

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

Marcelo Santos Sampaio

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
DA $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase E DA Na^+ -ATPase
EM CLONES DE CÉLULAS MDCK: MODELO DE
CÉLULAS PRINCIPAIS E INTERCALARES DE
DUCTO COLETOR**

Rio de Janeiro-Julho 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Marcelo Santos Sampaio

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
DA (Na⁺+K⁺)-ATPase E DA Na⁺- ATPase
EM CLONES DE CÉLULAS MDCK: MODELO
DE CÉLULAS PRINCIPAIS E INTERCALARES
DE DUCTO COLETOR**

Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro,
visando a obtenção do título de Doutor em Ciências.



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



Marcelo Santos Sampaio

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
DA $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase E DA Na^+ -ATPase
EM CLONES DE CÉLULAS MDCK: MODELO DE CÉLULAS
PRINCIPAIS E INTERCALARES DE DUCTO COLETOR

Volume único

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

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Gil Lopes
Co-Orientador: Prof.^a Márcia Alves Marques Capella

Rio de Janeiro
Julho 2010

Ficha Catalográfica

Sampaio, Marcelo Santos.

Avaliação das atividades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase e da Na^+ -ATPase em clones de células MDCK: modelo de células principais e intercalares de ducto coletor / Marcelo Santos Sampaio. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

xviii, 113 f. : il. ; 31 cm

Orientadores: Aníbal Gil Lopes e Márcia Alves Marques Capella
Tese (doutorado) – UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2010.

Referências bibliográficas: f. 91-104.

1. Adenosina trifosfatases - fisiologia. 2. ATPase trocadora de sódio-potássio - fisiologia. 3. Furosemida. 4. Ouabaína. 5. Linhagem celular. 6. Células clonais. 7. Tubos renais coletores. 8. Técnicas de cultura de células. 9. Imunoistoquímica. 10. Imunofluorescência. 11. Animais. 12. Cães. 13. Fisiologia - Tese. I. Lopes, Aníbal Gil. II. Capella, Márcia Alves Marques. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia). IV. Título.

MARCELO SANTOS SAMPAIO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DA (Na⁺+K⁺)-ATPase E DA Na⁺- ATPase EM CLONES DE CÉLULAS MDCK: MODELO DE CÉLULAS PRINCIPAIS E INTERCALARES DE DUCTO COLETOR

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

Aprovada em: Rio de Janeiro, 15 de julho de 2010

Aprovada por:

Prof. Dr. Aníbal Gil Lopes

Doutorado em Fisiologia de Órgãos e Sistemas pela Universidade de São Paulo, Brasil
Professor Titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Alves Marques Capella

Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Professor Associado Nivel I da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Maria Corrêa da Costa

Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Professor Associado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Prof^ª. Dr^ª. Doris Rosenthal

Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Professor-Pesquisador do Laboratório de Fisiologia Endócrina, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Gerhard Malnic

Doutorado em Ciências (Fisiologia Humana) pela Universidade de São Paulo, Brasil
Professor Titular da Universidade de São Paulo, Brasil

Prof^ª. Dr^ª. Helena Maria Scofano

Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade de São Paulo, Brasil
Professor Emérito da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

AGRADECIMENTOS

Agradeço intensamente a orientação e amizade da Prof^a. Márcia Capella e do Prof. Aníbal Gil Lopes. Fui amavelmente acolhido por ambos em seus laboratórios e recebi incentivo e a ajuda necessária a conclusão desta tese.

Agradeço a minha família pelo apoio nos momentos difíceis e pelo incentivo a persistir com meus sonhos.

Agradeço ao amigo Carlos Perez Gomes, por ter me apresentado ao Prof. Aníbal e me incentivado a participar das atividades do laboratório.

Agradeço a Profa. Elaine Quintana pelo apoio no dia a dia de trabalho e incentivo a perseguir meus resultados. Agradeço ao Prof. Celso Caruso a amizade e conselhos.

Agradeço a Eugênio Pacelle pela amizade e colaboração a este trabalho. Agradeço a Diogo Vives pelas dicas de bancada e a colaboração a este trabalho. Agradeço a Shancerlei Leite do Espírito Santo pela amizade e fundamental ajuda durante período que me ausentei do laboratório. Agradeço a João Delou e a Leonardo Fonseca pelos ensinamentos de bancada, em cultura de célula e pela paciência em compartilharem seu espaço de trabalho comigo.

Agradeço as demais pessoas do departamento de Biofísica que tive contacto durante esse período de aprendizado, principalmente aquelas que permitiram que usasse as facilidades de seus laboratórios ou cederam amostras para realização de testes experimentais.

RESUMO

SAMPAIO, Marcelo Santos. Avaliação das atividades da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase em clones de células MDCK: modelo de células principais e intercalares de ducto coletor. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Introdução e objetivos: A Na⁺-ATPase foi recentemente descrita em células MDCK I. Neste trabalho estudamos sua atividade e funcionalidade em clones de células MDCK que se assemelham às células principais (C7) e intercalares (C11) do ducto coletor. **Métodos:** As atividades da Na⁺ e da (Na⁺+K⁺)-ATPase foram medidas em células C7 e C11 em situação basal e após variação do pH do meio de cultura. Em C7, tal medida ocorreu também após adição de NaCl ou manitol ao meio. As atividades das ATPases foram determinadas pela hidrólise de ATP(P³²) na presença e ausência de inibidores específicos. A caracterização dos tipos celulares se deu por técnicas de marcação de anidrase carbônica (AC), subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da (Na⁺+K⁺)-ATPase ($\alpha 1$ e $\beta 1$) e aglutinina de amendoim (PNA). A expressão protéica da (Na⁺+K⁺)-ATPase foi feita por *Immunoblot* para $\alpha 1$ e $\beta 1$. **Resultados:** Em células C7 em cultura por 24h, encontramos atividade (em nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) de 18,0±2,4 e 20,0±2,9 para Na⁺-ATPase e de 25,0±4,0 e 21,4±2,7 para (Na⁺+K⁺)-ATPase, semeadas em alta e baixa densidade respectivamente. Em C11, em baixa densidade de semeadura e após 24h em cultura, as atividades (em nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) foram de 18,9±4,8 e 6,4±1,7 (p=0,03) e em 72h, 30,0±6,1 e 7,1±2,9 (p=0,02) para Na⁺ e (Na⁺+K⁺)-ATPase, respectivamente. Em alta densidade de semeadura e após 24h de cultura, a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase (em nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) medida em C11 (16,5±3,4) foi semelhante à da C7 (21,4±2,6; p=0,18) e superior à encontrada em C11 quando semeada em baixa densidade. Verificamos que durante multiplicação celular algumas células C11 em cultura apresentavam alterações morfológicas e perdiam a atividade de AC e a marcação para PNA, sugerindo diferenciação fenotípica e justificando a maior atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase observada em culturas de maior densidade celular de C11. Em cultura de C11 verificamos que a maioria das células não eram marcadas para $\alpha 1$ e que a marcação com PNA era mais freqüente nas células marcadas para $\alpha 1$. A alcalinização levou a um aumento da atividade (em nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) da Na⁺-ATPase de 22±2,5 (pH 7,4) para 54,2±9,5 (pH 7,8; p<0.01) em células C11. Em C7 não houve alteração de atividade ATPásica ao estímulo ácido-base. A adição de NaCl ou manitol ao meio de células C7 não modificou a atividade da Na⁺-ATPase enquanto que aumentou a da (Na⁺+K⁺)-ATPase. **Conclusões:** A atividade da Na⁺-ATPase em MDCK C11 foi superior à da (Na⁺+K⁺)-ATPase e, em MDCK C7, as duas enzimas apresentaram atividades semelhantes. A baixa atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase e a ausência de expressão da subunidade $\alpha 1$ em MDCK C11, que não marcavam para PNA, sugere ausência da (Na⁺+K⁺)-ATPase nas células intercalares do tipo a. O aumento na atividade da Na⁺-ATPase nas células C11 submetidas a alcalinização do meio demonstra sua participação na homeostase celular. A atividade da Na⁺-ATPase não foi modulada em células C7.

