado pelo nosso laboratório que a ativação de heterodímeros AT₁/AT₂ em membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ovelha com baixas concentrações de Ang II, ativa a via descrita para o AT₁ (PLC/DAG/PKC), levando a inibição da PMCA (Axelband *et al.*, 2009a).

Seja como for, a heterodimerização do receptor AT₁/AT₂ pode modular respostas desencadeadas por Ang II em diversos modelos que expressam os dois receptores.

SRA intrarenal

Como dito anteriormente, os rins são excelentes alvos de hormônios e autacóides que regulam a pressão arterial e, inclusive, sintetizam alguns desses hormônios. Além da síntese e secreção dos grânulos de renina, que irá atuar no SRA sistêmico, pelo aparelho justaglomerular, o rim foi o primeiro órgão a ter o SRA tecidual descrito. Estudos *in vivo*, nos quais o SRA intrarenal foi inibido através da infusão de bloqueadores dos receptores de Ang II, resultaram em aumento de fluxo plasmático renal, taxa de filtração glomerular e excreção renal de Na⁺ e água (Kimbrough *et al.*, 1977; Levens *et al.*, 1981; Levens *et al.*, 1983). Posteriormente, foi demonstrado que todos os componentes do SRA: renina, angiotensinogênio e mRNA da ECA, estão presentes no rim (Bruneval *et al.*, 1986; Gomez *et al.*, 1988; Ingelfinger *et al.*, 1990; Yanagawa *et al.*, 1991).

Os níveis de Ang II são muito maiores nos rins do que no plasma, indicando que os níveis renais desse hormônio não são devidos apenas ao

equilíbrio não específico entre a concentração de Ang II circulante e o fluido extracelular intrarenal (Campbell *et al.*, 1991; Guan *et al.*, 1992; Reams *et al.*, 1993). A concentração da Ang II renal (no interstício e no fluido do túbulo proximal) é na faixa nanomolar, chegando a ser de 100-1000 vezes maior do que a concentração no plasma, demonstrando que a maior parte dessa Ang II intrarenal é sintetizada no rim (Seikaly *et al.*, 1990; Navar *et al.*, 1994). Além da síntese basal de Ang II, os rins também são capazes de acumular Ang II via endocitose junto com o receptor AT₁ (Zhuo *et al.*, 2002).

A Ang II também se encontra no fluido tubular proximal em concentrações muito maiores do que a concentração plasmática (Navar *et al.*, 1994). A concentração da Ang II no fluido tubular dos outros segmentos do néfron ainda não é conhecida por causa das dificuldades técnicas de coletar volume suficiente ou a falta de acesso a esses segmentos (Navar *et al.*, 2002). Além da Ang II filtrada no glomérulo, ela pode também ser liberada pelas células epiteliais do néfron ou ser sintetizada no próprio lúmen (Figura 10).

A maior parte do angiotensinogênio intrarenal foi localizado em células do túbulo proximal, sugerindo que esse segmento do néfron fornece o substrato para a Ang I e Ang II intersticial e intratubular, podendo ser diretamente secretado no lúmen tubular (Yanagawa *et al.*, 1991; Terada *et al.*, 1993; Darby & Sernia, 1995) (Figura 10). Por causa do seu tamanho, é improvável que o angiotensinogênio plasmático possa ser filtrado pelo glomérulo. A Ang I pode ser formada no lúmen tubular a partir da hidrólise do angiotensinogênio, produzido e secretado pelas células do túbulo proximal, pela renina, que também é produzida e secretada pelas mesmas células na luz tubular (Figura 10).

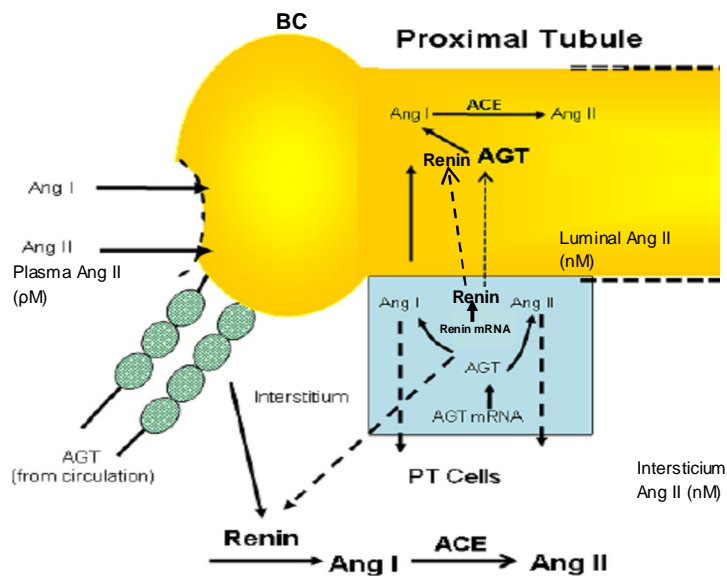


Figura 10. SRA intrarenal. A Ang II se encontra na faixa nanomolar no interstício e no lúmen renal, e na faixa picomolar no plasma. Tanto a Ang II quanto a Ang I são filtradas no glomérulo. As células do túbulo proximal sintetizam e secretam Ang II na luz tubular e, também, secretam angiotensinogênio e renina, o que leva à síntese de Ang II luminal, pela ação da ECA localizada na membrana luminal dessas células. AGT: angiotensinogênio; BC: cápsula de Bowman; PT cells: células do túbulo proximal; ACE: enzima conversora de angiotensina; nM: nanomolar; pM: picomolar (Adaptado de Prieto-Carrasquero *et al.*, 2009).

Culturas de células de túbulo proximal apresentam mRNA de renina, sendo essa proteína sintetizada e secretada por essas células no lúmen (Yanagawa *et al.*, 1991; Moe *et al.*, 1993; Henrich *et al.*, 1996). Uma vez formada, a Ang I pode ser hidrolisada a Ang II pela ECA localizada na membrana luminal das células do túbulo proximal (Schulz *et al.*, 1988; Sibony *et al.*, 1993) (Figura 10).

Os rins também apresentam abundância de receptores de Ang II nos diferentes segmentos do néfron. O receptor AT₁ foi localizado na membrana basolateral e luminal do túbulo proximal, na alça de Henle ascendente, túbulo distal, ducto coletor, podócitos glomerulares e nas células da mácula densa (Paxton *et al.*, 1993; Harrison-Bernard *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998; Miyata *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Já o receptor AT₂ foi encontrado no túbulo proximal, ducto coletor e em células epiteliais glomerulares (Sharma *et al.*, 1998; Miyata *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

A grande concentração de Ang II nos rins e a expressão dos receptores desse hormônio em diversos segmentos do néfron fazem do rim um importante alvo do SRA. Porém, embora o SRA intrarenal seja essencial para a função normal dos rins, a superexpressão dos seus componentes pode gerar hipertensão, falência renal aguda e crônica, nefropatia diabética e doença do rim policístico (Navar *et al.*, 2002; Carey & Siragy, 2003; Graciano *et al.*, 2004; Loghman *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006).

Os elevados níveis de Ang II na luz tubular, assim como sua síntese nesse local, indicam que esse peptídeo não está presente no ultrafiltrado apenas para ser excretado com a urina, ele possui ações biológicas via membrana luminal das células do túbulo proximal tão importantes quanto suas ações via membrana basolateral, em resposta à Ang II intersticial.

Resultados Prévios

Resultados prévios do nosso laboratório demonstraram que a Ang II em baixas concentrações, 10^{-10} M, inibe a atividade da PMCA de MBL de túbulo proximal renal através da ativação de receptor sensível a Losartan e PD123319 (antagonistas dos receptores AT_1 e AT_2 , respectivamente), enquanto altas concentrações, 10^{-6} M, retornam a atividade da PMCA ao nível controle, um efeito atribuído a metabolização de Ang II (Assunção-Miranda *et al.*, 2005).

Foi visto também que a inibição da PMCA promovida por baixas concentrações de Ang II ocorre via heterodímeros AT_1/AT_2 e que aumentos na concentração de Ang II leva à dissociação desses dímeros. Por HPLC foi possível observar que a incubação de MBL com concentrações micromolares de Ang II leva à formação de dois metabólitos denominados de M_1 e M_2 , formados pela ação das angiotensinas presentes nessa membrana. Esses metabólitos foram identificados como o aminoácido tirosina e Ang-(3-4). A principal via de proteólise de Ang II que leva a formação de Ang-(3-4) em MBL teve como intermediários $Ang-(1-7) \rightarrow Ang-(1-5) \rightarrow Ang-(1-4) \rightarrow Ang-(3-4)$ e peptidases como carboxipeptidase P (CPP), enzima conversora de angiotensina (ECA), e a neprilisina (NEP) envolvidas. A Ang-(3-4) foi identificada como o metabólito formado pelo aumento da concentração de Ang II responsável pela reversão da inibição da PMCA promovida por Ang II, através da dissociação do heterodímero AT_1/AT_2 e, possivelmente, também através da modulação da PMCA via receptores AT_2 (Axelband *et al.*, 2009a,b). Porém, esses resultados prévios foram obtidos em frações enriquecidas em membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ovelha.

Objetivos

Objetivo geral

As Ca^{2+} -ATPases são de grande importância na manutenção das concentrações de Ca^{2+} intracelular, podendo se tornar excelentes alvos de hormônios e autacóides, como a Ang II, que atuam via Ca^{2+} intracelular para alterar a reabsorção de Na^+ no túbulo proximal. Porém, pouco se sabe sobre a regulação da atividade Ca^{2+} -ATPásica por Ang II nessas células, principalmente via membrana luminal, embora as concentrações desse peptídeo no lúmen sejam elevadas.

Sendo assim, o objetivo principal desta dissertação visa analisar os efeitos da angiotensina II na atividade Ca^{2+} -ATPásica em culturas de células LLC-PK₁ mediados através da membrana luminal e contribuir para o melhor entendimento da homeostasia do cálcio mediado por este hormônio. As células LLC-PK₁ são células epiteliais derivadas de túbulo proximal de rim de porco, que, quando em cultura, com confluência acima de 70%, permanecem polarizadas, com a formação das duas membranas (basolateral e luminal) e as redes regulatórias e os transportadores nas membranas específicas (Hoque *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2006).

Objetivos específicos

Para obter as respostas necessárias, os objetivos específicos dessa dissertação foram:

1) Investigar o efeito de Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica em cultura de células LLC-PK1, observando seu efeito nas duas bombas de cálcio presentes nessas células: PMCA e SERCA;

2) Analisar o curso temporal do efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica dessas células;

3) Identificar os receptores de Ang II envolvidos neste processo;

4) Investigar a possível formação de heterodímeros dos receptores de Ang II nestas células;

5) Identificar a via de sinalização estimulada por Ang II na membrana luminal, para promover os efeitos observados na bomba de cálcio.

Material e Métodos

Cultura de células epiteliais renais

Células epiteliais derivadas de túbulo proximal de rim de porco imortalizadas (LLC-PK₁) foram cultivadas na concentração de 2×10^5 em 5 ml de meio DMEM (Dulbeccos's modified Eagle's médium) suplementado com L-glutamina, baixa concentração de glicose (GIBCO/Invitrogen – ref.: 31600-034) e 10% de soro fetal bovino (GIBCO/Invitrogen – ref.:12657-029). As células foram mantidas em garrafas de plástico (25 cm²) (TPP – ref.: 90025), por 72 h, a 37° C, em estufa com atmosfera de 5% CO₂. Após atingir a confluência as células foram repicadas, com o meio sendo descartado e as células lavadas com PBS (Na₂HPO₄ 0,01 M + NaCl 0,137 M + KH₂PO₄ 0,0017 M + KCl 0,0027 M), a pH 7,5. As culturas lavadas foram então incubadas por 2 min em solução de tripsina em EDTA 0,5% (Invitrogen. Ref. 25300054). A ação da tripsina foi interrompida pela adição do mesmo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram então transferidas para tubos de 15 ml (TPP – ref.: 91015) e submetidas à centrifugação (525 g por 2 min a temperatura ambiente). O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet ressuspenso em 5 ml de DMEM com 10% de SFB. Esta suspensão celular foi, então, distribuída em 4 garrafas de 25 cm².

Tratamento com Angiotensina II e ferramentas farmacológicas em células LLC-PK₁

As células LLC-PK₁ em cultura ficam com a membrana basolateral aderida na placa e a membrana luminal exposta ao meio de cultura. Ao adicionar Ang II

ou qualquer outra substância ao meio de cultura, ela entra em contato com a membrana luminal das células e não com a membrana basolateral. Portanto, os efeitos analisados da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁ nesta dissertação, foram efeitos via membrana luminal.

5×10^5 células eram distribuídas em garrafas de 25 cm^2 com meio DMEM com 10% de SFB e crescidas a 37° C em atmosfera de 5% de CO_2 por 3 dias. Após esse período, com as células com 100% de confluência, o sobrenadante era retirado e a cultura era lavada com PBS. 5 ml de meio DMEM sem soro era adicionado à cultura. Diferentes concentrações de Ang II (0,01 pM a $1 \mu\text{M}$) foram adicionadas à cultura por diferentes tempos de incubação a 37° C em atmosfera de 5% de CO_2 . Nos ensaios em que foram estudados a via de sinalização e os receptores envolvidos, antagonistas dos receptores de Ang II (10^{-10} M Losartan e 10^{-7} M PD123319) ou o inibidor específico da PKC (50 nM Calfoestina C) foram adicionados à cultura 10 minutos antes da incubação com Ang II. Após a incubação das células nas diferentes condições, as células foram lavadas em PBS, raspadas das garrafas e transferidas a tubos Falcon (15 ml) para centrifugação (525 g por 3 min a temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi ressuspensão em solução contendo EDTA 1 mM, HEPES-Tris pH 7,0 20 mM, Sacarose 250 mM e inibidor de tripsina 0,15 mg/mL. As células ressuspensas na solução foram então lisadas com um homogeneizador do tipo Potter–Elvehjem e pistilo de teflon por 10 vezes. O lisado celular foi mantido em gelo para a preservação das proteínas. A concentração de proteína e a atividade Ca^{2+} -ATPásica do lisado celular foram medidas no mesmo dia. A concentração de proteína foi dosada segundo o método de Lowry *et al.* (1951), com algumas modificações, como a desnaturação da proteína a ser

dosada com SDS 5%, utilizando albumina de soro bovino 0,1 % (p/v) como padrão.

Dosagem de atividade da Ca^{2+} -ATPase das células LLC-PK₁

A atividade da Ca^{2+} -ATPase foi mensurada pela quantificação do fosfato inorgânico (P_i) resultante da hidrólise do ATP, determinado através do método colorimétrico de Taussky e Shorr (1953). A atividade Ca^{2+} -ATPásica total foi obtida pela diferença entre as determinações na presença e ausência de Ca^{2+} (EGTA 2 mM). A atividade da PMCA foi calculada na presença de Ca^{2+} e tapsigargina 1 μM (inibidor específico da SERCA) e a atividade da SERCA foi determinada pela diferença entre a atividade Ca^{2+} -ATPásica total e a PMCA. O meio de reação continha: Bis-tris-propano 50 mM (pH 7,4), ATP 5 mM, MgCl_2 5 mM, NaN_3 10 mM, KCl 120 mM, ouabaína 0,1 mM, EGTA 0,2 mM e Ca^{2+} suficiente para a obtenção de 7,5 μM de Ca^{2+} livre (descrito adiante). Para a medida da atividade da PMCA e da SERCA, foi adicionado também ao meio de reação tapsigargina 1 μM . A reação foi iniciada com a adição de 0,1 mg/ml de proteína do lisado celular a 37° C e interrompida após 20 min com a adição de carvão ativado em HCl 0,1 N para a adsorção de ADP e ATP não hidrolisado.

A concentração de Ca^{2+} livre é calculada empregando um programa de computador (MCALC), que se baseia num método interativo (Inesi *et al.*, 1980), modificado por Sorenson *et al.* (1986) a partir do original desenvolvido por Fabiato e Fabiato (1979). Este programa considera as diferentes espécies envolvidas no equilíbrio entre EGTA, Ca^{2+} , Mg^{2+} , as diferentes formas iônicas do ATP, K^+ e H^+ e a influência da força iônica nas constantes de associação entre Ca^{2+} e EGTA. Com as informações das concentrações de cada um destes compostos, calcula-

se a concentração de CaCl_2 a ser adicionada ao meio contendo EGTA 0,2 mM para a obtenção da concentração de Ca^{2+} livre desejada.

Imunoprecipitação e Western blotting para detecção de AT_1 e AT_2 nas células LLC-PK₁ e a presença de heterodímero AT_1/AT_2

O lisado de células LLC-PK₁ foi obtido como descrito nas seções anteriores. Após a dosagem de proteína, 1 mg/ml de proteína foi solubilizada em CHAPS 0,01% (p/v) por 30 min à temperatura ambiente.