ABSTRACT

SAMPAIO, Marcelo Santos. Evaluation of the activities of (Na⁺+K⁺)-ATPase and Na⁺-ATPase in MDCK cell clones: a model for principal and intercalated cells of collecting duct. Thesis (Ph.D. in Biological Sciences - Physiology) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Introduction and Objectives: Na⁺-ATPase was recently reported in MDCK I cells. Here we study its activity and function in clones of MDCK cells which resemble principal (C7) and intercalated (C11) cells of the collecting duct. **Methods:** C7 and C11 cells had Na⁺ and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activities measured in basal condition and after changes in pH of the medium. In C7, measurement was also done after the addition of NaCl or mannitol to the cell medium. The ATPases activities were determined by ATP(P³²) hydrolysis in the presence and absence of specific inhibitors and described in nmol.Pi⁻¹.min⁻¹. Cell type was characterized by labeling techniques for carbonic anhydrase (CA), α1 and β1 subunits of (Na⁺+K⁺)-ATPase (α1 and β1) and peanut agglutinin (PNA). The protein expression of (Na⁺+K⁺)-ATPase was performed by *Immunoblot* for α1 and β1. **Results:** In C7 cells, in a 24 hour culture, we found activity (in nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) of 18.0 ± 2.4 and 20.0 ± 2.9 for Na⁺-ATPase and 25.0 ± 4.0 and 21.4 ± 2.7 for (Na⁺+K⁺)-ATPase, in cells seeded in high and low density respectively. In C11 cells, in a low seeding density and after 24h in culture, the activities (in nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) were 18.9 ± 4.8 and 6.4 ± 1.7 (p = 0.03) and at 72h, 30.0 ± 6.1 and 7.1 ± 2.9 (p = 0.02) for Na⁺ and (Na⁺+K⁺)-ATPase, respectively. In a high seeding density and after 24h of culture, the activity of (Na⁺+K⁺)-ATPase (in nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) measured in C11 cells (16.5 ± 3.4) was similar to that of C7 (21.4 ± 2.6, p = 0.18) and higher than that found in C11 cells when seeded at low density. We found that during cell multiplication some C11 cells showed morphological changes and lost the CA activity and the label to PNA, suggesting a phenotype differentiation and maybe justifying the higher (Na⁺+K⁺)-ATPase activity observed in a higher density C11 cell culture. We also found that in C11 culture most of the cells did not label for α1 and that PNA labeling was more frequent in cells that also labeled for α1. Alkalinization led to an increase in Na⁺-ATPase activity (in nmol.Pi⁻¹.min⁻¹) from 22 ± 2.5 (pH 7.4) to 54.2 ± 9.5 (pH 7.8, p <0.01) in C11 cell. Acid-base stimulation did not change enzymes activities in C7. The addition of NaCl or mannitol to the C7 cell medium did not modify the activity of Na⁺-ATPase while increased that of (Na⁺+K⁺)-ATPase. **Conclusions:** Na⁺-ATPase activity was higher than that of (Na⁺+K⁺)-ATPase in MDCK C11 cells, and in MDCK C7, the two enzymes had similar activities. The low (Na⁺+K⁺)-ATPase activity in MDCK C11 cells and the absence of expression of α1 subunit in MDCK C11 cells that did not label for PNA suggest that (Na⁺+K⁺)-ATPase is absent in intercalated type a cells. In C11 cells, the increase in Na⁺-ATPase activity with cell medium alkalinization demonstrates Na⁺-ATPase involvement in cell homeostasis. The Na⁺-ATPase activity in C7 cells was not modulated.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação esquemática do néfron. Estrutura vascular e tubular e suas funções.2
- Figura 2 - Percentagem de reabsorção de Na⁺ nos diferentes segmentos do néfron.5
- Figura 3 - Segmentos do néfron e disposição dos segmentos nas zonas corticais e medulares do rim. Números representam os diversos segmentos do néfron. O ducto coletor medular interno divide-se ainda em três porções: IMCD1, IMCD2, IMCD3 (não representados na figura), localizadas, respectivamente, na região mais externa, na região intermediária e na região interna da medula renal.7
- Figura 4 - Diagrama mostrando as vias vasculares e tubulares da recirculação de uréia na medula renal. As alças longa e curta de Henle são mostradas nas quatro zonas renais juntamente com o ramo arterial descendente e o ramo venoso ascendente da vasa recta (DVR e AVR, respectivamente). Córtex = C; Porção externa da medula externa = OS; Porção interna da medula externa = IS; Medula interna = IM; canal transportador de uréia = UT; vasa recta descendente = DVR; vasa recta ascendente = AVR.10
- Figura 5 - Esquema da célula principal do ducto coletor. Estão representados os transportadores presentes nas membranas luminal e basolateral. Destaque deve ser dado à (Na⁺+K⁺)-ATPase, transportador ativo primário responsável pelo gradiente de sódio necessário para o tráfico transcelular desse íon. Abreviações: AQP-2, aquaporina 2; AQP-3/4, aquaporina 3 e 4; ROMK, canal de potássio de medula externa; EnaC, canal de sódio eletrogênico; Na,K-ATPase, ATPase trocadora de sódio-potássio, NHE-1, trocador de sódio e hidrogênio do tipo 1. ...12
- Figura 6 - Mecanismos de controle hormonal da reabsorção de sódio pela célula principal e vias de sinalização intracelular. Abreviações: AC, adenilato ciclase; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; ATP, adenosina trifosfato; AVP, vassopresina; DAG, diacilglicerol; ET, endotelina; G, proteína G de membrana (i = inibitória e s = estimuladora); IP-3, inositol trifosfato; MR, receptor de mineralocorticóide; PK, proteína cinase; PLC, fosfolipase C; V2, receptor de vassopresina tipo 2.17
- Figura 7 - Subtipos de células intercalares presentes em ducto coletor de ratos. Abreviações: L, luminal; BL, basolateral, ATP, adenosina trifosfato; AE, trocador de ânion; NBC3, co-transportador de sódio e bicarbonato do tipo 3 e Pds, Pendrina.18
- Figura 8 - Mecanismo de regulação de secreção e absorção de K⁺ em células do ducto coletor. Abreviações: BK, canal de potássio “Maxi-channels”; IC, células

intercalares do ducto coletor; PC, células principais do ducto coletor e ROMK, canal de potássio da medula renal externa.20

Figura 9 - Atividade da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ em segmentos tubulares renais localizados na medula do rim de rato (excluindo TCP e TCD). Quanto maior a espessura representada, maior a atividade. Em parênteses, atividade expressa em pmol/min/mm. Abreviações: PST, túbulo reto proximal, LDL, alça longa de Henle (OM = medula externa e IM = medula interna); ATL, ramo ascendente fino, TAL, ramo ascendente espesso (C = cortical e M = medular); SDL, alça curta de Henle; CCD, ducto coletor cortical; OMCD, ducto coletor medular externo; IMCD, ducto coletor medular interno (0 = externo e i = interno).22

Figura 10 - Ciclo de funcionamento da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{ATPase}$. Observa-se o transporte iônico dependente do acoplamento de ATP. A fosforização e defosforilação da proteína levam a mudança conformacional da mesma, permitindo o transporte iônico transmembranal. Abreviações: ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; E, intermediário enzimático.25

Figura 11 - Desenho esquemático da célula do túbulo proximal indicando a localização da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$. A $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ é inibida por glicosídeos digitálicos (como a ouabaína) e a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ por diuréticos de alça (como a furosemida). Os demais transportadores presentes na célula do túbulo proximal também estão representados. Abreviaturas: Gli, glicose e AA, aminoácido.27

Figura 12 - Fotomicrografia de células MDCK encontrada na ATCC - *American Type Cell Collection*.36

Figura 13 - Transportadores presentes na membrana celular dependente do pH intracelular.39

Figura 14 - Mecanismos de regulação do volume celular. RDV (*regulatory volume decrease* – redução regulatória de volume), RVI (*regulatory volume increase* – aumento regulatório de volume). No painel à esquerda observa-se a célula crenada (A) retornando ao volume normal (B). No painel à direita são representados os transportadores de membrana envolvidos na regulação do volume celular. Abreviações: AE, trocador de ânions; HICC, canais de cátion induzido por hipertonicidade; NKCC, cotransportador tríplice de sódio, potássio e cloro.41

Figura 15 - Células MDCK-C11 e MDCK-C7 semeadas com baixa densidade (1×10^5 células/ml) em placa de cultura com poços de 1 ml, sobre lamínulas de vidro. Após 24 horas de incubação as células foram visualizadas em microscopia óptica.55

Figura 16 - Células MDCK-C11 em cultura após 24 horas. As células MDCK-C11 foram semeadas com densidade inicial de 1×10^5 células/ml em placa de cultura com poços de 1 ml, sobre lamínulas de vidro, cultivadas por 24 horas em lamínulas de vidro. Percebe-se brotamento de células com morfologia distinta à das células da colônia inicial (n=3).56

Figura 17 - Clones MDCK-C7 (A-B) e MDCK-C11 (C-D) visualizados pela técnica de coloração de Hansson para identificação da anidrase carbônica. À direita fotos com maior aumento. Células em A e B com coloração uniforme. Células em C com citoplasma escurecido em sua grande maioria. Em D (maior aumento) percebe-se grupo de células no bordo inferior esquerdo e ao centro com citoplasma escurecido circundado de células com citoplasma pouco corado (seta). n=3. Células foram cultivadas em 1×10^5 células/poço (placa de 24 poços) e mantidas por 48 horas.57

Figura 18 - Células MDCK-C7 (A) e MDCK-C11 (B-D) marcadas com PNA, identificadas por imunofluorescência. Não há marcação da MDCK-C7. MDCK-C11 é intensamente marcada com PNA (B), no entanto algumas células são fracamente marcadas ou há somente marcação do citoplasma de maneira difusa, sem marcar a membrana (C-D, setas). n=3. Células semeadas com 5×10^4 células/poço em placa de 24 poços, incubadas por 24 horas.59

Figura 19 - Comparação da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ nas células MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram semeadas com densidade de 1×10^5 células/ml em placas de seis poços com 2 ml, incubadas por 24 ou 72 horas. As atividades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. * diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, n=6.60

Figura 20 - Atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nos clones das células MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram semeadas com baixa densidade (1×10^5 células/ml) em placas de seis poços com 2 ml, incubadas por 24 ou 72 horas. A atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi determinada como descrito em Materiais e Métodos. * diferença estatisticamente significativa em relação aos dados obtidos nas células do clone MDCK-C7, n=6.61

Figura 21 - Atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em clones MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram semeadas com alta densidade (1×10^6 células) em placa de seis poços de 2 ml e cultivadas por 24 horas. A atividade das ATPases foram medidas como descrito em Materiais e Métodos. a = diferença estatisticamente significativa em relação aos dados obtidos nas células do clone MDCK-C7, n=8.62

Figura 22 - Expressão de subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em homogenato de células MDCK-C11 e MDCK-C7 determinada através de *immunoblot*. As bandas dos homogenatos obtidos de células inteiras foram marcadas com anticorpos específicos para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, como descrito em Material e Métodos. A figura é representativa dos *immunoblot* de três experimentos distintos. O gráfico representa a média da densidade ótica das bandas dos três experimentos. Utilizamos uma proteína como controle da outra. As células foram semeadas em baixa densidade para obtenção do homogeneizado.63

Figura 23 - Expressão da subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em clones de células MDCK (C7 e C11) visualizada por imunofluorescência. As células foram

cultivadas em lamínulas de vidro e posteriormente incubadas com anticorpo específico para subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$, como descrito em Materiais e Métodos. Os painéis superiores (A-C) correspondem às células MDCK-C7 e os painéis inferiores (D-F) às células MDCK-C11. Os painéis à esquerda (A e D) se referem às células marcadas com anticorpo contra a subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. Os painéis centrais (B e E) mostram as mesmas células marcadas com Hoechst 33258, corante fluorescente para o núcleo. Os painéis à direita (C e F) apresentam as imagens combinadas. As figuras são representativas de três experimentos. Culturas semeadas com 5×10^4 células por poço (placa de 24 poços) incubadas por 24 horas. Ampliação de 400 vezes.65

Figura 24 - Expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ em células MDCK-C11, visualizadas por imunofluorescência. As células cresceram em lâminas de vidro e foram incubadas sequencialmente com anticorpos para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$, como descrito em Materiais e Métodos. As fotomicrografias à esquerda (A,C,E,G,I) mostram as células marcadas com anticorpo para a subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. As fotomicrografias à direita (B,D,F,H,J) mostram a mesma célula marcada com anticorpo para a subunidade $\beta 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. As figuras são representativas de três experimentos. Cultura semeada com 5×10^4 células por poço (placa de 24 poços) por 24 h. Ampliação de 400 vezes.66

Figura 25 - Co-expressão da subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e aglutinina de amendoim (PNA) em células MDCK-C11, visualizadas por imunofluorescência. As células cresceram em lamínulas de vidro e foram incubadas com anticorpo para subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e PNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os painéis à esquerda (A-D) mostram as células marcadas com o anticorpo para a subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. Os painéis centrais (E-H) apresentam as mesmas células marcadas com PNA. Nos painéis à direita (I-J) são apresentadas as imagens combinadas. As figuras são representativas de três experimentos independentes. Cultura semeada com 5×10^4 células por poço (placa de 24 poços) por 24 h. Ampliação de 400 vezes.67

Figura 26 - Efeito da variação do pH sobre a atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em células MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram cultivadas por 24 horas e então expostas durante 6 horas a meios com diferentes pHs (7,4; 6,7 e 7,8), após o que as atividades da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Culturas semeadas com 2×10^5 células por poço (placa de 6 poços). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA e correção pós-teste com Bonferroni, $p < 0,05$). O total de experimento com células MDCK-C7 foi de 9 para a determinação da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e 10 para a $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. Foram realizados 6 experimentos com células MDCK-C11 para a determinação da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$69

Figura 27 - Efeito da adição de NaCl ao meio de cultura sobre a atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em células do clone MDCK-C7. Culturas semeadas com 1×10^6 células por poço (placas de seis poços), incubadas por 24 horas. Após a adição de 100 ou 200 mM de NaCl ao meio de cultura e incubação

por 1 hora (A-B) ou por 24 horas (C-D) as atividades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. (teste t ou ANOVA com múltipla comparação por Dunnett, $p < 0,05$) $n=7$ e $n=5$ para $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em 1 e 24 horas, respectivamente. $n=9$ e $n=10$ para a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em 1 e 24 horas, respectivamente.71

Figura 28 - Efeito da adição de manitol ao meio de cultura sobre a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ nas células MDCK-C7. Culturas semeadas com 1×10^6 células por poço (placas de seis poços) incubadas previamente por 24 horas, após o que foi adicionado ao meio de cultura 200 ou 400 mM de manitol e novamente incubadas por 1 hora (A-B) ou de 24 horas (C-D). As atividades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foram medidas como descrito em Materiais e Métodos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (teste t ou ANOVA e com múltipla comparação por Dunnett, $p < 0,05$). $n=6$ e $n=5$ para $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em 1 e 24 horas respectivamente. $n=8$ e $n=10$ para $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em 1 e 24 horas, respectivamente.73

Figura 29 - Representação esquemática das células intercalares α e β com a indicação da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$. A ausência ou pequena expressão da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas células do tipo α é indicada pelo uso de linhas pontilhadas. Abreviações: L, luminal; BL, basolateral, ATP, adenosina trifosfato; AE, trocador de ânion; NBC3, co-transportador de sódio e bicarbonato do tipo 3 e Pds, Pendrina.79

Figura 30 - Representação esquemática das células intercalares α (A) e β (B) frente a estímulo alcalino (situação experimental). Interação da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ com o transportador NBC3. Abreviações: L, luminal; BL, basolateral, ATP, adenosina trifosfato; AE, trocador de anion; NBC3, co-transportador de sódio e bicarbonato do tipo 3 e Pds, Pendrina. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características que diferenciam a Na^+ -ATPase da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$. 28	28
Tabela 2 - Modulação da atividade da Na^+ -ATPase em células do túbulo proximal de rim de porco.29	29
Tabela 3 - Diferenças entre células MDCK C7 e MDCK C11.35	35
Tabela 4 - Atividade ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) da Na^+ -ATPase e da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ em culturas de células MDCK C11 e C7 semeadas com densidade inicial de 2×10^5 células por poço, incubadas por 24 ou 72 horas.105	105
Tabela 5 - Comparação das atividades ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ em cultura de células MDCK-C11 e MDCK-C7 semeadas com densidade inicial de 2×10^5 células por poço, incubadas por 24 ou 72 horas.105	105
Tabela 6 - Atividade ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) de Na^+ -ATPase e $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ em cultura de células MDCK C11 e C7 semeadas com densidade inicial de 1×10^6 células por poço, incubadas por 24 horas.105	105
Tabela 7 - Atividade ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) da Na^+ -ATPase em cultura de células MDCK C11 e C7 semeadas com densidade inicial de 2×10^5 células por poço, incubadas por 6 horas em pH alcalino.105	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Anidrase carbônica
ADH	Hormônio Antidiurético/Vasopressina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AQP	Aquaporina
ASDN	Célula do néfron distal sensível a aldosterona
ATL	Porção fina ascendente da alça de Henle
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
C11	Clone 11
C7	Clone 7
CCD	Ducto coletor cortical
CD	Ducto coletor
CNT	Túbulo de conexão
DCT	Túbulo convoluto distal
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxidoribonucléico
DTL	Porção fina descendente da alça de Henle
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ENac	Canal de sódio eletrogênico

IMCD	Ducto coletor medular interno
M1-CCD	Célula do ducto coletor de camundongo tipo1
MBL	Membrana basolateral
MDCK	<i>Mardin Darbin Canine Kidney</i>
MR	Receptor de mineralocorticóide
NBC3	Co-transportador de sódio e bicarbonato do tipo 3
OMCD	Ducto Coletor Medular Externo
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCT	Túbulo proximal convoluto
PKA	Proteína cinase A
PKCa	Proteína cinase Ca
PKD1	Proteína cinase D1
PNA	Aglutinina de amendoim
POPOP	1,4 bis [5-fenil-2-oxazolil]-benzeno 2,2 - p fenileno-bis[5-feniloxazol]
PST	Túbulo proximal reto
PVDF	Polivilideno difluoreto
RCCD2	Célula do ducto coletor de córtex de rato
ROMK	Canal de potássio da medula renal externa
SCH 28080	2-metil-8(fenilmetoxi(imidazol[1,2 ^a]-piridina-3-acetonitrila
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SGK	Cinase estimulada por glicocorticóide
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TAL	Porção ascendente grossa da alça de Henle
UT	Canal transportador de uréia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos básicos da estrutura renal e particularidades dos segmentos tubulares.....	1
1.2	O ducto coletor e a medula renal.....	6
1.3	Composição celular do ducto coletor e suas funções específicas	11
1.3.1	A célula principal.....	11
1.3.2	Células intercalares	18
1.4	A (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase.....	21
1.5	A Na ⁺ -ATPase.....	26
1.6	H ⁺ -ATPase e (H ⁺ +K ⁺)-ATPase.....	30
1.7	Descrição da Na ⁺ -ATPase em células MDCK.....	32
1.8	Modelo de estudo do ducto coletor: a célula MDCK.....	33
1.9	Diferenciação celular no ducto coletor.....	36
1.10	Resposta celular à variação do pH.....	37
1.11	Resposta celular à hiperosmolaridade do meio.....	39
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	Cultura de células	45
4.2	Estudo de histoquímica.....	46
4.3	Estudo de imunofluorescência.....	47
4.4	Marcação do ATP	48
4.5	Estudo da atividade ATPásica	49
4.6	Dosagem de proteína.....	50

4.7	Western blot	51
4.8	Protocolos de estímulo celular	52
4.8.1	Alteração do pH do meio	52
4.8.2	Resposta ao aumento da concentração de NaCl e alteração da osmolaridade do meio de cultura	52
5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	54
6	RESULTADOS	55
6.1	Aspecto morfológico das células dos clones MDCK-C7 e MDCK-C11	55
6.2	Heterogeneidade celular da cultura do sub-clone MDCK-C11	56
6.3	Caracterização das atividades basais da (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase e da Na ⁺ -ATPase em células dos clones MDCK C7 e C11	60
6.4	Estudos sobre a baixa atividade da (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase no sub-clone MDCK-C11	63
6.4.1	Expressão protéica de subunidades α e β nas células dos sub- clones MDCK-C7 e MDCK-C11	63
6.4.2	Determinação por imunofluorescência da presença das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase nas células principal e intercalar	64
6.4.3	Caracterização do subtipo celular do clone MDCK-C11 com expressão (Na ⁺ +K ⁺)-ATPásica	66
6.5	Modulação da atividade das ATPases de sódio em células MDCK-C7 e MDCK-C11	68
6.5.1	Modulação da atividade da (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase e da Na ⁺ -ATPase das células MDCK-C7 e MDCK-C11 pelo pH do meio de cultura	68
6.5.2	Efeito da adição de NaCl e manitol ao meio de cultura sobre a atividade da Na ⁺ -ATPase e da (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase em células do clone MDCK-C7	69
6.5.3	Efeito do aumento da osmolaridade do meio de cultura induzido pela adição de NaCl sobre a atividade da Na ⁺ -ATPase e da (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase	70
6.5.4	Efeito do aumento da osmolaridade do meio de cultura induzido pela adição de manitol sobre a atividade da (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase e da Na ⁺ -ATPase	72
7	DISCUSSÃO	74

8	CONCLUSÕES	90
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
10	APÊNDICE A - TABELAS.....	105
11	APÊNDICE B - MANUSCRITO PUBLICADO	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos básicos da estrutura renal e particularidades dos segmentos tubulares

O rim, órgão fundamental para a homeostase do meio interno dos animais superiores, exerce papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-básico e hidro-eletrolítico, na excreção de toxinas endógenas e exógenas e na produção e metabolismo de vários hormônios. A unidade morfofuncional do rim é o néfron, que é composto por uma parte vascular e outra tubular, cada qual com componentes celulares e características funcionais próprias.