O anticorpo anti- AT_1 ou o anticorpo anti- AT_2 (anticorpos policlonais Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA, USA - diluição 1:200) foi pré-incubado, por 20 min sob leve agitação, com proteína A-agarose na proporção 1:1. Antes, a proteína A-agarose foi centrifugada 3 vezes a 3300 × g por 1 min a temperatura ambiente, havendo lavagens com solução salina tamponada com Tris pH 7,6, TBS, entre as centrifugações. Posteriormente, a mistura anticorpo-proteína A-agarose foi ressuspensa em BSA 1 mg/ml, CHAPS 0,01% (p/v), para evitar que a proteína A-agarose se ligue a outras proteínas além do anticorpo primário, e, então, adicionada ao lisado celular e mantida sob leve agitação a 4° C overnight. O sobrenadante foi separado do imunoprecipitado por uma centrifugação a 1000 × g por 4 min a 4° C. Após três centrifugações (as duas primeiras a 16100 × g por 10 min a 4° C e a última seguindo as mesmas condições, porém apenas por 4 min, com lavagens em TBS intercalando as centrifugações), o imunoprecipitado foi ressuspensa em tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol e azul de bromofenol, aquecido a 100° C por 4 min – a fim de desligá-lo do anticorpo-proteína A – e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com SDS, assim como o sobrenadante. Ambos, então, foram transferidos para uma

membrana de nitrocelulose, onde sofreram bloqueio por 1 h com leite 5% em TBS, e depois foram incubados, primeiramente com o anticorpo primário anti-AT1 por 1 h, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 5 vezes por 3 min em TBS e, em seguida, incubada com o anticorpo secundário por 1 h (anticorpo secundário policlonal anti-rabbit GE Healthcare Life Sciences do Brasil - São Paulo, Brasil). Após novas lavagens (5 vezes por 3 min em TBS), o resultado foi então visualizado utilizando-se o kit de quimioluminescência ECL® (GE Healthcare Life Sciences do Brasil - São Paulo, Brasil). A banda de ambos os receptores (AT₁ e AT₂) é detectada em 45 KDa. A mesma membrana foi submetida a tratamento com glicina 0,2 M (pH 2,2) por 30 min a temperatura ambiente para o desligamento do anticorpo primário anteriormente utilizado e posteriormente incubada com anticorpo anti-AT₂ por 1 h, também à temperatura ambiente, seguida do anticorpo secundário (após lavagem) repetindo-se o procedimento anterior. A diluição dos anticorpos primários anti-AT1 e anti-AT2 foi 1:500 em leite 2% (p/v) em TBS e a do anticorpo secundário anti-rabbit foi 1:2500 também em leite 2% (p/v) em TBS.

Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados através do programa GraphPad Prisma 5.0. A análise estatística dos resultados foi feita através do teste One-way ANOVA e pós-teste Newman-Keuls. Em todos os casos, as diferenças são consideradas estatisticamente significativas entre os dados quando são menores que 5% ($p < 0,05$), sendo indicadas por asteriscos ou por letras diferentes.

Resultados

Efeito da Angiotensina II na atividade Ca^{2+} -ATPásica total das células LLC-PK₁

Para analisar o efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁, as células foram incubadas com diferentes concentrações de Ang II (10^{-14} M a 10^{-6} M) por 30 min, a 37°C, em 5% de CO_2 , e a atividade enzimática foi medida como descrito no item Material e Métodos. Com isso, foi observado que a Ang II modula a atividade Ca^{2+} -ATPásica total das células de maneira bifásica. Baixas concentrações de Ang II (10^{-14} M a 10^{-10} M) estimulam a atividade enzimática em aproximadamente 65% (10^{-10} M), enquanto altas concentrações do peptídeo (10^{-8} M e 10^{-6} M) não alteram a atividade ATPásica (Figura 11).

Efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica total

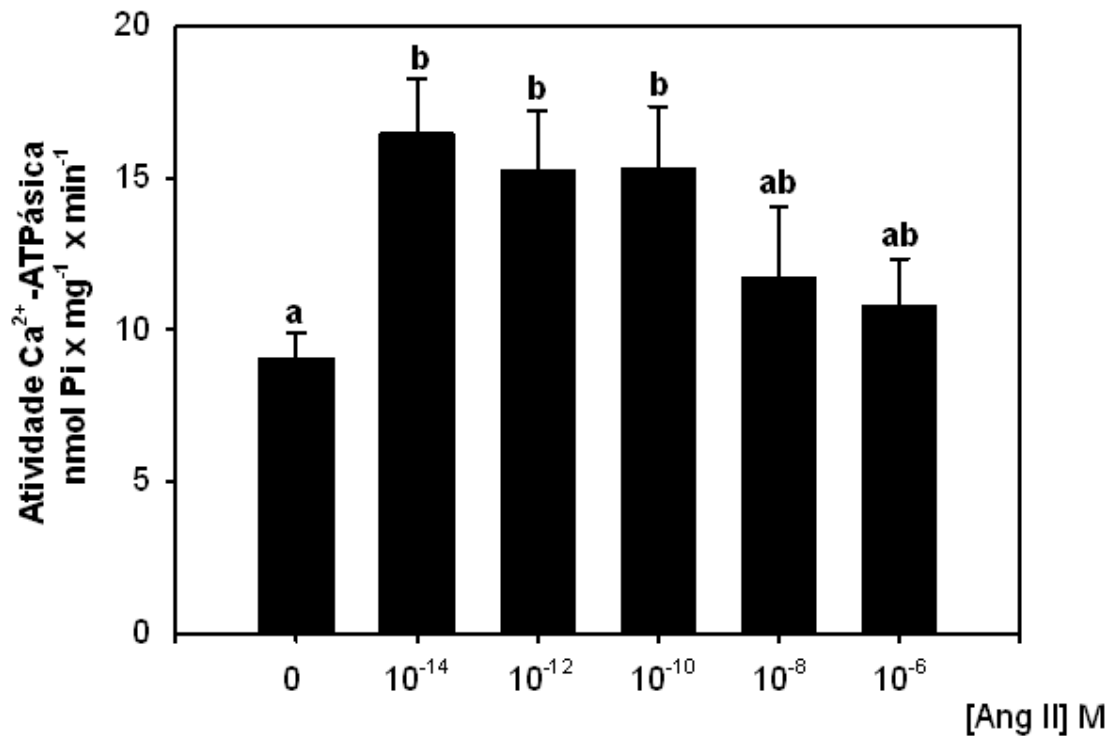


Figura 11. A Ang II modula de maneira bifásica a atividade Ca^{2+} -ATPásica total das células LLC-PK₁. As células foram incubadas com Ang II em diferentes concentrações de 10⁻¹⁴ M a 10⁻⁶ M por 30 min e a atividade Ca^{2+} -ATPásica foi medida conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão (n ≥ 7). a, b: letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Efeito da Angiotensina II na atividade das duas bombas de cálcio das células LLC-PK₁: PMCA e SERCA

Sabendo que a Ang II modula a atividade Ca^{2+} -ATPásica total das células LLC-PK₁ de maneira bifásica, o próximo passo seria investigar se esse efeito era resultado do estímulo das duas bombas de cálcio, PMCA e SERCA. Para analisar o efeito da Ang II na atividade das duas bombas de Ca^{2+} , PMCA e SERCA, foi utilizada a tapsigargina. Esse fármaco inibe especificamente a atividade da SERCA, sendo possível observar a atividade da PMCA apenas. Já a regulação da atividade da SERCA pela Ang II foi analisada pela diferença entre a atividade Ca^{2+} -ATPásica total e a PMCA. Assim, foi possível observar que a Ang II em baixas concentrações leva a um grande estímulo da atividade da SERCA. Já altas concentrações de Ang II não alteram a atividade enzimática dessa bomba (Figura 12).

Já na PMCA, a Ca^{2+} -ATPase de membrana basolateral, nenhuma concentração de Ang II foi capaz de modular a atividade desta enzima (Figura 13). Os resultados indicam que o efeito estimulatório da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica total das células LLC-PK₁ é devido ao efeito da Ang II na atividade da SERCA, além disso este hormônio não modula a atividade da PMCA nas células LLC-PK₁ via membrana luminal. A Ang II promove um estímulo, também de maneira bifásica, similar ao perfil da Ca^{2+} -ATPase total, na atividade da SERCA.

Efeito da Ang II na atividade da SERCA

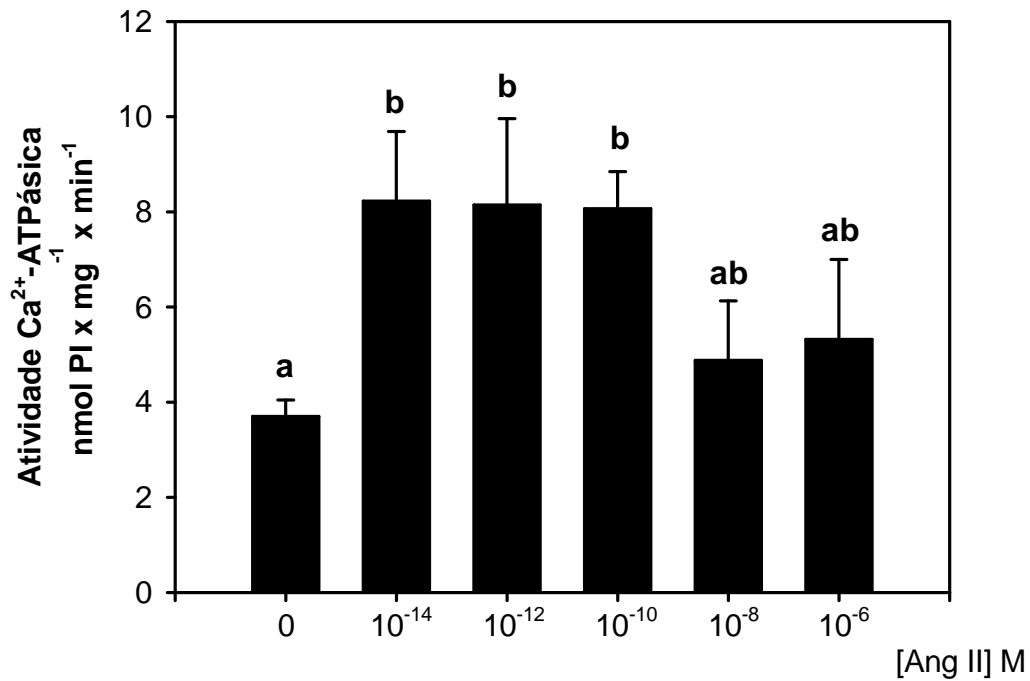


Figura 12. A Ang II modula a atividade da SERCA das células LLC-PK₁ também de maneira bifásica. As células foram incubadas com Ang II em diferentes concentrações de 10⁻¹⁴ M a 10⁻⁶ M por 30 min e a atividade da SERCA foi medida conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão (n ≥ 4). a, b: letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Efeito da Ang II na atividade da PMCA

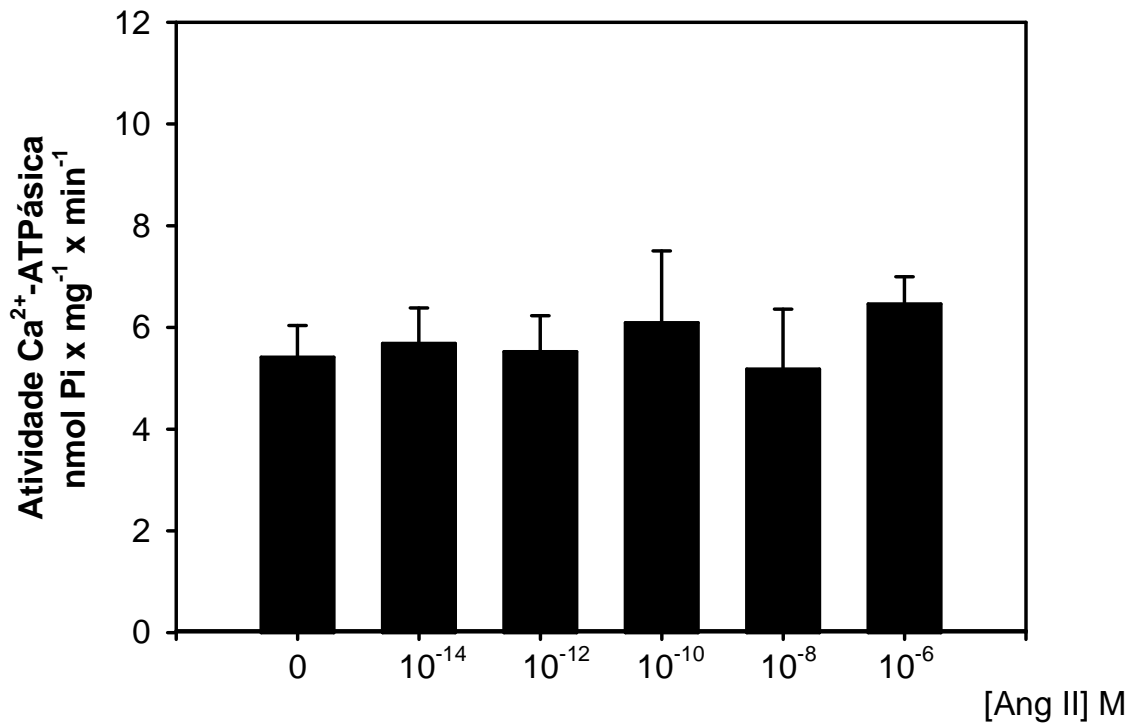


Figura 13. A Ang II não modula a atividade da PMCA das células LLC-PK₁ via membrana luminal. As células foram incubadas com Ang II em diferentes concentrações de 10⁻¹⁴ M a 10⁻⁶ M por 30 min e a atividade da PMCA foi medida conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão (n ≥ 5). Não se observou diferença estatística entre as diferentes concentrações de Ang II.

Curso temporal do efeito da Angiotensina II na atividade Ca^{2+} -ATPásica total, PMCA e SERCA

Para o melhor entendimento do efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica dessas células, foi realizado um curso temporal. Para isso, as células foram incubadas com Ang II 10^{-10} M por diferentes tempos (30 seg, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min e 60 min) a 37°C a 5% de CO_2 .

Com isso, foi possível observar que com 30 seg de incubação, a Ang II já estimula a atividade Ca^{2+} -ATPásica total das células LLC-PK₁, assim como a atividade da SERCA. Esse estímulo se prolonga até 30 min. Após 1 hora de incubação, o efeito estimulatório da Ang II na Ca^{2+} -ATPase total e na SERCA retorna a valores do controle. Em nenhum tempo de incubação a Ang II foi capaz de modular a atividade da PMCA das células LLC-PK₁ via membrana luminal (Figura 14).

Efeito da Ang II 10^{-10} M na atividade Ca^{2+} -ATPásica Curso temporal

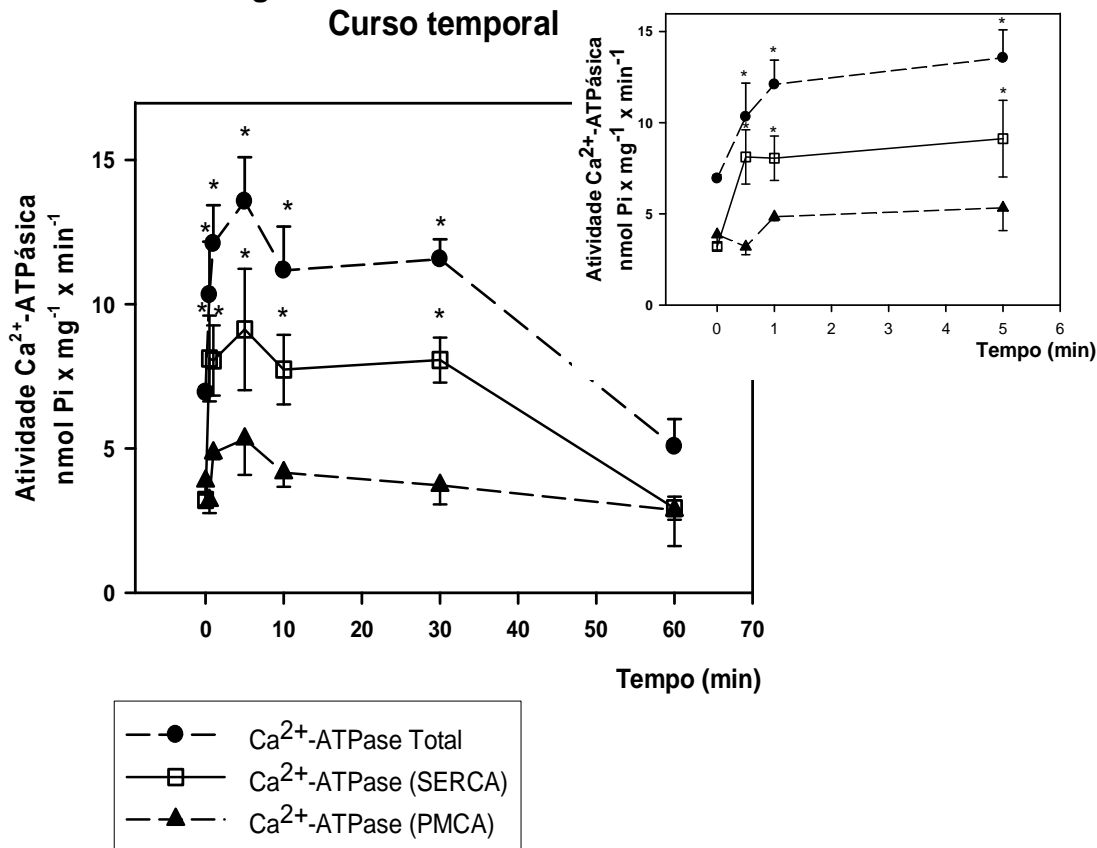


Figura 14. Efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica total (●), SERCA (□) e PMCA (▲) das células LLC-PK₁ em diferentes tempos. As células foram incubadas com Ang II 10^{-10} M por diferentes tempos (30 seg, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min e 60 min) e a atividade Ca^{2+} -ATPásica foi medida conforme descrito em Material e Métodos. No *inset*, o efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica total (●), SERCA (□) e PMCA (▲) de 0 a 5 min, para melhor visualização. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão ($n \geq 4$). * representa valores estatisticamente diferentes do controle e de 60 min ($p < 0,05$).