A porção vascular é formada pela artériola aferente, corpúsculo glomerular e artériola eferente. O corpúsculo glomerular inclui a rede de capilares glomerulares e as células mesangiais e epiteliais (podócitos). As células endoteliais dos capilares glomerulares, juntamente com a membrana basal e podócitos, formam uma membrana que separa o espaço vascular do tubular, chamada membrana de filtração glomerular. Por mecanismo dependente das forças hidrostática, oncótica e eletrostática, ocorre a filtração do plasma, havendo passagem seletiva dos solutos através da membrana glomerular, formando no espaço de Bowman o ultrafiltrado glomerular, cuja composição iônica, muito semelhante à do plasma, é modificada ao longo dos diferentes segmentos tubulares até sua excreção sob a forma de urina, como ilustra a Figura 1.

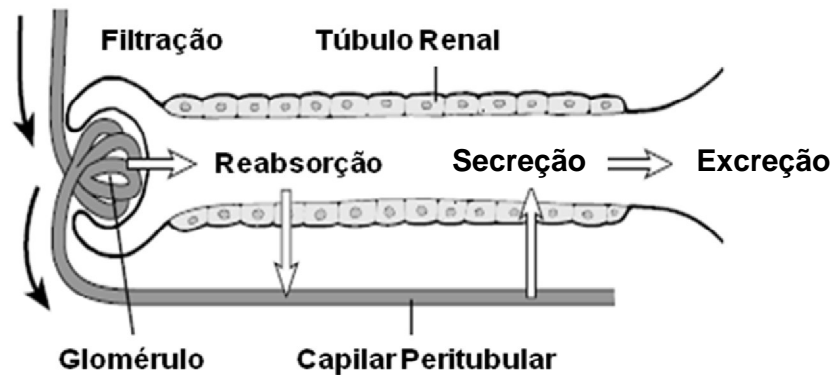


Figura 1: Representação esquemática do néfron. Estruturas vascular e tubular e suas funções. Adaptado. (TANNER, 2005).

O parênquima renal pode ser dividido em duas porções: o córtex e a medula renal. O córtex corresponde à porção mais externa do rim, justaposta à cápsula renal, sendo formado basicamente pelos tufo glomerulares e pelos segmentos proximais e distais dos túbulos.

Os segmentos tubulares são formados pelas células epiteliais renais, que estabelecem a interface entre o meio luminal (intratubular) e o meio intersticial (basolateral). As células epiteliais dos diferentes segmentos do néfron apresentam características morfológicas e funcionais distintas. De acordo com nomenclatura internacional estabelecida em 1998, a parte tubular é dividida em quatro divisões principais: túbulo proximal, túbulo intermediário, túbulo distal e sistema coletor. O túbulo proximal comporta duas porções, a porção convoluta do túbulo proximal (PCT) e a porção reta do túbulo proximal (PST). O túbulo intermediário é formado pelas porções fina descendente (DTL) e pela porção fina ascendente (ATL) da Alça de Henle. O túbulo distal é formado pelas porções ascendente espessa ou reta (DST ou TAL) e convoluta (DCT). O sistema coletor é constituído pelo túbulo de conexão (CNT) e pelo ducto coletor (CD), o qual

comporta 3 subdivisões, o ducto coletor cortical (CCD), o ducto coletor medular externo (OMCD) e o ducto coletor medular interno (IMCD) (KRIZ e BANKIR, 1988). As siglas utilizadas são as empregadas internacionalmente.

A polaridade é uma das características básicas dos epitélios transportadores de água e sal, sendo que a expressão de distintos transportadores nas membranas luminal e basolateral é um de seus aspectos fundamentais. A reabsorção e secreção de diferentes substâncias ao longo do néfron dependem da existência de transportadores específicos expressos nas membranas das células epiteliais dos diferentes segmentos tubulares. São esses transportadores que conferem as características funcionais próprias de cada segmento do néfron.

O esquema básico da reabsorção transepitelial de água e solutos ao longo do néfron envolve a presença de transporte ativo primário de sódio na membrana basolateral, capaz de gerar o gradiente necessário para a entrada desse íon através da membrana luminal. Esta entrada de sódio pode ocorrer tanto por vias passivas como por mecanismos ativos secundários, que utilizam o gradiente eletroquímico do sódio para promover o transporte ou outros íons ou moléculas contra seus respectivos gradientes eletroquímicos. São conhecidas duas ATPases transportadoras do íon sódio: a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$, sensível à ouabaína, e a $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$, insensível à ouabaína e sensível à furosemida, sobre as quais faremos uma revisão em secção posterior desta introdução.

Utilizando esse arranjo de transportadores, o túbulo proximal reabsorve 67% do sódio, 70% da água, 80% do bicarbonato e a totalidade de proteínas e glicose presentes no ultrafiltrado glomerular. Aí também se dá a secreção de ânions e cátions orgânicos. Esse segmento do néfron tem importante papel na

regulação do equilíbrio ácido-básico, já que reabsorve grande quantidade de bicarbonato de sódio. A presença de uma enzima, a anidrase carbônica (AC) e de um trocador de Na^+/H^+ (NHE-3) são fundamentais para a regeneração intracelular do bicarbonato filtrado.

Devido à grande expressão constitutiva de canais de água (aquaporinas, AQP) nas membranas luminal e basolateral das células do porção fina descendente da alça de Henle, estes segmento apresenta alta permeabilidade à água, o que permite que o fluido tubular se concentre ao longo do mesmo à medida que penetra na medula renal, área de alta osmolaridade (NIELSEN *et al.*, 2002). Assim sendo, ao longo da porção fina descendente da alça de Henle o fluido intraluminal se concentra, atingindo, na espécie humana, osmolaridade de até 1200 mOsm/L na curvatura da alça de Henle.

Em contraste, na porção ascendente espessa ou reta do túbulo distal ocorre diluição do fluido intraluminal, pois suas células são impermeáveis à água e têm junções que impedem seu transporte paracelular. A membrana basolateral dessas células expressam a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$, que gera o gradiente intracelular favorável à reabsorção de sódio através da membrana luminal pelo transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ (NKCC2). Há assim grande reabsorção de eletrólitos sem transporte de água, causa primária da formação da hipertonicidade medular. O gradiente osmótico gerado na porção ascendente espessa representa a força motriz que permite a reabsorção da água no ducto coletor sob controle hormonal (ADH), portanto ajustada às necessidades do organismo. Dessa reabsorção depende, por sua vez, a reabsorção de uréia na porção final do ducto coletor, mecanismo que amplifica a hipertonicidade medular. Por outro lado, a diluição do ultrafiltrado tubular nesse segmento do néfron é fundamental para o processo de

concentração urinária. No túbulo coletor distal em sua parte convoluta ocorre parte da reabsorção do sódio filtrado através do cotransporte de Na^+/Cl^- , mecanismo ativo secundário presente na membrana apical, sensível aos diuréticos tiazídicos. Após este segmento há um segmento de conexão, o túbulo de conexão, região transicional entre ducto coletor distal e o ducto coletor.

O ducto coletor reabsorve somente 3 a 5% do sódio presente no ultrafiltrado, no entanto é neste segmento que ocorre o ajuste fino da excreção do sódio, água, hidrogênio e bicarbonato. Esse ajuste fino é intensamente modulado pelos hormônios que controlam a atividade e a expressão de transportadores nas membranas das células do ducto coletor.

A Figura 2 mostra a participação dos diferentes segmentos do néfron na reabsorção de sódio e os principais mecanismos moleculares de transporte iônico presentes na membrana luminal que estão envolvidos nesse processo.

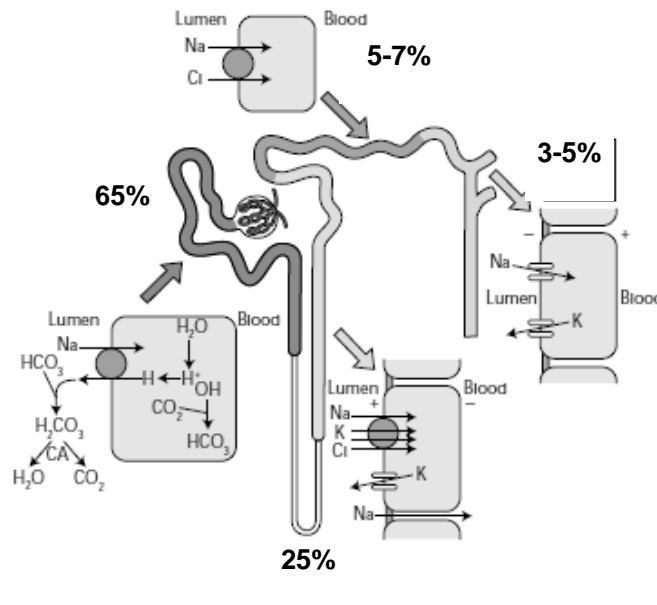


Figura 2 - Percentagem de reabsorção de Na^+ nos diferentes segmentos do néfron (ELLISON, 2004).

1.2 O ducto coletor e a medula renal

O ducto coletor é o segmento final da porção tubular. Embriologicamente se origina de tecido distinto dos demais segmentos tubulares. O ducto coletor juntamente com o sistema pielocaliciano e ureter se originam do divertículo metanéfrico ou broto uretérico, enquanto os demais segmentos tubulares e o corpúsculo glomerular advêm do mesoderma metanéfrico ou blastema metanefrogênico (MOORE, 1990; AL-AWQATI e SCHWARTZ, 2004).

Apesar da diferença embrionária, morfológica e funcionalmente as células do coletor se assemelham às demais células tubulares. Em termos fisiológicos o ducto coletor é considerado parte do sistema tubular e não do pielocalicial.

O ducto coletor tem um segmento cortical e outro medular. O cortical é composto pelo túbulo coletor cortical inicial (iCCT), seguido pelo túbulo coletor cortical (CCT). Na medula externa, encontra-se a porção inicial, denominada segmento externo do ducto medular externo (OMCD-OS) seguida do segmento interno (OMCD-IS). Seguindo em direção ao cálice renal encontra-se o ducto coletor medular interno (IMCD), composto de três segmentos, denominados seqüencialmente de IMCD1, IMCD2 e IMCD3. Diversos sistemas coletores convergem para a papila renal. A partir daí o fluido urinário atinge os cálices renais e, por fim, o seio renal e ureter. A Figura 3 representa a organização do néfron no parênquima renal.

O ducto coletor é formado por dois tipos celulares: células principais e células intercalares. Células intercalares são separadas ainda em tipo α , ou tipo A e tipo β , ou tipo B.

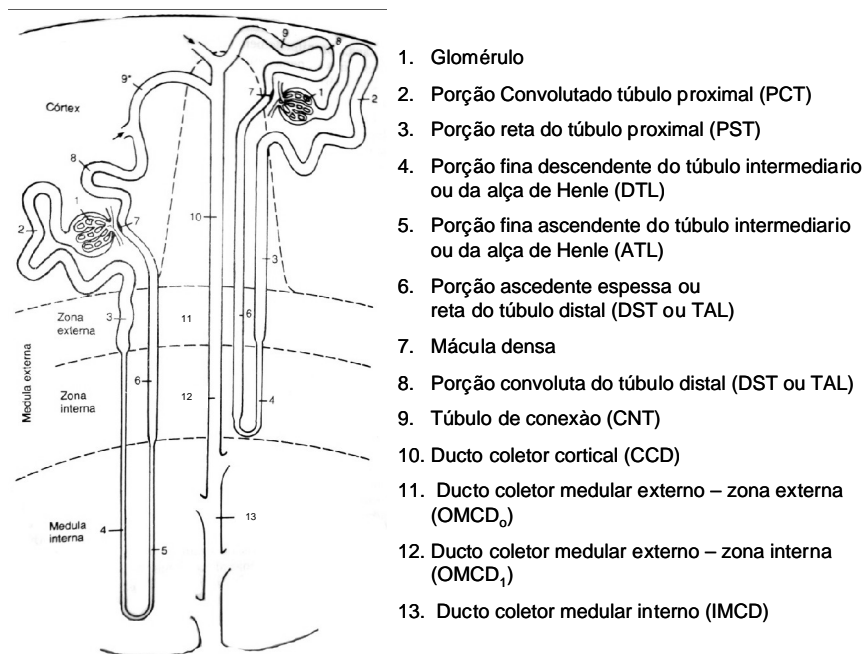


Figura 3 – Segmentos do néfron e disposição dos segmentos nas zonas corticais e medulares do rim. Números representam os diversos segmentos do néfron. O ducto coletor medular interno divide-se ainda em três porções: IMCD1, IMCD2, IMCD3 (não representados na figura), localizadas, respectivamente, na região mais externa, na região intermediária e na região interna da medula renal. Adaptado. (MELLO-AIRES, 1991)

Tais células se distribuem de maneira desigual pelo ducto coletor. Mais abundantes, as células principais se distribuem por todo o segmento perfazendo 60 a 90% do tipo celular predominante no epitélio ductal. As células intercalares por sua vez, contribuem para 10 a 30 % da formação deste epitélio e se rarefazem em direção da papila renal. No ducto coletor medular externo (OMCD) as células do tipo β são expressas em pequena quantidade. No ducto coletor medular interno (IMCD) são raras as células do tipo β (BRENNER, 2004; WAGNER *et al.*, 2004). Este padrão de distribuição das células na região do ducto coletor foi atribuído à presença da uréia em altas concentrações nas regiões mais internas da medula. Foi observado que a diferenciação celular para células intercalares (peanut

aglutinin - PNA positivas) depende de estímulo da aldosterona e que altas concentrações de uréia impedem a diferenciação celular (SCHUMACHER *et al.*, 2003).

A maior absorção de sódio acontece no segmento inicial, o túbulo coletor cortical - CCT, enquanto no ducto coletor medular externo na porção externa - OMCD, pelo predomínio de células intercalares tipo a é o principal sitio de acidificação do ducto coletor. No ducto coletor medular interno - IMCD quase ou a totalidade das células são principais (BRENNER, 2004).

O pH intraluminal do ducto coletor usualmente é mais ácido que o dos segmentos anteriores devido ao processo de secreção de H^+ , sendo amônia e fosfato os tampões aí encontrados (SILBERNAGL e DESPOPOULOS, 2003,a). Quando, por diferentes motivos, ocorre alcalose sistêmica, a urina apresenta pH básico. Os mecanismos deflagrados para realizar o equilíbrio ácido-básico do meio interno determinam a secreção adequada de ácido ou de base, o que terá como consequência a variação do pH urinário.

A alta concentração de sódio e uréia no interstício medular torna o ambiente hiperosmótico, o que é fundamental para o controle da tonicidade do meio interno do organismo. O processo que deflagra a concentração medular é a reabsorção de sal sem água, que ocorre no segmento ascendente espesso da alça de Henle. A hipertonicidade medular, por sua vez, permite que haja reabsorção de água no ducto coletor cortical e medular externo através de canal de água do tipo 2 (AQP-2) regulado pela vasopressina. Este processo leva à concentração intratubular da uréia, que não é permeável nessas regiões. A uréia assim concentrada é reabsorvida através dos canais de uréia do tipo UT- A1 e UT- A3, e talvez UT- A4 na parte terminal do ducto coletor, localizada na ponta da

papila, concentrando, dessa forma o interstício medular papilar. Tanto a AQP-2 como os canais UT- A1 e UT- A3 são regulados por vasopressina. A uréia assim reabsorvida para o interstício papilar pode ser passivamente transportada para o interior do vaso reto ascendente, que, por ser fenestrado, é altamente permeável a essa molécula. Esse vaso, com sangue enriquecido em uréia, ao atingir progressivamente porções mais altas do interstício medular, com concentrações menores de uréia, retorna ao interstício. De novo no interstício, mas em níveis mais distantes da papila, a uréia pode ser absorvida via canais UT- B em segmentos mais altos do vaso reto descendente ou ser secretada na porção fina descendente da alça de Henle através de canais de uréia do tipo UT- A2. Esse processo permite, portanto, a recirculação da uréia, reduzindo sua perda urinária e mantendo osmólitos ativos na medula renal (Figura 4). Os vasos retos ascendentes exercem papel essencial na formação de um gradiente homogêneo progressivo de uréia ao longo do eixo córtico-medular (YANG e BANKIR, 2005).

Por outro lado, a constante reciclagem da uréia na região medular faz com que este osmólito seja o principal responsável pela alta osmolaridade da região medular (BAGNASCO, 2000; FENTON e KNEPPER, 2007). A vasopressina (hormônio antidiurético – ADH) é essencial para o ajuste final da concentração urinária, pois promove tanto a inserção de AQP-2 nas células principais, permeabilizando a membrana apical destas células à água, como a inserção dos diferentes canais de uréia envolvidos no processo acima descrito (NIELSEN *et al.*, 2002; YANG e BANKIR, 2005).

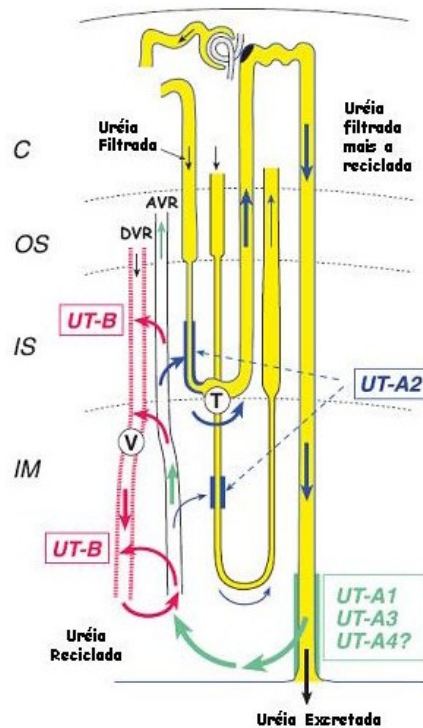


Figura 4 - Diagrama mostrando as vias vasculares e tubulares da recirculação de uréia na medula renal. As alças longa e curta de Henle são mostradas nas quatro zonas renais juntamente com o ramo arterial descendente e o ramo venoso ascendente da vasa recta (DVR e AVR, respectivamente). Córtex = C; Porção externa da medula externa = OS; Porção interna da medula externa = IS; Medula interna = IM; canal transportador de uréia = UT; vasa recta descendente = DVR; vasa recta ascendente = AVR. (YANG e BANKIR, 2005).

Estudos recentes e ainda não conclusivos indicam que a vasopressina (ADH) regula a expressão de transportadores de uréia nas células do ducto coletor medular interno - IMCD de maneira semelhante ao que acontece com a AQP-2. O ADH através da via Adenilato Ciclase/AMPC/PKA estimularia a fosforilação de UT-A1 e UT-A3 e induziria acúmulo destes na membrana das células do IMCD (FENTON, 2009).

Tendo em vista que a perfusão sanguínea da medula representa uma fração muito pequena do fluxo sanguíneo renal total, nessa região a lavagem tissular é menos intensa, preservando a osmolaridade medular. Um dos

mecanismos de regulação da osmolaridade medular se dá pelo ajuste do fluxo sanguíneo nos vasos retos. Um aumento do fluxo favorece a drenagem de osmólitos a favor de gradiente de concentração e reduz a osmolaridade do interstício (BAGNASCO, 2000; FENTON e KNEPPER, 2007). Alguns estímulos hormonais determinam aumento do fluxo sanguíneo nos vasos retos, entre eles, os hormônios natriuréticos, a bradicinina e a prostaglandina. Como consequência da perda de sódio e uréia do interstício medular, ocorre redução do gradiente osmótico favorável à reabsorção de água no ducto coletor.