Análise do receptor envolvido no efeito da Angiotensina II na atividade da SERCA das células LLC-PK₁

Para saber qual receptor a Ang II está ativando para promover seus efeitos na atividade da SERCA das células LLC-PK₁, foram utilizados os antagonistas dos receptores AT₁ (losartan) e AT₂ (PD123319).

As células foram incubadas com losartan 10⁻¹⁰ M e PD123319 10⁻⁷ M por 10 min antes da incubação com Ang II 10⁻¹⁰ M por 30 min a 37°C a 5% de CO₂. Além disso, as células foram também incubadas apenas na presença dos antagonistas dos receptores losartan e PD123319, para verificar se essas substâncias eram capazes de modular a atividade da Ca²⁺-ATPase.

Com isso, foi observado que tanto o losartan quanto o PD123319 foram capazes de bloquear o estímulo da atividade Ca²⁺-ATPase total (Figura 15) e da SERCA (Figura 16A) promovidos pela Ang II nas células LLC-PK₁. Os dois antagonistas sozinhos, losartan e PD123319, não possuem efeito nem na Ca²⁺-ATPase total nem na atividade da SERCA dessas células. Já a PMCA não foi modulada em nenhuma condição (Ang II 10⁻¹⁰ M, losartan, PD123319, Ang II com losartan e Ang II com PD123319) (Figura 16B).

Esses resultados indicam que a Ang II via membrana luminal das células LLC-PK₁, atua via receptor sensível ao losartan e ao PD123319, antagonistas dos receptores AT₁ e AT₂ respectivamente, para promover o estímulo direto da atividade Ca²⁺-ATPásica total, resultante do estímulo da atividade da SERCA das células LLC-PK₁, indicando fortemente que o receptor envolvido nesse estímulo é um heterodímero AT₁/AT₂.

Efeito da Ang II 10^{-10} M na atividade Ca^{2+} -ATPásica total na presença de Losartan e PD 123319

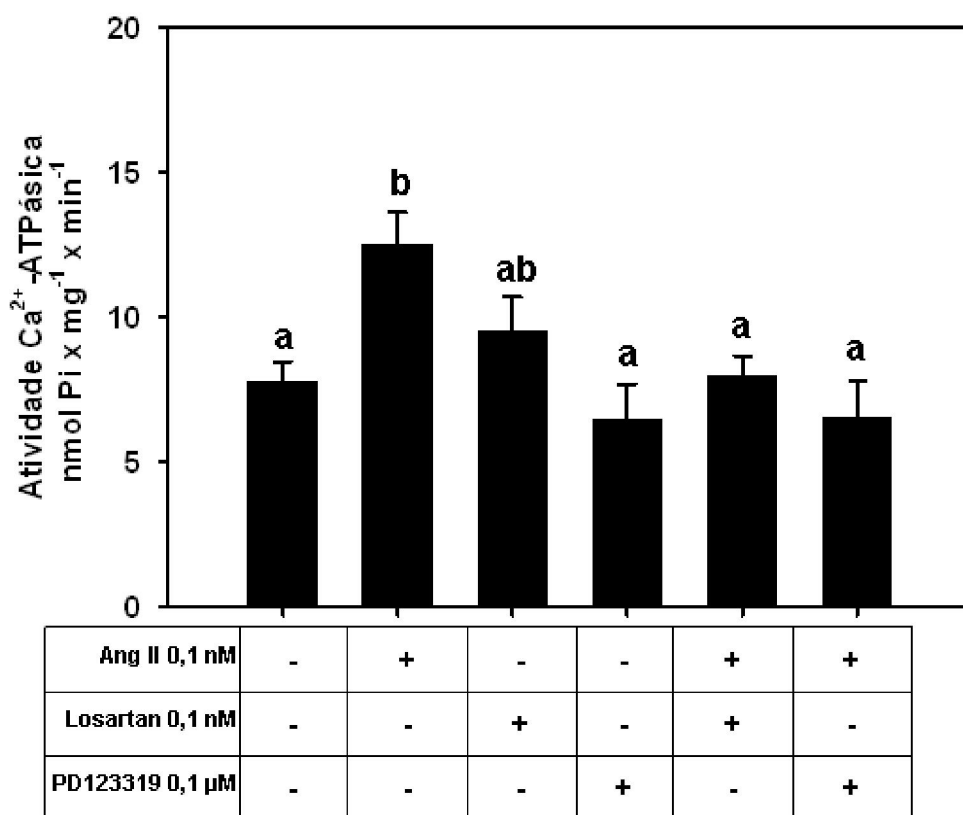
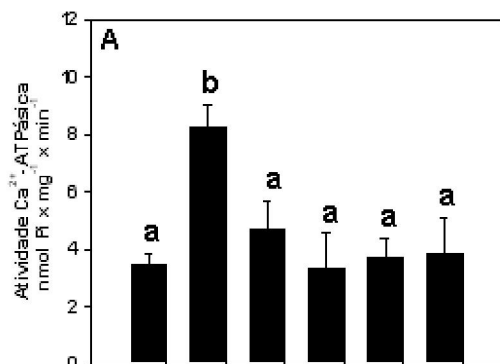


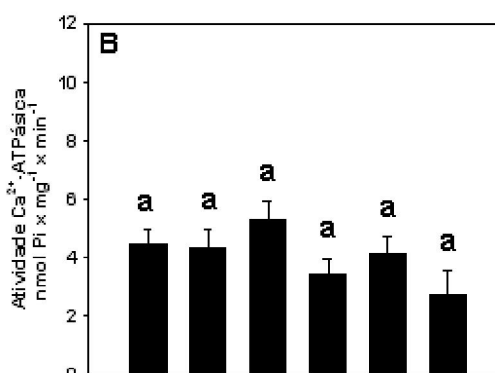
Figura 15. Análise do receptor envolvido no efeito da Angiotensina II na atividade Ca^{2+} -ATPásica total das células LLC-PK₁. As células foram incubadas com losartan 10^{-10} M ou PD123319 10^{-7} M por 10 min antes da incubação com Ang II 10^{-10} M por 30 min e a atividade Ca^{2+} -ATPásica foi medida conforme descrito em Material e Métodos. Tanto o losartan (antagonista do receptor AT₁), quanto o PD123319 (antagonista do receptor AT₂), foram capazes de bloquear o estímulo promovido por Ang II 10^{-10} M na atividade Ca^{2+} -ATPásica total. O losartan 10^{-10} M e o PD123319 10^{-7} M *per se* não modulam a atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão ($n \geq 4$). a, b: letras diferentes representa valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Efeito da Ang II 10^{-10} M na atividade da SERCA na presença de Losartan e PD 123319



Ang II 0,1 nM	-	+	-	-	+	+
Losartan 0,1 nM	-	-	+	-	+	-
PD123319 0,1 μ M	-	-	-	+	-	+

Efeito da Ang II 10^{-10} M na atividade da PMCA na presença de Losartan e PD 123319



Ang II 0,1 nM	-	+	-	-	+	+
Losartan 0,1 nM	-	-	+	-	+	-
PD123319 0,1 μ M	-	-	-	+	-	+

Figura 16. Análise do receptor envolvido no efeito da Angiotensina II na atividade da SERCA (A) e PMCA (B) das células LLC-PK₁. As células foram incubadas com losartan 10^{-10} M ou PD123319 10^{-7} M por 10 min antes da incubação com Ang II 10^{-10} M por 30 min e a atividade Ca²⁺-ATPásica foi medida conforme descrito em Material e Métodos. Tanto o losartan (antagonista do receptor AT₁), quanto o PD123319 (antagonista do receptor AT₂), foram capazes de bloquear o estímulo promovido por Ang II 10^{-10} M na atividade da SERCA (A). O losartan 10^{-10} M e o PD123319 10^{-7} M *per se* não modulam a atividade Ca²⁺-ATPásica das células LLC-PK₁. A PMCA (B) não foi modulada em nenhuma das condições de incubação. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão ($n \geq 4$). a, b: letras diferentes representa valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Identificação dos receptores de Angiotensina II AT₁ e AT₂ nas células LLC-PK₁ e a possível formação de heterodímeros

O estímulo promovido pela Ang II na atividade Ca²⁺-ATPásica das células LLC-PK₁ via receptor sensível ao losartan e ao PD123319, antagonistas dos receptores AT₁ e AT₂, respectivamente, indica fortemente que é um heterodímero AT₁/AT₂.

Para confirmar a expressão dos receptores AT₁ e AT₂ nas células LLC-PK₁, e analisar a possível formação de heterodímeros AT₁/AT₂ nessas células, foi realizada uma imunoprecipitação seguida de Western blotting. Primeiramente os receptores AT₁ e AT₂ foram imunoprecipitados, conforme descrito no item Material e Métodos, e depois foi realizado um Western blotting para a detecção do receptor AT₁ (Figura 17). Com isso foi possível observar que, na imunoprecipitação do AT₁, seguido de Western blotting para o próprio AT₁, esse receptor é realmente expresso nas células LLC-PK₁. A baixa detecção desse receptor no sobrenadante indica que a imunoprecipitação foi bem sucedida. Já a imunoprecipitação do receptor AT₂ seguida de Western blotting para o receptor AT₁, sendo o último detectado com a imunoprecipitação com o anticorpo anti-AT₂, indica que esses dois receptores formam um heterodímero AT₁/AT₂ nas células LLC-PK₁, podendo, assim, o AT₁ ser imunoprecipitado com o anticorpo anti-AT₂. Uma maior detecção do receptor AT₁ ocorreu na imunoprecipitação com o anticorpo anti-AT₁ do que com o anticorpo anti-AT₂, indicando que nem todo receptor AT₁ expresso nessas células forma heterodímeros com o receptor AT₂. Ele também é expresso sozinho ou na forma de homodímero AT₁/AT₁.

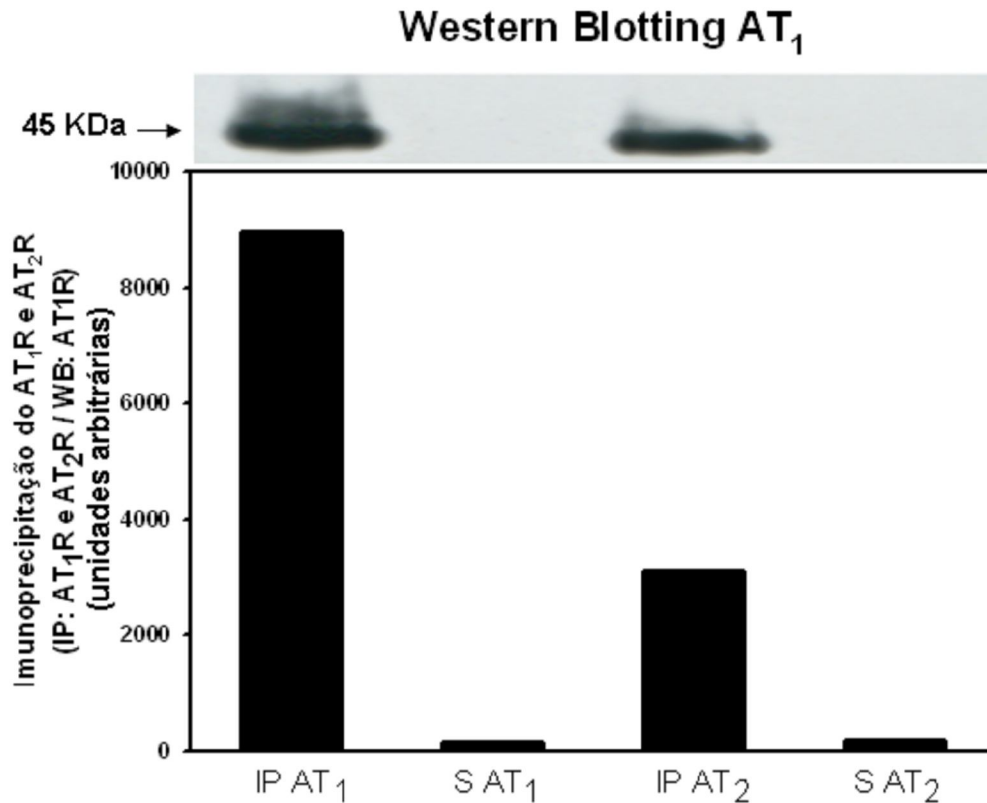


Figura 17. Os receptores de angiotensina AT₁ e AT₂ formam heterodímeros AT₁/AT₂ nas células LLC-PK₁. Os receptores AT₁ e AT₂ foram imunoprecipitados, conforme descrito em Material e Métodos, e depois foi realizado um Western blotting para a detecção do receptor AT₁. O gráfico demonstra a análise densitométrica do Western blotting para o receptor AT₁, indicando tanto os imunoprecipitados (IP), quanto os sobrenadantes (S). A imunoprecipitação do receptor AT₁, seguida de Western blotting para o mesmo, confirma a expressão desse receptor nas células LLC-PK₁. Já a imunoprecipitação do receptor AT₂, seguida de Western blotting para a detecção do receptor AT₁, indica a formação de heterodímeros AT₁/AT₂ nessas células.

Após a detecção do receptor AT₁, com Western blotting com anticorpo anti-AT₁, a mesma membrana sofreu tratamento com glicina e o Western blotting foi repetido, só que com o anticorpo anti-AT₂ para a detecção do mesmo (Figura 18). Assim como para o receptor AT₁, a imunoprecipitação com anticorpo anti-AT₂ seguida de Western blotting para o próprio receptor AT₂ demonstrou a expressão desse receptor nas células LLC-PK₁. A baixa detecção desse receptor no sobrenadante também indica que a imunoprecipitação foi bem sucedida. Na imunoprecipitação para o receptor AT₁, seguida de Western blotting para o receptor AT₂, o receptor AT₂ foi detectado, confirmando assim a formação de heterodímeros AT₁/AT₂ nessas células, já que o receptor AT₂ pode ser imunoprecipitado com o anticorpo anti-AT₁. Assim como o AT₁, o receptor AT₂ também foi mais detectado na imunoprecipitação com o anticorpo anti-AT₂ do que com o anticorpo anti AT₁, indicando que esse receptor também é expresso sozinho ou na forma de homodímero AT₂/AT₂ e em menor quantidade na forma de heterodímeros com o receptor AT₁.

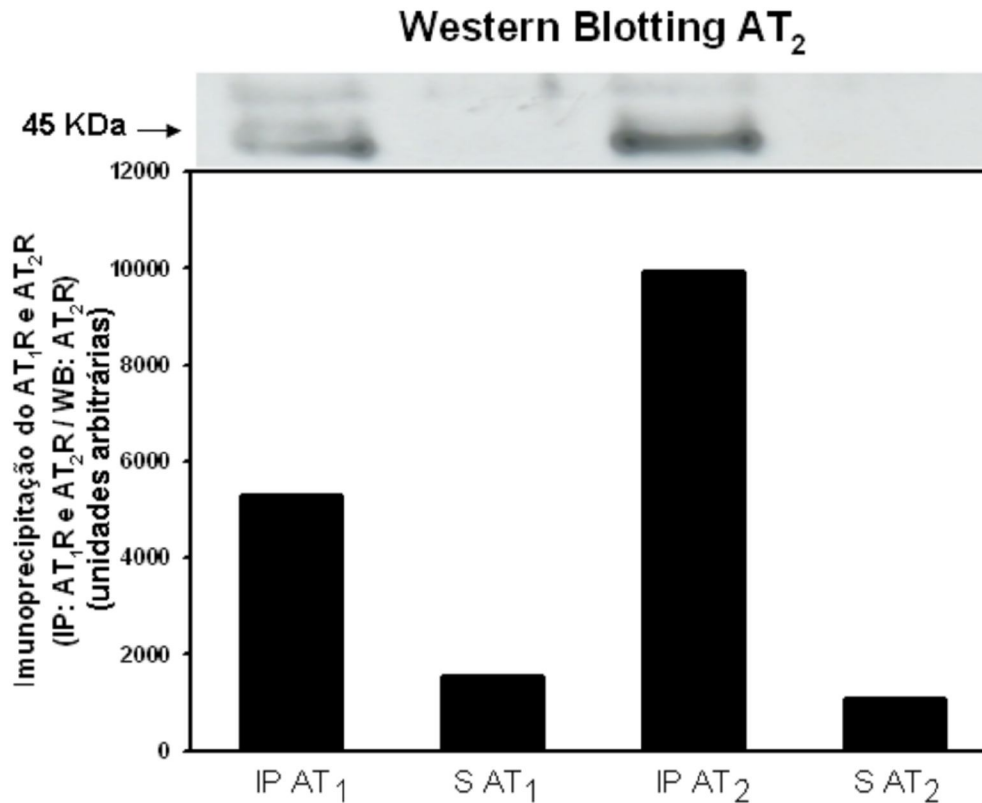


Figura 18. Análise da expressão do receptor de angiotensina AT₂ e a confirmação da formação de heterodímeros AT₁/AT₂ nas células LLC-PK₁. Os receptores AT₁ e AT₂ foram imunoprecipitados, conforme descrito em Material e Métodos, e depois foi realizado um Western blotting para a detecção do receptor AT₂. O gráfico demonstra a análise densitométrica do Western blotting para o receptor AT₂, indicando tanto os imunoprecipitados (IP), quanto os sobrenadantes (S). A imunoprecipitação do receptor AT₂, seguida de Western blotting para o mesmo, confirma a expressão desse receptor nas células LLC-PK₁. Já a imunoprecipitação do receptor AT₁, seguida de Western blotting para o receptor AT₂, confirma a formação de heterodímeros AT₁/AT₂ nessas células.