1.3 Composição celular do ducto coletor e suas funções específicas

Como dito acima, há três tipos celulares no epitélio do ducto coletor: a célula principal e as intercalares do tipo α e do tipo β . Foram descritas em rins de coelhos e ratos, mas não em humanos, células intercalares com características mistas, chamadas do tipo não α não β (BRENNER, 2004; WAGNER *et al.*, 2004; WALL, 2005). Em seguida serão descritas as características de cada tipo celular.

1.3.1 A célula principal

A célula principal é funcionalmente diferenciada, caracterizando-se por reabsorver sódio e água e secretar potássio. A presença de transportadores com localização específica na membrana basolateral ou apical e a presença de junções intercelulares de baixa permeabilidade (*tight junctions*) são responsáveis pelas características funcionais do epitélio formado por estas células.

Na membrana basolateral há a presença de $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$, canais de água (AQP do tipo 3 e 4), canais de potássio e trocadores de sódio e hidrogênio.

Na membrana luminal temos a presença de canais de sódio (ENaC), canais de potássio (ROMK), e AQP-2, como esquematizado na Figura 5.

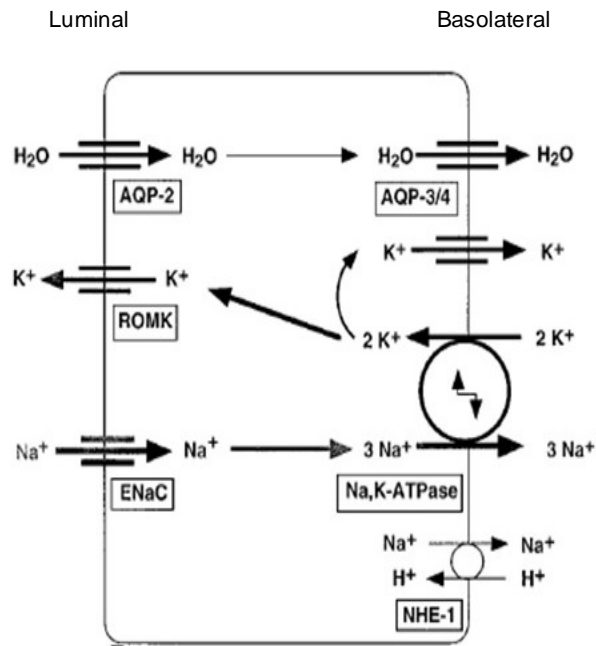


Figura 5 – Esquema da célula principal do ducto coletor. Estão representados os transportadores presentes nas membranas luminal e basolateral. Destaque deve ser dado à (Na^+K^+) -ATPase, transportador ativo primário responsável pelo gradiente de sódio necessário para o tráfico transcelular desse íon. Abreviações: AQP-2, aquaporina 2; AQP-3/4, aquaporina 3 e 4; ROMK, canal de potássio de medula externa; EnaC, canal de sódio eletrogênico; Na,K-ATPase, ATPase trocadora de sódio-potássio, NHE-1, trocador de sódio e hidrogênio do tipo 1. Adaptado. (FERAILLE e DOUCET, 2001).

A presença da (Na^+K^+) -ATPase na membrana basolateral é fundamental para o funcionamento da célula. Sua atividade mantém a concentração intracelular de sódio mais baixa do que na luz tubular, favorecendo a sua entrada por canais de sódio (ENaC) localizados em membrana luminal. Essa entrada luminal de sódio gera um potencial elétrico transepitelial, com a luz negativa, podendo variar de 0 a -60 mV (VINCIGUERRA *et al.*, 2005), que permite a

secreção do íon potássio. Em resumo, a célula principal tem como principal função reabsorver sódio e secretar potássio.

A expressão protéica e a atividade dos transportadores de membrana na célula principal do ducto coletor são reguladas por diversos estímulos. Estes incluem a alteração da concentração iônica, com aumento do sódio intracelular e redução do potássio extracelular ativando o funcionamento da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$, e estímulos hormonais (FERAILLE e DOUCET, 2001; VINCIGUERRA *et al.*, 2005).

O principal hormônio atuante na reabsorção de sódio é a aldosterona, descoberta em 1951 por Sylvia Simpson e James Tait, tendo recebido esse nome somente em 1954, após descrição de toda sua estrutura química (TAN *et al.*, 2004). A aldosterona é um hormônio mineralocorticóide, produzido na zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal. Sua secreção é estimulada diretamente pela angiotensina II após disparo do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Tanto a redução da volemia plasmática como a queda da pressão arterial ativam o SRAA, que, estimulando a reabsorção de sódio, leva à recuperação volêmica. O mecanismo de ativação do SRAA decorre da redução da filtração glomerular, que é sinalizada pela redução da concentração de NaCl na mácula densa (células especializadas de túbulo distal) ou por sinalização via receptores de estiramento existentes na arteríola aferente. A redução do fluxo significa possível hipovolemia e promove a secreção de renina na circulação, ativando o SRAA, o que leva a uma maior reabsorção de sódio.

A aldosterona possui receptores específicos em vários tecidos, incluindo as células de ducto coletor. No ducto coletor a aldosterona induz aumento da atividade da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ e dos canais ENaC. Também aumenta a atividade

de outros transportadores como a H⁺-ATPase (WAGNER *et al.*, 2004) e o trocador Na⁺/H⁺ (GEKLE *et al.*, 2001). Em relação à (Na⁺+K⁺)-ATPase, ocorrem dois mecanismos já bem descritos, um genômico, de resposta lenta e duradoura, e outro, não genômico, de resposta rápida.

O efeito genômico é dado pelo estímulo hormonal da síntese protéica, portanto, de resposta mais lenta e duradoura. A aldosterona ligada aos receptores intracitoplasmáticos de mineralocorticóides é internalizada no núcleo celular e estimula a síntese da (Na⁺+K⁺)-ATPase. A enzima recém sintetizada é então transportada pelo aparato celular em vesículas de membrana do retículo endoplasmático que irão se fundir à membrana basolateral, aumentando progressivamente o *pool* do transportador aí presente. Após estímulo inicial observa-se aumento progressivo da atividade enzimática com pico em 24 horas, perdurando até dois dias.

A indução não genômica da atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase ocorre por estímulo à migração de vesículas intracitoplasmáticas para a membrana basolateral (MBL). Tais vesículas contêm (Na⁺+K⁺)-ATPase já sintetizada e aumenta rapidamente a capacidade absorviva de sódio, secundário ao aumento do *pool* de enzima na membrana. O aumento da atividade pode ser notado 30 minutos após o estímulo e permanece por até 3 horas. Após 3 horas do estímulo inicial pela aldosterona, o aumento da atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase é dependente da síntese protéica. (SUMMA *et al.*, 2001; LE MOELLIC *et al.*, 2004)

Os mecanismos intracelulares envolvidos na indução da resposta não genômica não estão adequadamente esclarecidos. Em células MDCK foi descrita a interação com receptores de EGF, tipo tirosina-cinase, com estímulo direto e indireto da (Na⁺+K⁺)-ATPase (GEKLE *et al.*, 2002a; b). Em células M1-CCD,

derivadas de camundongo, a resposta não genômica foi associada à ativação de uma via MR/EGFR/PKD1 (MCENEANEY *et al.*, 2007) e nas células RCCD₂, derivadas de rato, foi descrito o envolvimento de sinalização por PKCa, estando este mediador também envolvido na ativação genômica (LE MOELLIC *et al.*, 2004).

A ativação da (Na⁺+K⁺)-ATPase por aldosterona foi demonstrada anteriormente em diversos tipos celulares semelhantes às células do ducto coletor, incluindo células MDCK-C7 (BLAZER-YOST *et al.*, 1996); MDCK “primitivas” (GEKLE *et al.*, 2002a; b); ASDN, derivadas de camundongo (SUMMA *et al.*, 2004); CCD, extraídas de ratos por dissecação (SUMMA *et al.*, 2001); RCCD₂ (LE MOELLIC *et al.*, 2004); IMCD-3, derivadas de camundongo (GUMZ *et al.*, 2003; ZIES *et al.*, 2007); e células A6 de rim de *Xenopus Laevis* (PFEIFFER *et al.*, 1999).

A aldosterona também induz o aumento da expressão de canais de sódio (ENaC) na membrana apical, favorecendo a entrada de sódio no meio intracelular e o tráfico transcelular de sódio. Foi descrito o aumento da atividade desses canais por uma via rápida (em duas horas), que envolve um estímulo direto do ENaC por uma cinase induzida por glicocorticóide 1 (SGK 1) e por uma via indireta, através da inibição da proteína que provoca endocitose do ENaC, a Nedd 4-2 (THOMAS e ITANI, 2004; RAIKWAR e THOMAS, 2008).

Outro hormônio atuante na regulação das funções das células principais é o hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina. A síntese do ADH se dá no hipotálamo e sua secreção na neuro-hipófise, que é regulada via osmorreceptores sensíveis a pequenas variações da osmolaridade plasmática. Na circulação, o ADH se liga a receptores de dois tipos: do tipo V1, localizados principalmente em

vasos sanguíneos e que promove a contração da musculatura lisa vascular (via liberação de endotelina, se ligando a receptor ET_A e aparentemente dependente de sinalização intracelular por PKC) (SILBERNAGL e DESPOPOULOS, 2003,b; YANG *et al.*, 2010) , e do tipo V2, localizados nas células principais do néfron distal.

Como indicado na Figura 6, o ADH ao se ligar ao receptor V2 presente na membrana basolateral da célula principal dispara a cascata de sinalização de adenilato ciclase/AMPC/PKA. O aumento do AMPC desencadeia a migração de vesículas submembranais para a membrana luminal. Tais vesículas contêm proteínas pré-sintetizadas, as AQP-2, que tornam a membrana apical da célula principal permeável à água. Dessa maneira é possível que a água seja transportada transcelularmente, de acordo com o gradiente osmolar existente entre lúmen, célula e interstício. O aumento da expressão dessas proteínas na membrana é rápido, com pico de ação em minutos e duração de até 12 horas. Colabora para o controle da reabsorção de água dependente de ADH a presença de junções tipo *tight* nesse segmento tubular, o que impede a passagem de água por via paracelular, ficando sua reabsorção totalmente dependente da via transcelular. A passagem da molécula de água pela membrana basolateral é garantida pela expressão constitutiva de AQP- 3 e 4 nesta estrutura celular (NIELSEN *et al.*, 2002; BEDFORD *et al.*, 2003).

O ADH também aumenta a atividade da (Na^+K^+) -ATPase e do ENaC. Em células do ducto coletor foi observado que vasopressina estimula rapidamente o transporte iônico, com pico em torno de 20 minutos e duração de até 2 horas (BLAZER-YOST *et al.*, 1996). A indução também se dá por estímulo da via adenilato ciclase/AMPC/PKA (GONIN *et al.*, 2001; VINCIGUERRA *et al.*, 2005). É

provável que o estímulo principal se dê no ENaC e o aumento do sódio intracelular aumente a atividade de $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$. A Figura 6 exemplifica os processos de sinalização intracelular da ativação dos transportadores de membrana em células principais mediados por estímulo hormonal.

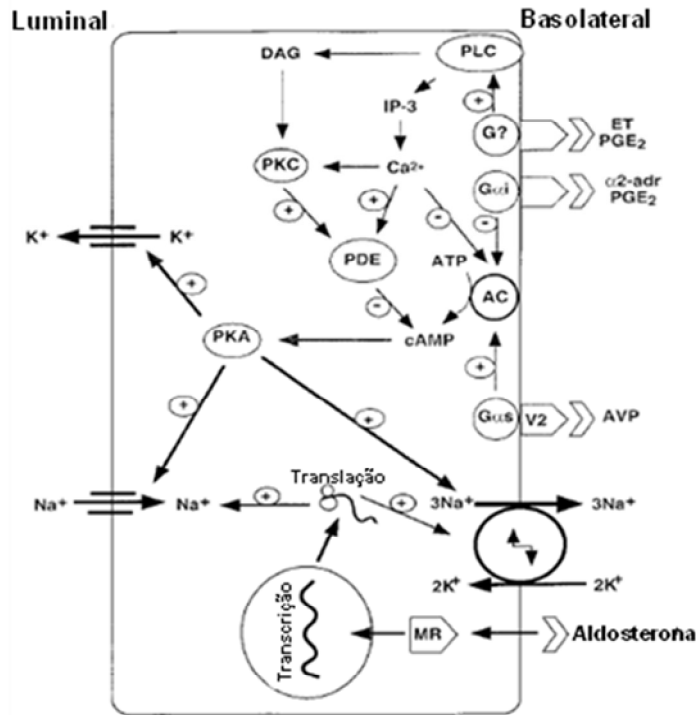


Figura 6 - Mecanismos de controle hormonal da reabsorção de sódio pela célula principal e vias de sinalização intracelular. Abreviações: AC, adenilato ciclase; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; ATP, adenosina trifosfato; AVP, vassopresina; DAG, diacilglicerol; ET, endotelina; G, proteína G de membrana (i = inibitória e s = estimuladora); IP-3, inositol trifosfato; MR, receptor de mineralocorticóide; PK, proteína cinase; PLC, fosfolipase C; V2, receptor de vassopresina tipo 2. (FERAILLE e DOUCET, 2001).

1.3.2 Células intercalares

As células intercalares participam da regulação do equilíbrio ácido-básico do organismo através da excreção ou reabsorção de H^+ ou HCO_3^- do lúmen tubular, modificando, assim o pH urinário.

As células α se localizam em vários segmentos do néfron distal (DCT, CNT, CCD, OMCD e no início do IMCD), sendo a célula intercalar majoritariamente encontrada no ducto coletor medular. Como indicado na Figura 7, este tipo celular tem como principal característica a presença da H^+ -ATPase na membrana luminal e do trocador de ânion AE1 (Cl^-/HCO_3^-) na membrana basolateral, o qual troca o ânion bicarbonato intracelular pelo ânion cloreto presente no meio extracelular, sendo, assim responsável pela secreção de H^+ e reabsorção de HCO_3^- .

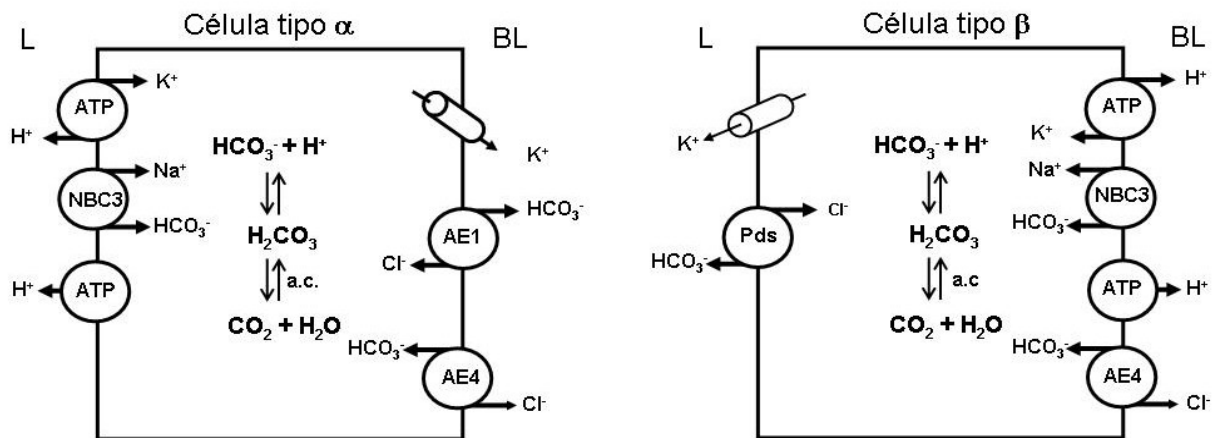


Figura 7 - Subtipos de células intercalares presentes em ducto coletor de ratos. Abreviações: L, luminal; BL, basolateral, ATP, adenosina trifosfato; AE, trocador de ânion; NBC3, co-transportador de sódio e bicarbonato do tipo 3 e Pds, Pendrina.

A existência da anidrase carbônica no citoplasma favorece a reação $H_2O + CO_2 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$, aumentando a eficiência da regeneração do bicarbonato e

secreção de íon hidrogênio. A atuação da célula a ocorre, portanto, em situações de acidose sistêmica. É importante citar que os sistemas tampão presentes na luz tubular permitem que a concentração luminal de H^+ seja mantida em níveis baixos, assim garantindo o gradiente favorável para sua secreção tubular, etapa importante para a regeneração do bicarbonato.

As células do tipo β , por sua vez, secretam o íon bicarbonato na membrana luminal e reabsorvem o íon hidrogênio. Localizam-se nos segmentos DCT, CNT e CCD. Neste tipo celular, ao contrário do que ocorre nas células do tipo a, na membrana luminal se expressa um trocador de ânion (Cl^- / HCO_3^-), denominado pendrina e codificado pelo gene *Slc26a4*, enquanto que na membrana basolateral está presente uma $H^+ATPase$ e dois mecanismos de transporte de bicarbonato, o trocador Cl^-/HCO_3^- (AE4) e o co-transportador Na^+/HCO_3^- (NBC3). Do mesmo modo que a célula intercalar do tipo a, a célula do tipo β também possui anidrase carbônica no citoplasma, funcionalmente importante em situações de alcalose sistêmica, quando ocorre secreção tubular do excesso de bicarbonato. As características da distribuição dos principais transportadores iônicos presentes nessas células estão esquematizadas na Figura 7.

Diferentemente das células principais, onde ocorre predominantemente secreção de K^+ , nas células intercalares há a reabsorção deste íon. Células intercalares do início do ducto coletor e do ducto coletor medular externo - OMCD reabsorvem potássio através da troca com o íon hidrogênio, principalmente em situações de hipocalêmia. Esse transporte é dependente da atividade da (H^++K^+)-ATPase), enzima que é expressa predominantemente nas células intercalares, ocorrendo também nas células principais do túbulo de conexão e do túbulo coletor cortical (GUNTUPALLI *et al.*, 1997; VERLANDER *et al.*, 2001). Células do ducto

coletor também apresentam canais de potássio, localizados em ambas as membranas, luminal e basolateral. As evidências experimentais indicam que tais canais são importantes na regulação da reabsorção/secreção de potássio pelas células do ducto coletor, embora tais mecanismos não estejam completamente esclarecidos. É sabido que ocorre uma ativação seletiva dos canais presentes na membrana luminal na vigência de hipercalemia, favorecendo a secreção do K^+ . Em situação de hipocalemia observa-se a supressão dos canais de potássio apicais e a ativação dos canais presentes na membrana basolateral, favorecendo a reabsorção de potássio. A hipocalemia é também o principal estímulo da ativação da (H^++K^+) -ATPase. Os mecanismos de regulação do transporte de K^+ estão ilustrados na Figura 8 (GIEBISCH *et al.*, 2003; WANG e GIEBISCH, 2009).