Análise da via ativada por Angiotensina II para promover seus efeitos na atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁

Sabendo que a Ang II via membrana luminal das células LLC-PK₁ estimula a atividade da SERCA e que esse estímulo ocorre via um heterodímero AT₁/AT₂, o próximo passo foi investigar qual via de sinalização celular está envolvida nesse efeito. Tendo em vista que os principais efeitos desencadeados por Ang II ocorrem via receptor AT₁ acoplado a proteína G_q, e culmina na ativação da PLC, levando à ativação de PKC, essa cinase foi investigada para analisar se sua ativação está envolvida com o efeito da Ang II na atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁. Para isso, as células foram tratadas com o inibidor específico da PKC (50 nM Calfofina C) por 10 minutos antes da incubação com Ang II 10⁻¹⁰ M por 30 min, a 37°C, em 5% de CO₂. Posteriormente a atividade enzimática foi medida segundo o método colorimétrico de Taussky e Shorr (1953).

Com isso, foi possível observar que a Calfofina C foi capaz de bloquear o estímulo, tanto da Ca^{2+} -ATPase total (Figura 19), quanto da SERCA (Figura 20A), promovido pela Ang II nas células LLC-PK₁. Isso indica que a PKC está envolvida na via de sinalização ativada pela Ang II, levando ao estímulo da atividade da SERCA das células renais em questão. A atividade da PMCA não foi modulada em nenhuma das condições (Ang II 10⁻¹⁰ M e Calfofina C 50 nM com Ang II 10⁻¹⁰ M) (Figura 20B).

Efeito da Ang II 10^{-10} M na atividade Ca^{2+} -ATPásica total na presença de Calfofostina C

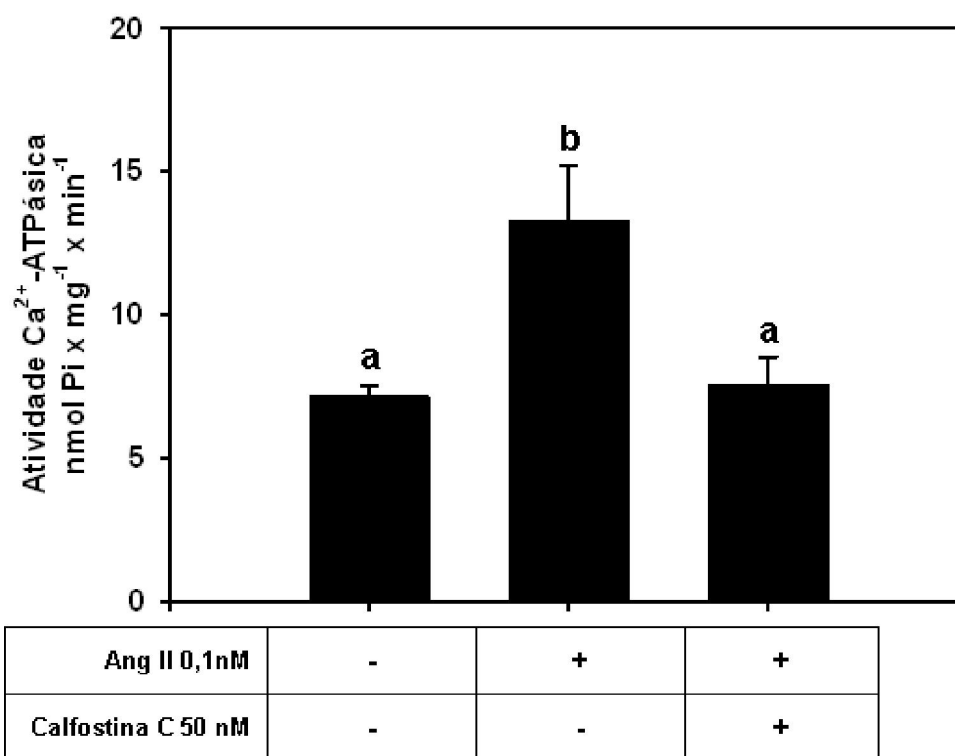


Figura 19. A PKC está envolvida na via de sinalização ativada por Ang II para estimular a atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁. As células foram tratadas com 50 nM Calfofostina C (inibidor específico da PKC) por 10 minutos antes da pré-incubação com Ang II 10^{-10} M por 30 min e a atividade Ca^{2+} -ATPásica foi medida conforme descrito em Material e Métodos. A Calfofostina C foi capaz de bloquear o estímulo promovido por Ang II 10^{-10} M na atividade Ca^{2+} -ATPásica total. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão ($n \geq 6$). a, b: letras diferentes representa valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

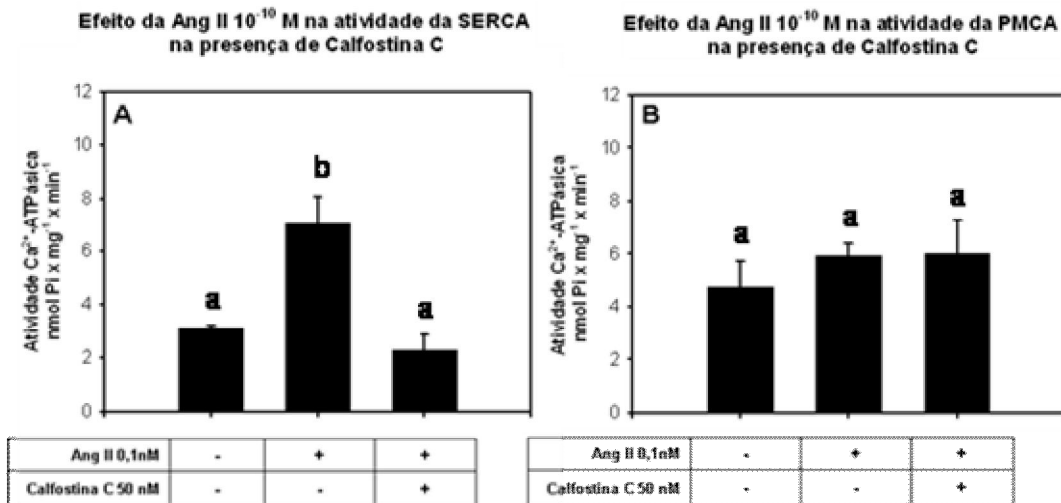


Figura 20. A PKC está envolvida na via de sinalização ativada por Ang II para estimular a atividade da SERCA das células LLC-PK₁. As células foram tratadas com 50 nM Calfofostina C (inibidor específico da PKC) por 10 minutos antes da pré-incubação com Ang II 10⁻¹⁰ M por 30 min e a atividade Ca²⁺-ATPásica foi medida conforme descrito em Material e Métodos. A Calfofostina C foi capaz de bloquear o estímulo promovido por Ang II 10⁻¹⁰ M na atividade da SERCA (A). A PMCA (B) não foi modulada em nenhuma das condições de incubação. Os resultados são expressos como média ± erro padrão (n ≥ 6). a, b: letras diferentes representa valores estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Discussão

Esta dissertação mostrou que Ang II intratubular modula exclusivamente a atividade da bomba de Ca^{2+} do tipo SERCA. Conforme apresentado na introdução, a Ang II é um hormônio chave na regulação do tônus vascular, volume extracelular e a pressão arterial. A regulação do volume extracelular pela Ang II ocorre no rim, alterando a reabsorção de Na^+ , por exemplo, através das ATPases de Na^+ (ver revisão Caruso-Neves *et al.*, 2001; Féraille & Doucet, 2001). Nesse caso, a concentração do Ca^{2+} intracelular é de extrema importância, já que o aumento desse cátion no citoplasma leva à consequente ativação dessas ATPases, uma via dependente de PKC (Ibarra *et al.*, 2002; Rangel *et al.*, 2002), aumentando a reabsorção de Na^+ e água, consequentemente do volume extracelular.

O estímulo da Ang II na célula leva ao aumento do Ca^{2+} no citoplasma, seja provindo do meio extracelular (De Mello, 1998; Eto *et al.*, 2002) ou dos estoques intracelulares (Zhuo *et al.*, 2006), ativando enzimas que possuem domínios de ligação de Ca^{2+} e que são ativadas por essa ligação, passando adiante o sinal iniciado pelo aumento da concentração de Ca^{2+} (Hook & Means, 2001; Parker & Murray-Rust, 2004). Além desse aumento, vindo dos estoques intracelulares ou do meio extracelular, uma outra forma de controlar suas concentrações, é regulando os transportadores de Ca^{2+} , como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a atividade e expressão da SERCA e PMCA, que são responsáveis pelo transporte em massa e o ajuste fino das concentrações de Ca^{2+} , respectivamente.

Na reabsorção tubular de solutos e água do ultrafiltrado pelos diferentes segmentos do néfron, o túbulo proximal é responsável por cerca de 70% dessa reabsorção, e qualquer alteração nesse processo pode levar a grandes danos ao

organismo como um todo, sendo esse segmento do néfron considerado um excelente alvo de hormônios e autacóides como, por exemplo, Ang II. Já foi demonstrado que as células LLC-PK₁, que são células imortalizadas derivadas de túbulo proximal, expressam as duas bombas de Ca²⁺ (PMCA e SERCA) e que a adição de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) leva à liberação de mais de 60 % do Ca²⁺ estocado, sendo essas células consideradas um excelente modelo para o estudo do manejo de cálcio renal (Parys *et al.*, 1986). Além disso, já foi visto também através da técnica de RT-PCR, que essas células apresentam RNAm dos receptores de Ang II AT₁ e AT₂ (Schupp *et al.*, 2007) e, através de Western blotting, a expressão do AT₂, que foi aumentada com o uso de PMA (análogo ao DAG, estimula PKC) (Landgraf *et al.*, 2009), portanto essas células são ideais para o estudo dos efeitos da Ang II nas células renais.

Devido à grande importância da Ang II na função cardiovascular, e à participação essencial do Ca²⁺ na contração cardíaca, diversos estudos analisam o binômio Ang II – Ca²⁺ nas células e tecidos cardiovasculares. Muitos desses estudos direcionam para o efeito da Ang II no balanço de Ca²⁺, tentando elucidar como ocorre o manejo desse íon por esse hormônio. Nesse sentido, já foi demonstrado que a Ang II levou ao aumento do Ca²⁺ citoplasmático provindo do meio extracelular em células do músculo liso vascular de rato (Haller *et al.*, 1996). Sabendo que a Ang II é capaz de alterar a homeostasia de Ca²⁺ nesses tecidos, diversos grupos tentam elucidar os mecanismos pelos quais isso ocorre. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), a expressão da SERCA em aorta abdominal é mais elevada do que em ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY), o que leva ao aumento da atividade da SERCA e à captação de Ca²⁺ para o retículo nesses ratos (Levitsky *et al.*, 1993). Foi observado também que os níveis de

RNA_m da PMCA 1 e da SERCA 2 também estão aumentados em células de músculo liso de aorta em ratos SHR, comparados com ratos WKY, e a Ang II foi capaz de aumentar esses níveis nas células dos dois grupos de ratos (Monteith *et al.*, 1997). No coração, já foi demonstrado que a Ang II é capaz de diminuir a expressão da SERCA 2 em cardiomiócitos ventriculares (Ju *et al.*, 1996). Tratamento com valsartan (antagonista do receptor AT₁) restaurou a captação de Ca²⁺ para o retículo e a quantidade de SERCA, em preparação de retículo sarcoplasmático isolado de cardiomiócitos de cachorros com falência cardíaca (Okuda *et al.*, 2004) e captopril (inibidor da ECA) atenuou a redução dos níveis de RNA_m e proteína SERCA e fosfolamban, com conseqüente diminuição do “uptake” de Ca²⁺ para o retículo e atividade da SERCA em coração de ratos com falência cardíaca e infarto do miocárdio (Shao *et al.*, 1999). Estes dados sugerem que a Ang II está envolvida nas alterações no manejo de Ca²⁺ em patologias cardíacas.

Esses resultados indicam que a Ang II é capaz de elevar as concentrações de Ca²⁺ intracelular não só pela liberação dos estoques intracelulares e aumento da entrada do Ca²⁺ extracelular, como também através da regulação dos transportadores desse cátion. Porém, esses resultados obtidos nos tecidos cardiovasculares foram obtidos em longos períodos de tempo (de horas e até semanas), e levaram principalmente a alterações nos níveis de RNA_m e expressão das Ca²⁺-ATPases, o que levou, conseqüentemente, a alteração na captação de Ca²⁺ e na atividade dessas ATPases. O aumento do Ca²⁺ citoplasmático por Ang II, nas células cardiovasculares, pode levar a conseqüências como hipertrofia cardíaca, alterações na sístole e diástole e vasoconstrição. As alterações promovidas por Ang II nos transportadores de Ca²⁺

são diferentes para cada modelo, indicando diferentes mecanismos de adaptação dos tecidos à Ang II.

Já no tecido renal há poucos estudos analisando o efeito desse hormônio na regulação dos transportadores de Ca^{2+} , que são necessários para a regulação da reabsorção de Na^+ e água, e do próprio íon Ca^{2+} nos rins.

Os resultados obtidos nessa dissertação demonstraram que o mecanismo de regulação dos transportadores de Ca^{2+} no rim pela Ang II é diferente do que no sistema cardiovascular, onde foi demonstrada alteração lenta da atividade da SERCA, regulada pela alteração da expressão gênica. Já no rim, a resposta a Ang II via membrana luminal das células LLC-PK₁ é rápida e se sustenta por 30 min, sem alteração provável na expressão gênica da SERCA, o que concorda com o fato de que, no rim, a resposta a Ang II na reabsorção de Na^+ e água é uma resposta rápida.

O nosso laboratório demonstrou que a Ang II é capaz de regular a atividade da PMCA de maneira bifásica, inibindo a atividade em baixas concentrações e levando ao retorno dessa atividade em altas concentrações (Axelband *et al.*, 2009a). A inibição da PMCA por Ang II é uma das formas de controlar o Ca^{2+} intracelular, diminuindo o efluxo de Ca^{2+} da célula e aumentando sua concentração no meio intracelular. Porém, esses resultados foram obtidos em fração de membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ovelha, ou seja, o efeito analisado foi da Ang II intersticial somente na atividade da PMCA. Em cultura de células íntegras, como as células de túbulo proximal de rim de porco, LLC-PK₁, existem outros componentes e enzimas intracelulares que não estão presentes em frações de membrana basolateral. Além disso, na célula íntegra está presente outra bomba de cálcio intracelular, a SERCA, que é a Ca^{2+} -ATPase

de membrana do retículo sarcoendoplasmático, responsável por formar os estoques intracelulares de cálcio no retículo, e na célula em cultura, a membrana luminal fica exposta, permitindo o estudo do efeito da Ang II via membrana luminal na atividade Ca^{2+} -ATPásica dessas células.

Como descrito na introdução, a luz tubular apresenta altas concentrações de Ang II que é filtrada, secretada, ou produzida no próprio túbulo, sugerindo que a Ang II luminal seria tão importante quanto a intersticial na regulação de diversos efeitos nas células do túbulo proximal, inclusive na reabsorção de Na^+ e água. Ou seja, a análise do efeito da Ang II via membrana luminal na atividade da SERCA e PMCA das células de túbulo proximal é de grande importância, ajudando na compreensão dos mecanismos da regulação do manejo de Ca^{2+} nessas células. Com os resultados aqui obtidos pode-se observar uma diferente regulação nas ATPases de Ca^{2+} por Ang II mediados pelas duas membranas plasmáticas presentes nas células de túbulo proximal: a membrana basolateral e a membrana luminal. Nesse sentido, a Ang II pelo lado intersticial leva ao aumento do Ca^{2+} intracelular (com inibição da PMCA via membrana basolateral) e pelo lado luminal diminui a concentração desse cátion no citoplasma (com estímulo da SERCA via membrana luminal). Porém, já que esses resultados foram obtidos em modelos experimentais diferentes (fração de membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ovelha e células LLC-PK₁), mais análises são necessárias para elucidar a regulação da homeostasia do Ca^{2+} intracelular nas células de túbulo proximal pela Ang II. O aumento da concentração de Ang II sistêmica é acompanhada por aumento da Ang II no lado luminal que, por sua vez, tem como papel fisiológico controlar uma possível exacerbação dos efeitos da Ang II nas células de túbulo proximal.

A Ang II via membrana luminal estimulou a atividade da SERCA das células LLC-PK₁ e não modulou a atividade da PMCA, indicando que a SERCA é a ATPase alvo da Ang II luminal para regular as concentrações de Ca²⁺ citoplasmático nessas células. Já foi demonstrado que a Ang II via membrana luminal aumenta a reabsorção de Ca²⁺ nos túbulos proximal e distal, ativando o canal de cálcio e o trocador Na⁺/Ca²⁺ (Menè *et al.*, 1990; Charbonneau *et al.*, 2001), e o estímulo da atividade da SERCA pela Ang II luminal pode contribuir para o aumento da reabsorção desse cátion. A Ang II já se mostrou capaz de regular a atividade da PMCA de túbulo proximal através da membrana basolateral, onde estão presentes somente as enzimas dessa membrana (Assunção-Miranda *et al.*, 2005; Axelband *et al.*, 2009a). Nas células LLC-PK₁, o efeito analisado foi via membrana luminal e, por ser tratar de uma célula íntegra, vias de sinalização intracelular, que não estão presentes nas frações de membrana basolateral, se encontram no citoplasma dessas células. Além disso, esses resultados indicam que a PMCA só é modulada quando a Ang II atua via membrana basolateral, sendo, provavelmente, totalmente dependente de uma sinalização basolateral.

A Ang II via membrana luminal modulou a atividade Ca²⁺-ATPásica das células LLC-PK₁ de maneira bifásica, estimulando a atividade enzimática em baixas concentrações e não apresentando tal estímulo em altas concentrações. Diversos estudos demonstraram efeitos bifásicos para a Ang II, inclusive no túbulo proximal (Harris & Young, 1977; Romero *et al.*, 1991; Wang & Glebisch, 1996; Axelband *et al.*, 2009a). Em termos biológicos, o efeito bifásico desse hormônio é importante para que não haja a exacerbação de seus efeitos, que seriam deletérios para o organismo (esse é outro mecanismo de controle de exacerbação

de efeito, diferente daquele descrito acima). Existem várias hipóteses para justificar o efeito bifásico da Ang II: (1) a simples degradação do octapeptídeo em metabólitos inativos. Nesse caso, as angiotensinases presentes no rim, que já foram descritas tanto na membrana basolateral, quanto luminal (Allred *et al.*, 2000; Shaltout *et al.*, 2007) clivam a Ang II em metabólitos menores, e a simples degradação da Ang II acabaria com seus efeitos; (2) a degradação da Ang II por angiotensinases e geração de metabólitos ativos, que podem atuar em receptores específicos e gerar efeitos contra-regulatórios à Ang II (Axelband *et al.*, 2009a); (3) pela dessensibilização de receptores de angiotensina causada pela exposição a altas concentrações de Ang II; (4) pela endocitose da Ang II juntamente com seu receptor e “down regulation” da via de sinalização ativada pela Ang II (por exemplo, via β -arrestina) (Anborgh *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2003; Violin *et al.*, 2006).

No presente trabalho, o estímulo da atividade da SERCA das células LLC-PK₁ pela Ang II via membrana luminal está correlacionado com o aumento das reservas de Ca²⁺ intracelular, o que poderia levar a uma resposta mais eficiente ao agonista, tanto para a ativação dos transportadores de Na⁺, quanto para o início da ativação de vias correlacionadas a danos renais.

Uma outra hipótese, que não pode ser ignorada, é ser o estímulo da SERCA pela Ang II essencial para impedir os efeitos deletérios do Ca²⁺, já que altas concentrações desse íon no meio intracelular por longos períodos são prejudiciais à célula, levando, por exemplo, à apoptose. O aumento da extrusão de Ca²⁺ do citoplasma pode ocorrer como um processo adaptativo, capaz de minimizar os efeitos de altas concentrações de Ca²⁺ citoplasmático, e para evitar

a exacerbação dos efeitos da Ang II. Mais estudos precisam ser realizados para obter resposta sobre a homeostasia do Ca^{2+} renal.

Embora tenha sido demonstrada a presença de RNAm para os receptores AT_1 e AT_2 nas células LLC-PK₁ (Schupp *et al.*, 2007), e a expressão do AT_2 aumentada com o uso de PMA (Landgraf *et al.*, 2009), a expressão dos dois receptores (AT_1 e AT_2) nessas células e a formação de heterodímeros ainda não foram demonstradas. A imunoprecipitação seguida de Western blotting demonstrou a expressão desses dois receptores de angiotensina nas células LLC-PK₁. A reversão do estímulo da SERCA pela Ang II na presença tanto de losartan, antagonista do receptor AT_1 , quanto de PD123319, antagonista do receptor AT_2 , indica que o receptor envolvido nesse estímulo é um heterodímero AT_1/AT_2 . A heterodimerização é um fenômeno comum que pode acontecer entre os receptores acoplados a proteína G e, inclusive, já foi relatado a formação de heterodímeros AT_2/B_2 (Abadir *et al.*, 2006), AT_1/B_2 (AbdAlla *et al.*, 2000) e AT_1/AT_2 (AbdAlla *et al.*, 2001a, Axelband *et al.*, 2009a). Ou seja, a heterodimerização do receptor AT_1/AT_2 pode modular respostas desencadeadas por Ang II em diversos modelos que expressam os dois receptores. Já tem sido, mesmo, sugerido que a dimerização seria um pré-requisito para a ativação das vias de sinalização acopladas a diferentes classes de receptores. Nesse caso, é postulada a idéia do “modelo do receptor em dois estados”, onde o monômero seria a conformação inativa e o dímero a conformação ativa. Um exemplo disso foi observado com receptores β_2 -adrenérgicos acoplados a adenilato ciclase, onde a dimerização foi necessária para ativação do receptor (Hebert *et al.*, 1996).

A reversão do efeito da Ang II na SERCA por losartan e PD123319 sugere que a Ang II, através da membrana luminal, desencadeia uma resposta celular

que envolve um heterodímero AT_1/AT_2 em células LLC-PK₁. A imunoprecipitação dos receptores indicou também que nem todo AT_1 e AT_2 estão formando heterodímeros, eles também se encontram isolados ou na forma de homodímeros. Os receptores AT_1 e AT_2 participam do equilíbrio dinâmico $AT_1 + AT_1 \leftrightarrow AT_1/AT_1$, $AT_2 + AT_2 \leftrightarrow AT_2/AT_2$, e $AT_1 + AT_2 \leftrightarrow AT_1/AT_2$, que pode ser modulado dependendo da concentração do agonista. Por exemplo, em resultados prévios de nosso laboratório, as frações de membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ovelha apresentaram heterodímeros AT_1/AT_2 na condição controle, a Ang II em baixas concentrações (10^{-10} M) inibiu a atividade da PMCA atuando via esse heterodímero. Já altas concentrações de Ang II (10^{-6} M) levaram à formação de Ang-(3-4) e à dissociação do heterodímero, atuando esse dipeptídeo via AT_2 para promover a reversão da inibição da atividade da PMCA (Axelband *et al.*, 2009a).

O mecanismo pelo qual não ocorre modulação na atividade da SERCA das células LLC-PK₁ em altas concentrações de Ang II ainda é desconhecido. Das hipóteses já citadas para o motivo do efeito bifásico da Ang II, as hipóteses mais prováveis seriam: o mesmo motivo descrito por Axelband e colaboradores em 2009, com a geração de metabólitos de angiotensina, dissociação do heterodímero e atuação dos mesmos por receptores específicos; ou a endocitose do receptor estimulada por altas concentrações de Ang II. Dados recentes do nosso laboratório (da Silva *et al.*, 2007) mostraram que há um acentuado decréscimo na quantidade de receptores AT_1 e AT_2 na membrana basolateral de células de túbulos proximais de ratos submetidos a desnutrição crônica, uma condição em que o SRA está estimulado. Porém, não é sabido, ainda, como fica o equilíbrio $AT_1 + AT_2 \leftrightarrow AT_1/AT_2$ nas células LLC-PK₁ na presença de altas

concentrações de Ang II, nem se há a formação de metabólitos menores de angiotensina, nesse modelo, para afirmar o motivo real do efeito bifásico da Ang II. Se houver endocitose do receptor ativado por altas concentrações de Ang II, pode ser endocitose do heterodímero, ou dissociação do mesmo e endocitose apenas do AT₁, já que o AT₂ tem se mostrado resistente a internalização em resposta a ligação do agonista (Csikos *et al.*, 1998).

Já foi demonstrado que, em heterodímeros AT₁/AT₂, o receptor AT₂ antagonizou as respostas mediadas pelo receptor AT₁, inibindo a ativação do AT₁ (AbdAlla *et al.*, 2001a). Essa união faz com que o AT₂ estabilize ou induza uma conformação no receptor AT₁ que não permita a mudança conformacional necessária para ativação da proteína G. Porém, nos resultados prévios do nosso laboratório, a Ang II em baixas concentrações, atuou via heterodímeros AT₁/AT₂ em membrana basolateral de túbulo proximal de rim de ovelha, inibindo a PMCA, através da via de sinalização normalmente ativada pelo AT₁ (PLC/DAG/PKC) (Axelband *et al.*, 2009a). Sendo essa via ativada pelo receptor AT₁, a principal via pela qual a Ang II atua para promover seus efeitos, foi aqui investigado se essa via estaria de alguma forma envolvida nos efeitos da Ang II observados em células LLC-PK₁.

A utilização do inibidor específico da PKC (calfostina C), mostrou que essa enzima também está envolvida na via de sinalização ativada por Ang II via membrana luminal para estimular a atividade da SERCA nas células LLC-PK₁. Ou seja, o estímulo da Ang II no heterodímero AT₁/AT₂ estimulou a via acoplada ao receptor AT₁. Esses resultados indicam que a dimerização levaria a mudanças conformacionais que permitiriam a ligação de Ang II com alta afinidade no componente AT₁, mas não no AT₂ (por impedimento estérico), levando a ativação

da proteína G (G_q , normalmente descrita para o AT_1), conseqüentemente culminando na ativação seqüencial da PLC e da PKC que, por último, leva ao estímulo da atividade da SERCA. A PMCA é inibida pela Ang II via membrana basolateral através da PKC (Assunção-Miranda *et al.*, 2005; Axelband *et al.*, 2009a). Porém, não se sabe qual o tipo da PKC envolvida nesse caso, só que se trata de uma PKC localizada na membrana basolateral, já que os resultados obtidos foram em frações enriquecidas dessa membrana. Nas células LLC-PK₁, a não modulação da PMCA pela Ang II via membrana luminal indica que essa enzima só é modulada quando a Ang II atua via membrana basolateral, sendo dependente de vias presentes na membrana basolateral, inclusive de uma isoforma de PKC presente nessa membrana. O estímulo da SERCA pela Ang II via membrana luminal dessas células, indica que a isoforma da PKC ativada nesse caso, é uma PKC citoplasmática ou de membrana, que não modula a atividade da PMCA. Ou seja, a diferença na ativação da SERCA e da PMCA pode estar relacionada com diferentes isoformas de PKC. Além disso, já que os efeitos aqui analisados foram efeitos via membrana luminal, a não modulação da atividade da PMCA pela Ang II pode ser devido à distância entre o sinal estimulado por esse hormônio e a ATPase, que está localizada na membrana basolateral. Nesse caso, o sinal estimulado pela Ang II através da membrana luminal pode não alcançar a PMCA, localizada na outra membrana dessa célula, não alterando sua atividade.

Não há evidências de que o fosfolamban seja expresso no rim, então o estímulo da atividade da SERCA nessas células – derivadas de túbulo proximal de rim de porco – pela Ang II, através da PKC, provavelmente não ocorre via fosforilação do fosfolamban e a conseqüente reversão da atividade da SERCA,

que estava diminuída pela ligação ao fosfolamban não fosforilado. Alguns estudos descrevem que SERCA 2b, a isoforma constitutiva, está presente no rim e é regulada por PKC em diferentes modelos biológicos. Em neurônios, a ativação da PKC acelerou a captação de Ca^{2+} mediado pela SERCA 2b para o retículo endoplasmático, por aumentar a atividade dessa ATPase (Usachev *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos em células da tireóide, nas quais a ativação da PKC também levou ao aumento da atividade da SERCA 2b (Ulianich *et al.*, 2006). Em conjunto com esses resultados, a regulação da SERCA das células renais LLC-PK₁ por PKC, sugere que a SERCA 2b também seja regulada por essa cinase, levando à sua ativação. Porém, o alvo da fosforilação por PKC que é responsável pela ativação da SERCA ainda não é conhecido. A SERCA nas células renais poderia ser regulada por outras proteínas análogas ao fosfolamban, como é sugerido em neurônios (Usachev *et al.*, 2006), que poderiam ser as proteínas alvo para a fosforilação da PKC, levando à redução da inibição da SERCA e aumento de sua atividade. A regulação direta da SERCA pela PKC também não pode ser descartada. Já foi demonstrado que as SERCAs 2 (a e b) podem ser moduladas diretamente através da fosforilação pela CAMK, o que leva ao estímulo da atividade dessa bomba (Toyofuku *et al.*, 1994). Isso indica que a SERCA apresenta sítios de fosforilação para a CAMK, podendo apresentar, igualmente, sítios para a fosforilação de outras cinases, como a PKC, sendo assim regulada diretamente por essa enzima.

Paradoxalmente, a Ang II, apesar de ser conhecida por liberar Ca^{2+} de seus estoques intracelulares, também ativa a PKC, que leva ao estímulo da atividade da SERCA, aumentando a entrada de Ca^{2+} para o retículo endoplasmático, a fim de restabelecer os estoques intracelulares desse íon,

evitando seus efeitos deletérios. O estímulo da SERCA pela Ang II também pode ser uma forma de compensar as altas concentrações de Ca^{2+} citoplasmático, ou de aumentar os estoques intracelulares desse íon para uma resposta mais eficiente ao agonista. Além disso, o estímulo da SERCA, aumentando a captação de Ca^{2+} pelo retículo, sendo um dos fatores que geram um gradiente eletroquímico favorável à entrada passiva de Ca^{2+} via membrana luminal, pode levar à maior reabsorção desse íon estimulada pela Ang II. Apesar de, sustentada, a atividade da PMCA, há estudos demonstrando que a Ang II, via membrana luminal, aumenta a reabsorção de Ca^{2+} nos túbulos proximais, ativando o canal de cálcio (Menè *et al.*, 1990; Charbonneau *et al.*, 2001), o que pode ser favorecido pelo estímulo da SERCA.

Pelo fato da Ang II atuar via Ca^{2+} intracelular como segundo mensageiro, e aumentar suas concentrações no citoplasma, a captação deste cátion poderia ser aumentada, para que os estoques de Ca^{2+} fossem recuperados. Porém, o estímulo da Ang II na atividade da SERCA via membrana luminal das células LLC-PK₁ é um efeito rápido (30 seg) e persistente (30 min), indicando que não ocorre apenas para retornar a níveis de Ca^{2+} basal, sendo uma forma de controlar o balanço desse íon nessas células. Além disso, a atividade da PMCA não foi modulada em nenhum tempo de incubação com Ang II, não aumentando o efluxo de Ca^{2+} da célula, indicando que o estímulo na SERCA não foi devido apenas ao aumento de Ca^{2+} intracelular, para somente reestabelecer os estoques intracelulares desse íon. Outro fato que indica que esse efeito não se deve apenas ao aumento de Ca^{2+} intracelular é que a inibição da PKC com calfofostina C impediu o estímulo da SERCA por Ang II, mostrando que a ativação dessa cinase pelo octapeptídeo é necessária para seu efeito na SERCA.

Apesar de ter sido aqui demonstrado que a Ang II via membrana luminal das células LLC-PK₁ leva ao estímulo rápido e duradouro da atividade da SERCA, a variação de Ca²⁺ intracelular por esse longo período de tempo e a alteração na reabsorção de Ca²⁺ por Ang II nessas células ainda não são conhecidos.

Com base nos resultados apresentados nessa dissertação, a SERCA aparece como mais um alvo para os efeitos da Ang II e as vias de sinalização ativadas por ela, sendo sua atividade controlada diretamente por esse hormônio. Em conjunto com as observações discutidas acima, os resultados aqui expostos mostram a regulação da SERCA por PKC. Mais questões, no entanto, precisam ser abordadas e respondidas para que se entenda completamente o mecanismo dessa regulação. A regulação da atividade da SERCA pela Ang II via membrana luminal e da PMCA via membrana basolateral (Assunção-Miranda *et al.*, 2005; Axelband *et al.*, 2009a), mostra que o efeito da Ang II na atividade das bombas de Ca²⁺ nas células do túbulo proximal é dependente da membrana em que ela atua. Além disso, foi demonstrado, em outro modelo, que a dimerização dos receptores é essencial para que haja a resposta do agonista, sendo que os efeitos da Ang II via membrana luminal das células LLC-PK₁ ocorrem via heterodímero AT₁/AT₂. Em células que expressam os dois receptores e que podem formar heterodímeros AT₁/AT₂, para modular os efeitos da Ang II, a idéia de que o monômero seria a conformação inativa e o dímero a conformação ativa, fica cada vez mais em evidência, sendo um interessante campo ainda a ser desvendado.

Conclusões

A partir dos dados obtidos nessa dissertação, pode-se postular as seguintes conclusões, posteriormente esquematizadas na Figura 21:

- A Ang II via membrana luminal modula a atividade Ca^{2+} -ATPásica das células LLC-PK₁ de maneira bifásica, ativando essa atividade em baixas concentrações (10^{-14} M a 10^{-10} M) e não modulando a atividade em altas concentrações (10^{-8} M a 10^{-6} M).

- A SERCA é a ATPase alvo da Ang II luminal para o controle das concentrações de Ca^{2+} citoplasmáticos nas células de túbulo proximal. Quanto à outra bomba de Ca^{2+} , denominada PMCA, não foi modulada por nenhuma concentração de Ang II, em nenhum tempo de incubação observado.

- As células LLC-PK₁ expressam os receptores de angiotensina AT₁ e AT₂, e uma parcela desses receptores se encontram na forma de heterodímeros AT₁/AT₂.

- Os heterodímeros AT₁/AT₂ são essenciais para os efeitos da Ang II via membrana luminal na atividade da SERCA, pois esses efeitos são revertidos na presença tanto de losartan, quanto de PD123319, indicando que a Ang II atua via heterodímeros AT₁/AT₂ para estimular a SERCA.

- A via de sinalização ativada pela Ang II para estimular a atividade da SERCA via membrana luminal envolve a ativação da PKC, uma vez que a inibição dessa enzima por calfofostina C bloqueia o estímulo.

- Sendo a via PLC/DAG/PKC a principal via de sinalização deflagrada pela ativação do receptor AT₁, os resultados aqui mostrados indicam que a ativação do

heterodímero AT₁/AT₂ leva a ativação da proteína G descrita para AT₁, ou seja, envolvendo uma PKC, que por fim, leva a ativação da SERCA.

- O estímulo da SERCA pela Ang II via membrana luminal das células LLC-PK₁ é um estímulo rápido (30 seg) e persistente (30 min), indicando tratar-se de uma importante forma de controlar as concentrações de Ca²⁺ intracelulares.

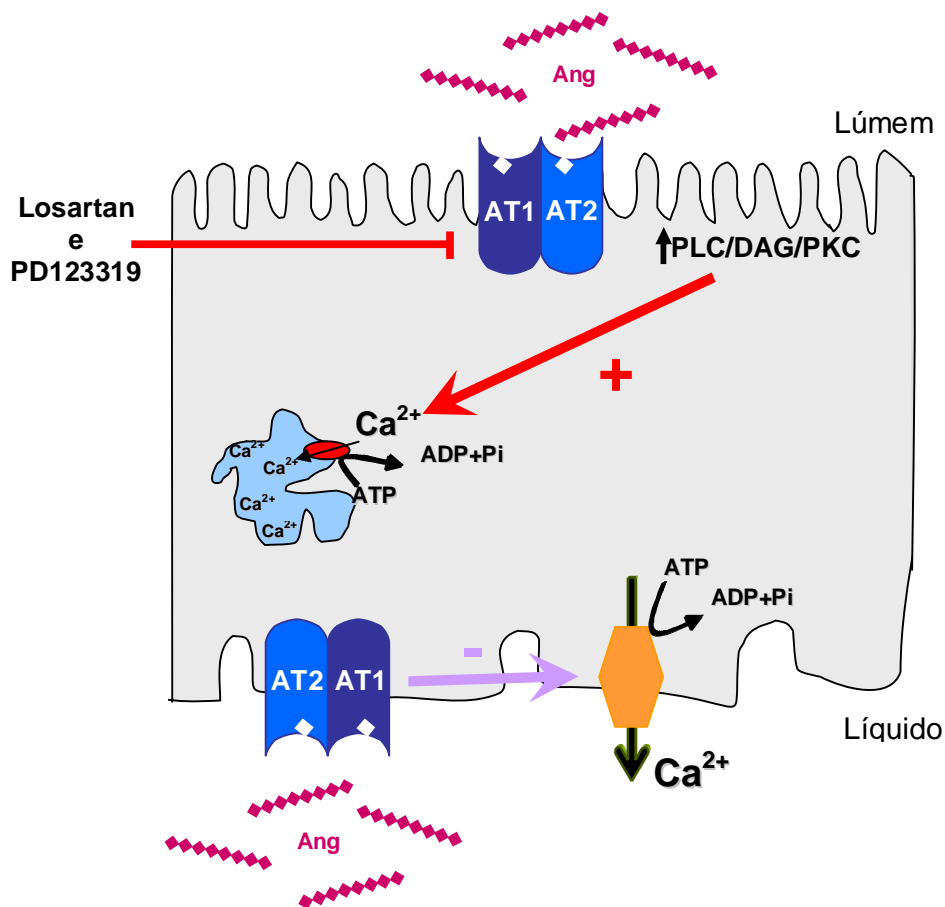


Figura 21. Modelo proposto para o efeito da Ang II via membrana luminal na atividade Ca²⁺-ATPásica das células LLC-PK₁. A Ang II via membrana luminal atua em um receptor sensível ao losartan e ao PD123319, que é um heterodímero AT₁/AT₂, ativando a via PLC/DAG/PKC, levando ao estímulo da atividade da SERCA no retículo endoplasmático, mas não modulando a atividade da PMCA localizada na membrana basolateral (Adaptado de Axelband *et al.*, 2009a).

Perspectivas Futuras

Sabendo que a Ang II, via membrana luminal das células LLC-PK₁, regula a atividade da SERCA de maneira bifásica, estimulando a atividade em baixas concentrações, e não modulando essa atividade em altas concentrações, e que esse efeito ocorre via receptor sensível a losartan e ao PD123319, que se mostrou ser um heterodímero AT₁/AT₂, através da via da PKC, os objetivos futuros visam analisar o motivo que faz esse efeito ser bifásico.

Primeiramente será investigada a possível proteólise limitada da Ang II via membrana luminal dessas células. Como já mencionado, a membrana luminal das células de túbulo proximal é rica em angiotensinases, que podem ser responsáveis pela metabolização da Ang II. O simples fato dela ser degradada, já levaria a ausência de regulação da atividade da SERCA e os aminoácidos resultantes poderiam ser reabsorvidos pelas células de túbulo proximal, evitando perdas na urina.

Porém, se a análise da proteólise limitada indicar a geração de metabólitos derivados de angiotensina, ao invés de sua total degradação, a ausência de modulação da atividade da SERCA, em presença de altas concentrações de Ang II pode ser devido a ações biológicas desses metabólitos. Nesse caso será analisado o equilíbrio do heterodímero AT₁/AT₂, para saber se altas concentrações de Ang II levam à formação de metabólitos menores e à dissociação do heterodímero. Como descrito acima, a simples dissociação do heterodímero e a presença apenas dos monômeros AT₁ e AT₂ poderia ser suficiente para bloquear a ativação. Será investigado também, se os metabólitos gerados atuam via receptores específicos, sendo os responsáveis pelo bloqueio do estímulo.

Outra importante hipótese para o efeito bifásico da Ang II na atividade da SERCA que não pode ser descartada, e que vai ser investigada, é a endocitose da Ang II junto com receptor e “downregulation” da via de sinalização. Se essa hipótese for confirmada, será analisada a participação da β -arrestina nessa internalização e se a endocitose da Ang II ocorre junto com o heterodímero AT₁/AT₂ ou se altas concentrações de Ang II induzem a dissociação do dímero e a endocitose ocorre apenas com o receptor AT₁, já que o AT₂ tem se mostrado resistente à endocitose.

Outro aspecto que será investigado futuramente é o efeito da Ang II na atividade da SERCA em preparação de retículo endoplasmático de células de túbulo proximal de rim de porco isolado. Para isso será feita uma preparação purificada dessa organela e será analisada a presença de receptores de angiotensina (inclusive de dímeros), de enzimas sinalizadoras (como a PKC, por exemplo). Assim, poderá ser verificado se a Ang II agindo diretamente no retículo possui o mesmo efeito na atividade da SERCA do que via membrana luminal. Além disso, se a Ang II for realmente internalizada junto com seu receptor, ela poderá ter efeitos intracelulares, podendo atuar diretamente no retículo, regulando a atividade da SERCA.

Se confirmado a endocitose da Ang II com seu receptor, a metabolização intracelular desse peptídeo também será analisada, já que, apesar de ter sido demonstrado que a Ang II é expressa no meio intracelular, inclusive de células de túbulo proximal (Zhuo *et al.*, 2006), seja ela sintetizada no citoplasma ou internalizada, pouco se sabe sobre seu metabolismo no meio intracelular, sendo essa uma área interessante a ser desvendada.

Referências

- Abadir, P.M., Periasamy, A., Carey, R.M., Siragy, H.M. (2006) Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension*. **48**: 316-322.
- AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A.M., Quitterer, U. (2001a) The angiotensin AT₂ receptor is an AT₁ receptor antagonist. *J. Biol. Chem.* **276**: 39721-39726.
- AbdAlla, S., Lothar, H., El Massiery, A., Quitterer, U. (2001b) Increased AT₁ receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat. Med.* **7**: 1003-1009.
- AbdAlla, S., Lothar, H., Quitterer, U. (2000) AT₁ receptor heterodimers show enhanced Gprotein activation and altered receptor sequestration. *Nature*. **407**: 94-98.
- Ahn, S., Nelson, C.D., Garrison, T.R., Miller, W.E., Lefkowitz, R.J. (2003) Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 1740-1744.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (2002) *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Rev. e atual. Porto Alegre: Artes Médicas 1294p.
- Alenina, N., Xu, P., Rentzsch B., Patkin, E.L., Bader, M. (2007) Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol* **93.5**: 528-537.
- Allred, A.J., Diz, D.I., Ferrario, C.M., Chappell, M.C. (2000) Pathways for angiotensin-(1-7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**: F841-F850.
- Almeida, W.S., Maciel, T.T., Di Marco, G.S., Casarini, D.E., Campos, A.H., Schor, N. (2006) Escherichia coli lipopolysaccharide inhibits renin activity in human mesangial cells. *Kidney Int.* **69**: 974-980.
- Anborgh, P.H., Seachrist, J.L., Dale, L.B., Ferguson, S.S. (2000) Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol. Endocrinol.* **14**: 2040- 2053.
- Anderson, J.M. (2001) Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.* **16**: 126-130.
- Anderson, K.M., Peach, M.J. (1994) Receptor binding and internalization of a unique biologically active angiotensin II-colloidal gold conjugate: morphological analysis of angiotensin II processing in isolated vascular strips. *J. Vasc. Res.* **31**: 10-17.
- Arredouani, A. (2004) Diversification of function and pharmacology in intracellular calcium signaling. *Cellscience Reviews.* **1**: 30-79.
- Assunção-Miranda, I., Guilherme, A.L., Reis-Silva, C., Costa-Sarmento, G., Oliveira, M.M., Vieyra, A. (2005) Protein kinase C-mediated inhibition of renal Ca²⁺ ATPase by physiological concentrations of angiotensin II is reversed by AT₁- and AT₂-receptor antagonists. *Regul. Pept.* **127**: 151-157.
- Axelband, F., Assunção-Miranda, I., de Paula, I.R., Ferrão, F.M., Dias, J., Miranda, A., Miranda, F., Lara, L.S., Vieyra, A. (2009a) Ang-(3-4) suppresses inhibition of renal plasma membrane calcium pump by Ang II. *Regul. Pept.* **155**: 81-90.

- Axelband, F., Dias, J., Miranda, F., Ferrão, F.M., Barros, N.M., Carmona, A.K., Lara, L.S., Vieyra, A. (2009b) A scrutiny of the biochemical pathways from Ang II to Ang-(3-4) in renal basolateral membranes. *Regul. Pept.* **158**: 47-56.
- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**: 84-101.
- Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Muller, D.N., Luft, F.C., Ganten, D. (2001) Tissue rennin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol. Med.* **79**: 76-102.
- Barber, M.N., Sampey, D.B., Widdop, R.E. (1999) AT₂ receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT₁ receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension.* **34**: 1112-1116.
- Bernstein, K.E., Marrero, M.B. (1996) The importance of tyrosine phosphorylation in angiotensin II signaling. *Trends Cardiovasc Med* **6**: 179-187.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 517-29.
- Berry, C., Touyz, R., Dominiczak, A.F., Webb, R.C., Johns, D.G. (2001) Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology and interactions with ceramide. *Am. J. Physiol.* **281**: H2332-2365.
- Bkaily, G., Sleiman, S., Stephan, J., Asselin, C., Choufani, S., Kamal, M., Jacques, D., Gobeil, F.Jr., D'Orléans-Juste, P. (2003) Angiotensin II AT₁ receptor internalization, translocation and *de novo* synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**: 274-287.
- Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J. P., Clausen, J. D., Dode, L., Kovacs, T., Enouf, J. (2004) Identification, expression, function and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 (SERCA3) gene. *J. Biol. Chem.* **279**: 24297-24306.
- Booz, G.W., Conrad, K.M., Hess, A.L., Singer, H.A., Baker, K.M. (1992) Angiotensin-II binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrin.* **130**: 3641-3649.
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F., Muñoz, J.M. (1940) The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* **98**: 283-298.
- Brini, M., Carafoli, E. (2009) Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **89**: 1341-1378.
- Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T., Carafoli, E. (1992) Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump. *Eur. J. Biochem.* **204**: 939-946.
- Bronner, F., Bosco, J.J., Stein, W.D. (1989) Acute plasma calcium regulation in rats: effect of vitamin D deficiency. *Bone Miner.* **6**: 141-153.
- Bruneval, P., Hinglais, N., Alhenc-Gelas, F., Tricottet, V., Corvol, P., Menard, J., Camilleri, J.P., Bariety, J. (1986) Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultra-structural and immunohistochemical localization. *Histochemistry* **85**: 73-80.
- Bumpus, F.M., Schwartz, H., Page, I.H. (1957) Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science (Wash DC)* **125**: 886-887.
- Campbell, D.J., Lawrence, A.C., Towrie, A., Kladis, A., Valentijn, A.J. (1991) Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension* **18**: 763-773.
- Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.

- Carafoli, E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* **71**: 129-153.
- Carafoli, E., Brini, M. (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 152-161.
- Carey, R.M., Howell, N.L., Jin X-O., Siragy, H.M. (2001) Angiotensin type-2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor blocked rats. *Hypertension.* **38**: 1272-1277.
- Carey, R.M., Siragy, H.M. (2003) The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**: 274-281.
- Carey, R.M., Wang, Z.Q., Siragy, H.M. (1999) Novel actions of angiotensin II via its renal type-2 (AT(2)) receptor. *Curr. Hypertens. Rep.* **1**: 151-157.
- Carey, R.M., Wang, Z.Q., Siragy, H.M. (2000) Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function. *Hypertension* **35**: 155-163.
- Caride, A.J., Elwess, N.L., Verma, A.K., Filoteo, A.G., Enyedi, A., Bajzer, Z., Penniston, J.T. (1999) The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} pump is slow and is changed by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **274**: 35227-35232.
- Caruso-Neves, C., Coelho-Souza, S.A., Vives, D., Goes, G., Lara, L.S., Lopes, A.G. (2002) Modulation of ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg^{2+} , MgATP and furosemide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1586-1593.
- Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Rangel, L.B., Grossi, A.L., Lopes, A.G. (2000) Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1467**: 189-97.
- Caruso-Neves, C., Rangel, L.B., Lara, L.S., Lopes, A.G. (2001) Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. *Braz. J. Biol. Res.* **34**: 1079-1084.
- Chappell, M.C., Diz, D.I., Yunis, C., Ferrario, C.M. (1998b) Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int. Suppl.* **54**: 53-56.
- Chappell, M.C., Pirro, N.T., Sykes, A., Ferrario, C.M. (1998a) Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* **31**: 362-367.
- Chappell, M.C., Welches, W.R., Brosnihan, K.B., Ferrario, C.M. (1992) Inhibition of angiotensin converting enzyme by the metalloendopeptidase 3.4.24.15 inhibitor α -phenylpropyl-alanyl-alanyl-phenylalanyl-p-aminobenzoate. *Peptides.* **13**: 943-946.
- Charbonneau, A., Leclerc, M., Brunette, M.G. (2001) Effect of angiotensin II on calcium reabsorption by the luminal membranes of the nephron. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**: E928-E936.
- Chen, Y., Cai, T., Yang, C., Turner, D.A., Giovannucci, D.R., Xie, Z. (2008) Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated calcium release by the Na/K-ATPase in cultured renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **283**: 1128-1136.
- Christensen, S.B. (1988) Interpretation of the NMR and circular dichroic data of sesquiterpene lactone thapsigargin. *Acta. Chem. Scan.* **342**: 623 - 628.
- Christensen, S.B., Larsen, I.K., Rasmussen, U. (1982) Thapsigargin and thapsigarginin, two histamine liberating sesquiterpene lactones from *Thapsia*

- garganica. X-ray analysis of the 7, 11 - epoxide of thapsigargin. *J. Org. Chem.* **47**: 649 - 652.
- Cook, J.L., Mills, S.J., Naquin, R., Alam, J., Re, R.N. (2006) Nuclear accumulation of the AT₁ receptor in a rat vascular smooth muscle cell line: effects upon signal transduction and cellular proliferation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **40**: 696-707.
- Cornish, K.G., Joyner, W.L., Gilmore, J.P. (1979) Direct evidence for the presence of a different converting enzyme in the hamster cheek pouch. *Circ. Res.* **44**: 540–544.
- Costa-Silva, J.H., Silva, P.A., Pedi, N., Luzardo, R., Einicker-Lamas, M., Lara, L.S., Bezerra, A.M., Castro-Chaves, C., Vieyra, A. (2009) Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur. J. Nutr.* **48**: 437-445.
- Crane, J.K., Campanile, C.P., Garrison, J.C. (1982) The hepatic angiotensin II receptor. II. Effect of guanine nucleotides and interaction with cyclic AMP production. *J Biol Chem* **257**: 4959–4965.
- Csikos, T., Balmforth, A., Grojek, M., Gohlke, P., Culam, J., Unger, T. (1998) Angiotensin AT₂ degradation is prevented by ligand occupation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**: 142-147.
- Curnow, K.M., Pascoe, L., White, P.C. (1992) Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1113–1118.
- Dally, S., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J.P., Clausen, J.D., Dode, L., Fanchaouy, M., Gelebart, P., Monceau, V., Del Monte, F., Gwathmey, J.K., Hajjar, R., Chaabane, C., Bobe, R., Raies, A., Enouf, J. (2006) Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem J.* **395**: 249-258.
- Darby, I.A., Sernia, C. (1995) In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res.* **281**: 197–206.
- Davies, A., Blakeley, G.H.A., Kidd, C. (2001) Human Physiology. Churchill Livingstone, pp. 713-802.
- De Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**: 415-472.
- De Meis, L., Carvalho, M.G. (1976) On the sidedness of membrane phosphorylation by Pi and ATP synthesis during reversal of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* **251**: 1413-1417.
- De Mello, W.C. (1998) Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes. *Hypertension* **32**: 976–982.
- Delorenzi, A., Locatelli, F., Romano, A., Nahmod, V., Maldonado, H. (1997) Angiotensin II (3–8) induces long-term memory improvement in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett.* **226**: 143–146.
- Dinh, D.T., Frauman, A.G., Johnston, C.I., Fabiani, M.E. (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin. Sci. (Lond)*. **100**: 481-492.
- Dode, L., De Greef, C., Mountian, I., Attard, M., Town, M. M., Casteels, R., Wuytack, F. (1998) Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum

- Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **273**: 13982–13994.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S. (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* **87**: E1-E9.
- Doris, P.A. (2000) Renal proximal tubule sodium transport and genetic mechanisms of essential hypertension. *J. Hypertens.* **18**: 509–519.
- Dou, D., Joseph, R. (1996) Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome-20q 11.2–12: the deduced protein is a novel “proteolipid.” *Brain Res.* **723**: 8–22.
- Dzau, V.J., Baxter, J.A., Cantin, M., de Bold, A., Ganten, D., Gross, K., Husain, A., Inagami, T., Menard, J., Poole, S., Robertson, J.I., Tang, J., Yamamoto, K. (1987) Report of the Joint Nomenclature and Standardization Committee of the International Society of Hypertension, American Heart Association and the World Health Organization. *Hypertension* **5**: 507–511.
- East, J.M. (2000) Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure / function and biology. *Mol. Memb. Biol.* **17**: 189 - 200.
- Eggena, P., Zhu, J.H., Clegg, K., Barrett, J.D. (1993) Nuclear Angiotensin Receptors Induce Transcription of Renin and Angiotensinogen mRNA. *Hypertension* **22**: 496-501.
- El-Dorry, H.A., Bull, H.G., Iwata, K., Thornberry, N.A., Cordes, E.H., Soffer, R.L. (1982) Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **257**: 14128-14133.
- Elliott, D.F., Peart, W.S. (1956) Amino acid sequence in a hypertensin. *Nature (Lond)* **177**: 527–528.
- Engeli, S., Negrel, R., Sharma, A.M. (2000) Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* **35**: 1270-1277.
- Eto, K., Ohya, Y., Nakamura, Y., Abe, I., Iida, M. (2002) Intracellular angiotensin II stimulates voltage-operated Ca²⁺ channels in arterial myocytes. *Hypertension.* **39**: 474–478.
- Fabiato, A., Fabiato, F. (1979) Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. (Paris)*. **75**: 463-505.
- Férraille, E., Doucet, A. (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent. Sodium transport in the Kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* **81**: 345-417.
- Ferrario, C.M., Chappell, M.C. (2004) Novel angiotensin peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 2720-2727.
- Ferrario, C.M., Chappell, M.C., Dean, R.H., Iyer, S.N. (1998) Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 1716-1722.
- Filipeanu, C.M., Henning, R.H., Nelemans, S.A., de Zeeuw, D. (2001) Intracellular angiotensin II: from myth to reality? *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2**: 219-226.
- Filoteo, A.G., Elwess, N.L., Enyedi, A., Caride, A., Aung, H.H., Penniston, J.T. (1997) Plasma membrane Ca²⁺ pump in rat brain. *J. Biol. Chem.* **272**: 23741-23747.

- Fleming, I., Kohlstedt, K., Busse, R. (2006) The tissue rennin-angiotensin system and intracellular signalling. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **15**: 8-13.
- Foletti, D., Guerini, D., Carafoli, E. (1995) Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca^{2+} pumps: a study using recombinant chimeras. *FASEB J.* **9**: 670-680.
- Friedman, P.A. (2000) Mechanisms of renal calcium transport. *Exp. Nephrol.* **8**: 343-350.
- Garrison, E.A., Champion, H.C., Kadowitz, P.J. (1997) $[\text{Pro}^{11}, \text{D-Ala}^{12}]$ angiotensin I has rapid onset vasoconstrictor activity in the cat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **273**: E1059-E1064.
- Gmaj, P., Zurini, M., Murer, H., Carafoli E. (1983) A high-affinity, calmodulin-dependent Ca^{2+} pump in the basal-lateral plasma membranes of kidney cortex. *Eur. J. Biochem.* **136**: 71-76.
- Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R.F., Summerville, W.W. (1934) Studies on experimental hypertension: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* **59**: 347-379.
- Gomez, R.A., Lynch, K.R., Chevalier, R.L., Wilfong, N., Everett, A., Carey, R.M., Peach, M.J. (1988) Renin and angiotensinogen gene expression in the maturing rat kidney. *Am. J. Physiol.* **254**: F582-F587.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E. (2003) Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**: 1-44.
- Graciano, M.L., de Cassia Cavaglieri, R., Dellê, H., Dominguez, W.V., Casarini, D.E., Malheiros, D.M., Noronha, I.L. (2004) Intrarenal α -emodin-angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**: 1805-1815.
- Griendling, K.K., Delafontaine, P., Rittenhouse, S.E., Gimbrone, M.A.Jr., Alexander, R.W. (1987) Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 14555-14562.
- Griendling, K.K., Murphy, T.J., Alexander, R.W. (1993) Molecular biology of the rennin-angiotensin system. *Circulation* **87**: 1816-1828.
- Grobe, J.L., Mecca, A.P., Lingis, M., Shenoy, V., Bolton, T.A., Machado, J.M., Speth, R.C., Raizada, M.K., Katovich, M.J. (2007) Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **292**: H736-H742.
- Gross, V., Obst, M., Luft, F.C. (2004) Insights into angiotensin II receptor function through AT₂ receptor knockout mice. *Acta Physiol. Scand.* **181**: 487-494.
- Guan, S., Fox, J., Mitchell, K.D., Navar, L.G. (1992) Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* **20**: 763-767.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2002) Tratado de Fisiologia Médica (10^a ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, pp 250-326.
- Haithcock, D., Jiao, H., Cui, X.L., Hopfer, U., Douglas, J.G. (1999) Renal proximal tubular AT₂ receptor: signaling and transport. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**: S69-74.
- Hakam, A.C., Hussain, T. (2006) Angiotensin II AT₂ receptors inhibit proximal tubular Na^+/K^+ -ATPase activity via a NO/cGMP-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**: F1430-1436.

- Haller, H., Lindschau, C., Erdmann, B., Quass, P., Luft, F.C. (1996) Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **79**: 765-772.
- Harris, P.J., Young, J.A. (1977) Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflügers Arch.* **367**: 295–297.
- Harrison-Bernard, L.M., Navar, L.G., Ho, M.M., Vinson, G.P., El-Dahr, S.S. (1997) Immunohistochemical localization of Ang II AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am. J. Physiol-Renal Physiol.* **273**: F170–F177.
- Hebert, T.E., Moffett, S., Morello, J.P., Loisel, T.P., Bichet, D.G., Barret, C., Bouvier, M. (1996) A peptide derived from a β_2 -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* **271**: 16384-16392.
- Hein, L., Meinel, L., Pratt, R.E., Dzau, V.J., Kobilka, B.K. (1997) Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT₁ and AT₂ receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1266–1277.
- Henrich, W.L., McAllister, E.A., Eskue, A., Miller, T., Moe, O.W. (1996) Renin regulation in cultured proximal tubular cells. *Hypertension* **27**: 1337–1340.
- Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2005) Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* **85**: 373-422.
- Hoit, B.D., Shao, Y., Kinoshita, A., Gabel, M., Husain, A., Walsh, R.A. (1995) Effects of angiotensin II generated by an angiotensin converting enzyme-independent pathway on left ventricular performance in the conscious baboon. *J. Clin. Invest.* **95**: 1519–1527.
- Hollenberg, N.K., Fisher, N.D., Price, D.A. (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* **32**: 387–392.
- Hook, S.S., Means, A.R. (2001) Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 471–505.
- Hooper, N.M., Keen, J., Pappin, D.J.C., Turner, A.J. (1987) Pig kidney angiotensin converting enzyme. Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. *Biochem. J.* **247**: 85-93.
- Hoque, M.T., Conseil, G., Cole, S.P. (2009) Involvement of NHERF1 in apical membrane localization of MRP4 in polarized kidney cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**: 60-64.
- Horiuchi, M., Akashita, M., Dzau, V.J. (1999) Recent progress in angiotensin II type-2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* **33**: 613-621.
- Hunt, M.K., Ramos, S.P., Geary, K.M., Norling, L.L., Peach, M.J., Gomez, R.A., Carey, R.M. (1992) Colocalization and release of angiotensin and renin in renal cortical cells. *Am. J. Physiol.* **263**: F363-373.
- Ibarra, F.R., Cheng, S.X., Agrén, M., Svensson, L.B., Aizman, O., Aperia A. (2002) Intracellular sodium modulates the state of protein kinase C phosphorylation of rat proximal tubule Na⁺,K⁺-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* **175**: 165-71.
- Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C., Lewis, D.E. (1980) Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* **255**: 3025-3031.

- Ingelfinger, J., Zuo, W.M., Fon, E.A., Ellison, K.E., Dzau, V.J. (1990) *In situ* hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. *J. Clin. Invest.* **85**: 417-423.
- Inoue, K., Nishimura, H., Kubota, J., Kawamura, K. (1999) Alternative angiotensin II formation in rat arteries occurs only at very high concentrations of angiotensin I. *Hypertension* **34**: 525–530.
- Iwai, N., Inagami, T. (1992) Identification of two subtypes in the rat type 1 angiotensin II receptor. *FEBS lett.* **298**: 257-260.
- Iwasa, V., Hosey, M. M. (1984) Phosphorylation of cardiac sarcolemma proteins by the calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **259**: 534-540.
- Jagadeesh, G. (1999) Angiotensin II receptors: antagonists, molecular biology, and signal transduction. *Indian J. Exptl. Biol.* **36**:1171-1194.
- Jencks, W.P. (1989) How does a calcium pump pump calcium? *J. Biol. Chem.* **264**: 18855-18858.
- Jencks, W.P. (1995) The mechanism of coupling chemical and physical reactions by the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum and other coupled vectorial systems. *Biosci. Rep.* **15**: 283-287.
- Ju, H., Scammel-La Fleur, T., Dixon, I.M. (1996) Altered mRNA abundance of calcium transport genes in cardiac myocytes induced by angiotensin II. *J Mol Cell Cardiol.* **28**: 1119-1128.
- Katz, A.I., Lindheimer, M.D. (1977) Actions of hormones on the kidney. *Ann. Rev. Physiol.* **39**: 97-134.
- Khan, S., Wu, K.L., Sedor, J.R., Abu Jawdeh, B.G., Schelling, J.R. (2006) The NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger regulates cell survival by activating and targeting ezrin to specific plasma membrane domains. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* **52**: 115-121.
- Khosla, M.C., Smeby, R.R., Bumpus, F.M. (1974) Structure activity relationship in angiotensin II analogs, in *Handbook of Experimental Pharmacology*, (Page IH and Bumpus RM eds) XXXVII, pp 126–156, Springer-Verlag, New York.
- Kimbrough, H.M., Vaughan, Jr.E.D., Carey, R.M., Ayers, C.R. (1977) Effect of intrarenal angiotensin II on renal function in conscious dogs. *Circ. Res.* **40**: 174-178.
- Kumar, R., Singh, V.P., Baker, K.M. (2007) The intracellular rennin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**: 208-214.
- Kurisu, S., Ozono, R., Oshima, T., Kambe, M., Ishida, T., Sugino, H., Matsuura, H. (2003) Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension.* **41**: 99-107.
- Landgraf, S. S., Pinheiro, A.A.S., Wengert, M., Takyia, C.M., Sudo,R.T., Zapata-Sudo,G., Caruso-Neves, C. (2009) Imbalance in renal angiotensin receptors play a crucial roling during the development of primary hypertension. In: XVII Congresso de Sociedade Brasileira de Hipertensão and Inter-American Society of Hypertension. Belo Horizonte. IASH.
- Lara, L.S., Bica, R.B., Sena, S.L., Correa, J.S., Marques-Fernandes, M.F., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2002) 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.
- Lara, L.S., Cavalcante, F., Axelband, F., De Souza, A.M., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2006) Involvement of the G_{i/o}/cGMP/PKG pathway in the AT₂-

- mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na⁺-ATPase by Ang-(1-7). *Biochem. J.* **395**: 183-190.
- Le Peuch, C. J., Haiech, J., Demaille, J. G. (1979) Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry.* **18**: 5150-5157.
- Lee, D.K., Lança, A.J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X.D., Gobeil, F. Jr., Chemtob, S., George, S.R., O'Dowd, B.F. (2003) Agonist-independent nuclear localization of the apelin, angiotensin AT₁ and bradykinin B₂ receptors. *J. Biol. Chem.* **279**: 7901-7908.
- Levens, N.R., Freedlender, A.E., Peach, M.J., Carey, R.M. (1983) Control of renal function by intrarenal angiotensin II. *Endocrinology* **112**: 43-49.
- Levens, N.R., Peach, M.J., Carey, R.M. (1981) Role of the intrarenal rennin-angiotensin system in the control of renal function. *Circ. Res.* **48**: 157-167.
- Levitsky, D.O., Clergue, M., Lambert, F., Souponitskaya, M.V., Le Jemtel, T.H., Lecarpentier, Y., Lompré, AM. (1993) Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca⁽²⁺⁾-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Biol. Chem.* **268**: 8325-8331.
- Lipskaia, L., Hulot, J.S., Lompré, A.M. (2009) Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation. *Pflugers. Arch.* **457**: 673-685.
- Loghman, A.M., Soto, C.E., Inagami, T., Cassis, L. (2004) The intrarenal renin angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**: F775-F788.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Machado, U.F. (2008) "Introdução à Fisiologia Endócrina" in Mello-Aires, M. Fisiologia (3ª ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, cap. 61. pp. 919-929.
- Malnic, G. (2008) "Homeostase, Regulação e Controle em Fisiologia" in Mello-Aires, M. Fisiologia (3ª ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, cap. 1. pp. 41-50.
- Mangiapane, M.L., Rauch, A.L., MacAndrew, J.T., Ellery, S.S., Hoover, K.W., Knight, D.R., Johnson, H.A., Magee, W.P., Cushing, D.J., Buchholz, R.A. (1994) Vasoconstrictor action of angiotensin I-convertase and the synthetic substrate (Pro¹¹,D-Ala¹²)-angiotensin I. *Hypertension* **23**: 857-60.
- Mello-Aires, M. (2008a) "Hemodinâmica Renal". Fisiologia (3ª ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, cap. 49. pp. 693-707.
- Mello-Aires, M. (2008b) "Visão Morfofuncional do Rim". Fisiologia (3ª ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, cap. 48. pp. 679-692.
- Mello-Aires, M. (2008c) "Função Tubular". Fisiologia (3ª ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, cap. 50. pp. 708-729.
- Mello-Aires, M. (2008d) "Papel do Rim na Regulação do Volume e da Tonicidade do Fluido Extracelular". Fisiologia (3ª ed.). Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil, cap. 52. pp. 748-767.
- Menè, P., Pugliese, F., Faraggiana, T., Cinotti, G.A. (1990) Identification and characteristics of a Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cultured human mesangial cells. *Kidney Int.* **38**: 1199-1205.

- Miyata, N., Park, F., Li, X.F., Cowley, Jr.A.W. (1999) Distribution of angiotensin AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the rat kidney. *Am. J. Physiol-Renal Physiol.* **277**: F437–F446.
- Moe, O.W., Ujjie, K., Star, R.A., Miller, R.T., Widell, J., Alpern, R.J., Henrich, W.L. (1993) Renin expression in renal proximal tubule. *J. Clin. Invest.* **91**: 774–779.
- Monteith, G.R., Kable, E.P., Kuo, T.H., Roufogalis, B.D. (1997) Elevated plasma membrane and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump mRNA levels in cultured aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**: 344-346.
- Morimoto, S., Sigmund, C.D. (2002) Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system. *Neuropeptides* **36**: 194-200.
- Movsenian, M. A., Nishikawa, M., Adelstein, R. S. (1984) Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J. Biol. Chem.* **259**: 8029-8032.
- Murakami, M., Matsuda, H., Kubota, E., Wakino, S., Honda, M., Hayashi, K., Saruta, T. (1997) Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int.* **63**: S132–S135.
- Navar, L.G. (2009). Glomerular permeability: a never-ending saga. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **296**: F1266-F1268.
- Navar, L.G., Harrison-Bernard, L.M., Nishiyama, A., Kobori, H. (2002) Regulation of Intrarenal Angiotensin II in Hypertension. *Hypertension* **39**: 316-322.
- Navar, L.G., Kobori, H., Prieto-Carrasquero, M. (2003) Intrarenal Angiotensin II and Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **5**: 135-143.
- Navar, L.G., Lewis, L., Hymel, A., Braam, B., Mitchell, K.D. (1994) Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**: 1153–1158.
- Nielsen, A.H., Schauser, K.H., Poulsen, K. (2000) The uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta* **21**: 468-477.
- Nielsen, S., Frokiaer, J., Marples, D., Kwon, T.H., Agre, P., Knepper, M.A. (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol. Rev.* **82**: 205-244.
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V.K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., MacLennan, D.H. (1998) Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem.* **273**: 12360-12369.
- Ohkubo, N., Matsubara, H., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Tsutumi, Y., Shibazaki, Y., Iwasaka, T., Inada, M. (1997) Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation.* **96**: 3954-3962.
- Okuda, S., Yano, M., Doi, M., Oda, T., Tokuhisa, T., Kohno, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ohkusa, T., Matsuzaki, M. (2004) Valsartan restores sarcoplasmic reticulum function with no appreciable effect on resting cardiac function in pacing-induced heart failure. *Circulation.* **109**: 911-919.
- Ortiz-Capisano, M.C., Ortiz, P.A., Harding, P., Garvin, J.L., Beierwaltes, W.H. (2007) Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension.* **49**: 162-169.

- Page, I.H., Helmer, O.M. (1940) A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp Med.* **71**: 29–42.
- Parker, P.J., Murray-Rust, J. (2004) PKC at a glance. *J. Cell Sci.* **117**: 131-132.
- Parys, J.B., De Smedt, H., Borghgraef, R. (1986) Calcium transport systems in the LLC-PK₁ renal epithelial established cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* **888**: 70-81.
- Paxton, W.G., Runge, M., Horaist, C., Cohen, C., Alexander, R.W., Bernstein, K.E. (1993) Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT₁ receptor. *Am. J. Physiol-Renal Physiol.* **264**: F989–F995.
- Peach, M.J. (1977) Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* **57**: 313-370.
- Pederson, E.S., Harding, J.W., Wright, J.W. (1998) Attenuation of scopolamine-induced spatial learning impairments by an Angiotensin IV analog. *Regul Pept.* **74**: 97–103.
- Pendergrass, K.D., Averill, D.B., Ferrario, C.M., Diz, D.I., Chappell, M.C. (2006) Differential expression of nuclear AT₁ receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2. Lewis rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**: F1497-1506.
- Peng, J.B., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2003) Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond. *J Physiol* **551**: 729-740.
- Pickart, C.M., Jencks, W.P. (1984) Energetics of the calcium-transporting ATPase. *J. Biol. Chem.* **259**: 1629-1643.
- Pinheiro, S.V., Simões e Silva, A.C., Sampaio, W.O., de Paula, R.D., Mendes, E.P., Bontempo, E.D., Pesquero, J.B., Walther, T., Alenina, N., Bader, M., Bleich, M., Santos, R.A. (2004) Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* **44**: 490–496.
- Pobiner, B.F., Hewlett, E.L., Garrison, J.C. (1985) Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes. *J Biol Chem* **260**: 16200–16209.
- Pobiner, B.F., Northup, J.K., Bauer, P.H., Fraser, E.D., Garrison, J.C. (1991) Inhibitory GTP-binding regulatory protein Gi3 can couple angiotensin II receptors to inhibition of adenylyl cyclase in hepatocytes. *Mol Pharmacol* **40**: 156–167.
- Prieto-Carrasquero, C.M., Botros, F.T., Kobori, H., Navar, L.G. (2009) Collecting Duct Renin: A major player in Angiotensin II-dependent Hypertension. *J Am Soc Hypertens.* **3**: 96–104.
- Rabin, M., Birnbaum, D., Young, D., Birchmeier, C., Wigler, M., Ruddle, F.H. (1987) Human ros1 and mas1 oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements. *Oncogene Res* **1**: 169–178.
- Rangel, L.B., Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Brasil, F.L., Lopes, A.G. (1999) Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1416**: 309-319.
- Rangel, L.B., Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Lopes, A.G. (2002) Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na⁺-ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1564**: 310-316.
- Rasmussen, U., Christensen, S.B., Sandberg, F. (1978) Thapsigargin and thapsigargin, two new histamine liberators from *Thapsia garganica*. *Acta. Pharmaceut. Suec.* **15**: 133 - 140.

- Re, R., Parab, M. (1984) Effect of angiotensin II on RNA synthesis by isolated nuclei. *Life Sci.* **34**: 647-651.
- Re, R.N. (2003) The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action. *Bioessays* **25**: 401-409.
- Re, R.N., Cook, J.L. (2006) The intracrine hypothesis: an update. *Regul. Pept.* **133**: 1-9.
- Re, R.N., Vizard, D.L., Brown, J., Bryan, S.E. (1984) Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 220-227.
- Reams, G., Villarreal, D., Wu, Z., Bauer, J.H. (1993) Renal tissue angiotensin II: Response to infusions of angiotensin I and an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am. J. Kid. Dis.* **22**: 851-857.
- Robertson, A.L.Jr., Khairallah, P.A. (1971) Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science* **172**: 1138-1139.
- Romero, M.F., Hopfer, U., Madhun, Z.T., Zhou, W., Douglas, J. (1991) Angiotensin II actions in the rabbit proximal tubule, angiotensin II mediated signaling mechanisms and electrolyte transport in the rabbit proximal tubule. *Renal Physiol. Biochem.* **14**: 199-207.
- Santos, C.F., Caprio, M.A., Oliveira, E.B., Salgado, M.C., Schippers, D.N., Munzenmaier, D.H., Greene, A.S. (2003a) Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**: H775-H783.
- Santos, R.A., Haibara, A.S., Campagnole-Santos, M.J., Simões-e-Silva, A.C., Paula, R.D., Pinheiro, S.V.B., Leite, M.F., Lemos, V.S., Silva, D.M.R., Guerra, M.T., Khosla, M.C. (2003b) Characterization of a new selective antagonist for Angiotensin-(1-7), D-pro7-Angiotensin-(1-7). *Hypertension* **41**: 737-743.
- Santos, R.A., Simões-e-Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.P., Speth, R., Walther, T. (2003c) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor MAS. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA.* **100**: 8258-8263.
- Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J.E., Pratt, R.E., Kobilka, B.K., Dzau, V.J. (1992) Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 253-259.
- Schelling, J.R., Linas, S.L. (1994) Angiotensin II-dependent proximal tubule sodium transport requires receptor-mediated endocytosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **266**: C669-C675.
- Schmidt, B., Schieffer, B. (2003) Angiotensin II AT1 receptor antagonists. Clinical implications of active metabolites. *J. Med. Chem.* **46**:2261-2270.
- Schneider, M., Lowell, B. (2001) Judgment day: which angiotensin receptor is the culprit in cardiac hypertrophy? *Circulation.* **104**: 247-248.
- Schulz, W.W., Hagler, H.K., Buja, L.M., Erdos, E.G. (1988) Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab. Invest.* **59**: 789-797.
- Schupp, N., Schmid, U., Rutkowski, P., Lakner, U., Kanase, N., Heidland, A., Stopper, H. (2007) Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can

- be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **292**: F1427–F1434.
- Seikaly, M.G., Arant, B.S.Jr., Seney, F.D.Jr. (1990) Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J. Clin. Invest.* **86**: 1352–1357.
- Semplicini, A., Ceolotto, G., Sartori, M., Maresca, A., Baritono, E., De Toni, R., Paparella, I., Calo, L. (2002) Regulation of glomerular filtration in essential hypertension: role of abnormal Na⁺ transport and atrial natriuretic peptide, *J. Nephrol.* **15**: 489–496.
- Sernia, C. (2001) A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. *J Pancreas* **2**: 50-55.
- Shaltout, H.A., Westwood, B.M., Averill, D.B., Ferrario, C.M., Figueroa, J.P., Diz, D.I., Rose, J.C., Chappell, M.C. (2007) Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine, and serum of sheep: evidence for ACE2 – dependent processing of angiotensin II. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292**: F82-F91.
- Shao, Q., Ren, B., Zarain-Herzberg, A., Ganguly, P.K., Dhalla, N.S. (1999) Captopril treatment improves the sarcoplasmic reticular Ca²⁺ transport in heart failure due to myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**: 1663-1672.
- Sharma, M., Sharma, R., Greene, A.S., McCarthy, E.T., Savin, V.J. (1998) Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. *Am. J. Physiol-Renal Physiol.* **274**: F623–F627.
- Shull, G.E., Greeb, J. (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases. *J. Biol. Chem.* **263**: 8646-8657.
- Sibony, M., Gasc, J.M., Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. (1993) Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* **21**: 827–835.
- Siragy, H.M., Carey, R.M. (1996) The subtype-2 (AT₂) angiotensin II receptor regulates renal guanosine cyclic 3',5' monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J. Clin. Invest.* **97**: 1978-1982.
- Siragy, H.M., Carey, R.M. (1997) The subtype-2 (AT₂) angiotensin II receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J. Clin. Invest.* **100**: 264-269.
- Siragy, H.M., Carey, R.M. (1999) Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in renal vascular hypertension in conscious rats. *Hypertension* **33**: 1237-1242.
- Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Kahn, Jr., Shumway, N.P., Woods, K.R. (1956) The amino acid sequence of hypertensin II. *J. Exp. Med.* **104**: 193–197.
- Sorenson, M.M., Coelho, H.S., Reuben, J.P. (1986) Caffeine inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers. *J. Membr. Biol.* **90**: 219-230.
- Soubrier, F., Wei, L., Hubert, C., Clauser, E., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. (1993) Molecular biology of the angiotensin I-converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J Hypertens* **11**: 599-604.
- Speth, R.C., Daubert, D.L., Grove, K.L. (1999) Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul. Pept.* **79**: 25-40.

- Stauffer, T.P., Guerini, D., Carafoli, E. (1995) Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.* **270**: 12184-12190.
- Strehler, E.E., Caride, A.J., Filoteo, A.G., Xiong, Y., Penniston, J.T., Enyedi, A. (2007) Plasma membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. NY Acad. Sci.* **1099**: 226-236.
- Strehler, E.E., Zacharias, D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* **81**: 21-50.
- Suki, W.N. (1979) Calcium transport in the nephron. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* **237**: F1-F6.
- Suzuki, J., Iwai, M., Nakagami, H., Wu, L., Chen, R., Sugaya, T., Harnada, M., Hiwada, K., Horiuchi, M. (2002) Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT_1 and AT_2 receptors in neointimal formation. *Circulation.* **106**: 847-853.
- Syntichaki, P., Tavernarakis, N. (2003) The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 672-684.
- Tada, M., Kirchberger, M. A., Katz, A. M. (1975) Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **250**: 2640-2647.
- Tallant, E.A., Ferrario, C.M., Gallagher, P.E. (2005) Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the MAS receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**: H1560-1566.
- Tang, S.S., Rogg, H., Schumacher, R., Dzau, V.J. (1992) Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors. *Endocrinology* **131**: 374-380.
- Tausky, H.H., Shorr, E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* **202**: 675-682.
- Terada, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H., Marumo, F. (1993) PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int.* **43**: 1251-1259.
- Thekkumkara, T., Linas, S.L. (2002) Role of internalization in AT_{1A} receptor function in proximal tubule epithelium. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **282**: F623-F629.
- Thomas, W.G., Mendelsohn, F.A. (2003) Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **35**: 774-779.
- Tigerstedt, R., Bergmann, P. (1898) Niere und Kreislauf. *Scand. Arch. Physiol.* **8**: 223-271.
- Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A., Simith, R.D. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**: 205-251.
- Tortelote, G.G., Valverde, R.H., Lemos, T., Guilherme, A., Einicker-Lamas, M., Vieyra, A. (2004) The plasma membrane Ca^{2+} pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae. *FEBS Lett.* **576**: 31-35.
- Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Tada, M., Mac Lennan, D.H. (1994) Aminoacids Lys - Asp - Asp - Lys - Pro - Val 402 in the Ca^{2+} - ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum are critical for functional association with phospholamban. *J. Biol. Chem.* **269**: 22929 - 22932.

- Turner, A.J., Tipnis, S.R., Guy, J.L., Rice, G., Hooper, N.M. (2002) ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallo-carboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**: 346-353.
- Ulianich, L., Elia, M.G., Treglia, A.S., Muscella, A., Di Jeso, B., Storelli, C., Marsigliante, S. (2006) The sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2b regulates the Ca^{2+} transients elicited by P2Y2 activation in PC Cl3 thyroid cells. *J. Endocrinol.* **190**: 641-649.
- Usachev, Y.M., Marsh, A.J., Johanns, T.M., Lemke, M.M., Thayer, S.A. (2006) Activation of Protein Kinase C in Sensory Neurons Accelerates Ca^{2+} Uptake into the Endoplasmic Reticulum. *J. Neurosci.* **26**: 311–318.
- Valverde, R.H., Tortelote, G.G., Lemos, T., Mintz, E., Vieyra, A. (2005) Ca^{2+} /calmodulin-independent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca^{2+} -ATPase by calmodulin and protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **280**: 30611- 30618.
- Vieyra, A. (1996) Catalytic and structural modifications of sarcoplasmic reticulum and plasma membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) ATPases induced by organic solutes that accumulate in living systems. *Biosci. Rep.* **16**: 115-127.
- Vieyra, A., Nachbin, L., de Dios-Abad, E., Goldfeld, M., Meyer-Fernandes, J.R., de Moraes L. (1986) Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J. Biol. Chem.* **261**: 4247- 4255.
- Vila-Porcile, E., Corvol, P. (1998) Angiotensinogen, prorenin, and renin are co-localized in the secretory granules of all glandular cells of the rat anterior pituitary: an immunoultrastructural study. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 301-311.
- Violin, J.D., Dewire, S.M., Barnes, W.G., Lefkowitz, R.J. (2006) GRK and beta -arrestin mediated desensitization of the angiotensin II type 1A receptor elucidated by diacylglycerol dynamics. *J Biol Chem.* **281**: 36411-36419.
- Waldeck, K., Lindberg, B.F., Persson, K., Andersson, K.E. (1997) Characterization of angiotensin II formation in human isolated bladder by selective inhibitors of ACE and human chymase: a functional and biochemical study. *Br. J. Pharmacol.* **121**: 1081– 1086.
- Wang, J.M., Slembrouck, D., Tan, J., Arckens, L., Leenen, F.H., Courtoy, P.J., De Potter, W.P. (2002) Presence of cellular renin-angiotensin system in chromaffin cells of bovine adrenal medulla. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**: H1811-1818.
- Wang, T., Glebisch, G. (1996) Effect of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte Physiol.* **271**: F143–F149.
- Wang, Z.Q., Millatt, L.J., Heiderstadt, N.T., Siragy, H.M., Johns, R.A., Carey, R.M. (1999) Differential regulation of renal angiotensin subtype AT_{1A} and AT_2 receptor protein in rats with angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* **33**: 96–101.
- Welches, W.R., Brosnihan, K.B., Ferrario, C.M. (1993) A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci.* **52**: 1461-1480.

- Welches, W.R., Santos, R.A., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., Greene, L.J., Ferrario, C.M. (1991) Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J. Hypertens.* **9**: 631-638.
- Willmann, J.K., Bleich, M., Rizzo, M., Schmidt-Hieber, M., Ullrich, K.J., Greger, R. (1997) Amiloride-inhibitable Na⁺ conductance in rat proximal tubule. *Pfluegers Arch.* **434**: 173-178.
- Wright, J.W., Krebs, L.T., Stobb, J.W., Harding, J.W. (1995) The angiotensin IV system: Functional implications. *Front Neuroendocrinol.* **16**: 23–52.
- Wu, k.d., Lee, W.S., Wey, J., Bundgarg, D., Lytton, J. (1995) Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca²⁺ - ATPase isoform transcripts. *Am. J. Physiol.* **269**: C775 - C784.
- Yamamoto, K., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., Ferrario, C.M. (1992) In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **19**: 692-696.
- Yanagawa, N., Capparelli, A.W., Jo, O.D., Friedal, A., Barrett, J.D., Eggena, P. (1991) Production of angiotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture. *Kidney Int.* **39**: 938–941.
- Yang, H.Y., Erdös, E.G., Levin, Y. (1970) A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta.* **214**: 374-376.
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., Wigler, M. (1986). Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* **45**: 711–719.
- Yucha, C., Guthrie, D. (2003) Renal homeostasis of calcium. *Nephrology Nursing Journal.* Vol. 30, No. 6.
- Zhang, J., Pratt, R.E. (1996) The AT₂ receptor selectively associates with G_{iα2} and G_{iα3} in the rat fetus. *J Biol Chem* **271**: 15026–15033.
- Zhuo, J.L., Imig, J.D., Hammond, T.G., Orengo, S., Benes, E., Navar, L.G. (2002) Increased Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: Role of AT₁ receptor. *Hypertension* **39**: 116–121.
- Zhuo, J.L., Li, X.C., Garvin, J.L., Navar, L.G., Carretero, O.A. (2006) Intracellular ANG II induces cytosolic Ca²⁺ mobilization by stimulating intracellular AT₁ receptors in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**: F1382–F1390.
- Zhou, X., Frohlich, E.D. (2007) Analogy of cardiac and renal complications in essential hypertension and aged SHR or L-NAME/SHR, *Med. Chem.* **3**: 61–65.
- Zylińska, L., Soszyński, M. (2000) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim. Pol.* **47**: 529-39.

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](#)