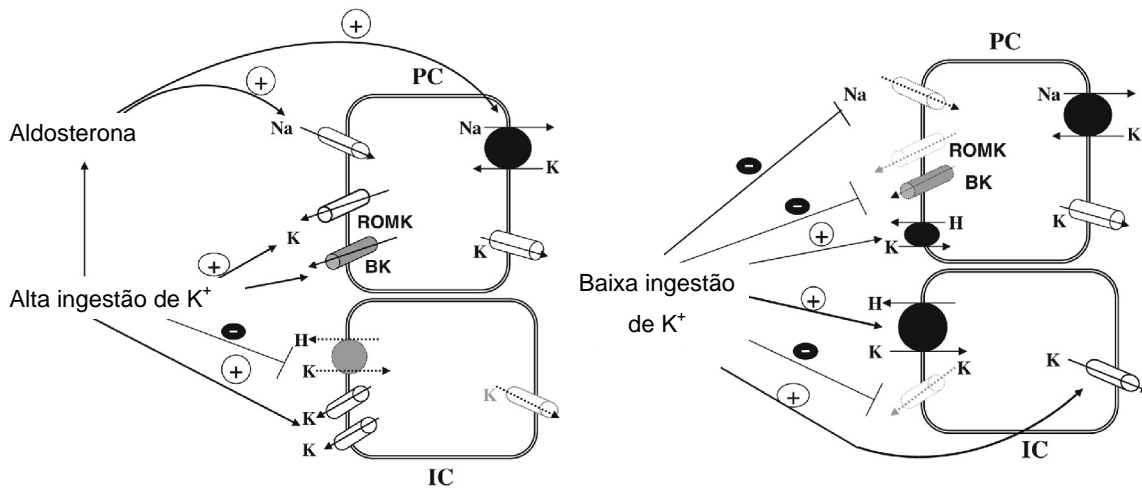


Figura 8 – Mecanismo de regulação de secreção e absorção de K^+ em células do ducto coletor. Abreviações: BK, canal de potássio “Maxi-channels”; IC, células intercalares do ducto coletor; PC, células principais do ducto coletor e ROMK, canal de potássio da medula renal externa. (WANG e GIEBISCH, 2009).

Também foi descrita a existência de células do tipo não α e não β , com distribuição semelhante à da célula do tipo β , com maior localização no túbulo de

conexão - CNT. Estas células apresentam pendrina na membrana luminal e a H^+ -ATPase e o transportador AE4 na membrana basolateral. Há evidências de que, funcionalmente, estas células possam originar as células do tipo α ou β , de acordo com as condições do equilíbrio ácido-básico.

Em condições controle, a maior ocorrência de células do tipo α que as do tipo β corresponde à necessidade funcional, já que o processo de respiração celular e o catabolismo protéico levam à produção de ácidos. No organismo humano há a produção média diária de 1 mEq de H^+ por quilo de peso, sendo essencial a eliminação do hidrogênio pelos rins para evitar acidose metabólica.

Diferentemente das demais células do organismo, em que a (Na^+K^+) -ATPase é constitutiva, sua expressão em células intercalares é controversa, contrastando com sua inequívoca presença na célula principal (FERAILLE e DOUCET, 2001; BRENNER, 2004). Diversos autores não obtiveram sucesso em identificar a (Na^+K^+) -ATPase em células intercalares (PREISS *et al.*, 1979; KASHGARIAN *et al.*, 1985; HOLTTHOFER *et al.*, 1987; WETZEL e SWEADNER, 2001), enquanto outros, utilizando diferentes técnicas, descreveram a discreta presença dessa enzima em diferentes espécies animais (RIDDERSTRALE *et al.*, 1988; BUFFIN-MEYER *et al.*, 1998; SABOLIC *et al.*, 1999).

1.4 A (Na^+K^+) -ATPase

A (Na^+K^+) -ATPase, enzima presente em quase todas as células dos organismos eucarióticos, foi descrita em 1957 por J.C. Skou (SKOU, 1957), sendo sua descoberta premiada em 1997 com o prêmio Nobel (PEDERSEN, 2005). Por causar extrusão de sódio e intrusão de potássio, mantém a concentração

intracelular baixa em Na^+ e alta em K^+ . Esse transporte apresenta estequiometria fixa (saída de três moléculas de Na^+ para cada duas de K^+ que entram célula) criando as condições para que se estabeleça o potencial elétrico característico da membrana celular, sendo a face interna negativa e a extracelular positiva. A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ é o maior determinante da baixa concentração do sódio no meio intracelular (THERIEN e BLOSTEIN, 2000), sendo sua atividade dependente da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP). Como ilustra a Figura 9, sua distribuição ocorre de maneira heterogênea nos diferentes segmentos dos túbulos renais, sendo sua maior expressão nos túbulos proximais, na alça ascendente espessa e no ducto coletor (BRENNER, 2004).

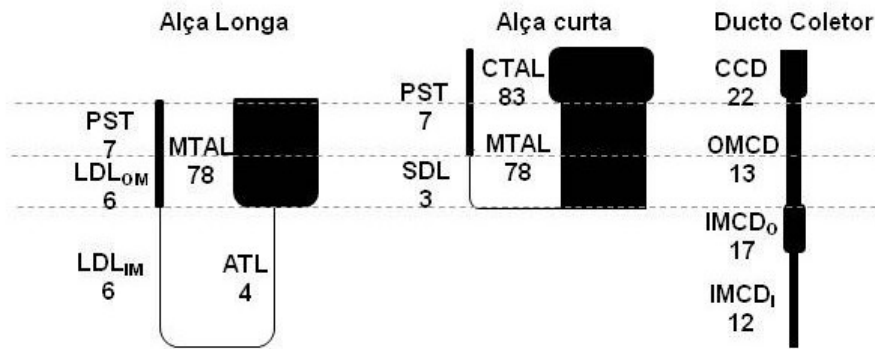


Figura 9 - Atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ em segmentos tubulares renais localizados na medula do rim de rato (excluindo TCP e TCD). Quanto maior a espessura representada, maior a atividade. Em parênteses, atividade expressa em pmol/min/mm. Abreviações: PST, túbulo reto proximal; LDL, alça longa de Henle (OM = medula externa e IM = medula interna); ATL, ramo ascendente fino; TAL, ramo ascendente espesso (C = cortical e M = medular); SDL, alça curta de Henle; CCD, ducto coletor cortical; OMCD, ducto coletor medular externo; IMCD, ducto coletor medular interno (0 = externo e i = interno). (Modificado de BRENNER, 2004).

A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ é formada por três subunidades: α , β e γ . A subunidade α detém a característica de transporte de sódio e nela se encontram os sítios de ligação das substâncias que estimulam a atividade do transportador: Na^+ e ATP no lado intracelular e K^+ e ouabaína no lado extracelular. É, portanto,

considerada a subunidade catalítica da enzima. A subunidade α é uma proteína de membrana com 10 domínios intramembranais (M1-M10), com domínios intracelulares terminais NH₂ e COOH e uma alça citoplasmática longa (M4-M5). Neste segmento intracitoplasmático se localiza o sitio de fosforilação do ATP, zona altamente conservada e característica das P-ATPases. A ouabaína se liga aos domínios M1 a M4 e as porções terminais intracelulares são pontos de fosforilação por proteínas cinase. A subunidade β não tem atividade enzimática ou de transporte, mas é fundamental para o funcionamento do transportador, pois auxilia na formação da dobradura característica da subunidade α e estabiliza a mesma na membrana, além de orientar seu transporte dos retículos para a membrana plasmática.

A subunidade β 1 é essencial tanto na polarização do epitélio como na adesão celular. Foi verificado que nas células MDCK a localização da (Na⁺+K⁺)-ATPase na membrana baso-lateral depende do contacto entre as células que expressam a proteína β 1 (SHOSHANI *et al.*, 2005; CONTRERAS *et al.*, 2006). Mais recentemente foi demonstrado que células incubadas com anticorpos contra o domínio extracelular da subunidade β 1 da (Na⁺+K⁺)-ATPase apresentam inibição da formação de contacto intercelular (VAGIN *et al.*, 2009).

A subunidade γ não é necessária ao funcionamento enzimático, no entanto foi verificado que esta modifica a afinidade da enzima ao ATP, ao sódio e ao potássio (THERIEN e BLOSTEIN, 2000; FERAILLE e DOUCET, 2001).

Há várias isoformas de cada uma das subunidades da (Na⁺+K⁺)-ATPase. A subunidade α é sintetizada por 4 genes, dando origem às isoformas α 1, 2, 3 e 4. Todas apresentam seqüências gênicas bastante conservadas entre si, mas são diferentemente expressas nos tecidos dos mamíferos. A isoforma 1 está presente

em todos os tecidos, sendo no tecido renal a única isoforma expressa; a isoforma 2 é expressa no coração, músculo esquelético e cérebro; a isoforma 3 em tecido neuronal e ovário; e a quatro é restrita ao testículo (FERAILLE e DOUCET, 2001; DOSTANIC-LARSON *et al.*, 2006).

A $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ sofre uma fosforilação transitória para a sua ativação, sendo chamada, também, de E1-E2 ATPase porque exibe dois domínios conformacionais, um quando não fosforilada (E1 e E2) e outro quando fosforilada (E1-P e E2-P). A fase E1 tem alta afinidade pelo ATP e sódio e baixa ao potássio. Na forma E2 a acessibilidade dos cátions ocorre pelo lado externo da membrana com baixa afinidade ao sódio e alta ao potássio. A ativação do transportador se inicia com a ligação do ATP, magnésio e sódio na face intracelular de E1, seguida de fosforilação do E1 a E1-P e o fechamento dos íons sódio dentro deste complexo. Com a liberação do ADP há a transformação para a forma E2-P com abertura extracelular e liberação do sódio e ligação a este sítio do potássio extracelular. Há então defosforilação a E2 com oclusão do potássio dentro do complexo. Por fim, há uma reversão espontânea para E1 com liberação do potássio dentro da célula. A seletividade por Na pode ser substituída por lítio e a de potássio por rubídio (FERAILLE e DOUCET, 2001). Esse ciclo catalítico é ilustrado na Figura 10.

A $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ é caracteristicamente ativada por Na^+ e ATP em sítios citoplasmáticos e por K^+ em sítios extracelulares, ambos os íons atuando como substrato enzimático. A metade da ativação máxima ($K_{0,5}$) ocorre entre 10–40 mM e sua capacidade máxima (K_m) é atingida com 60-100 mM de $[\text{Na}^+]_i$. Como a concentração de sódio intracelular habitual é de 5-20 mM, há uma grande

reserva funcional desta enzima, sendo que pequenas variações do $[Na^+]_i$; determinam grandes variações na atividade enzimática. Em relação ao potássio, o K_m é de 0,5-1,5 mM, sendo o potássio extracelular (3,5-5,0 mM) um fator não limitante para a atividade enzimática, salvo em situações de hipocalemia grave.

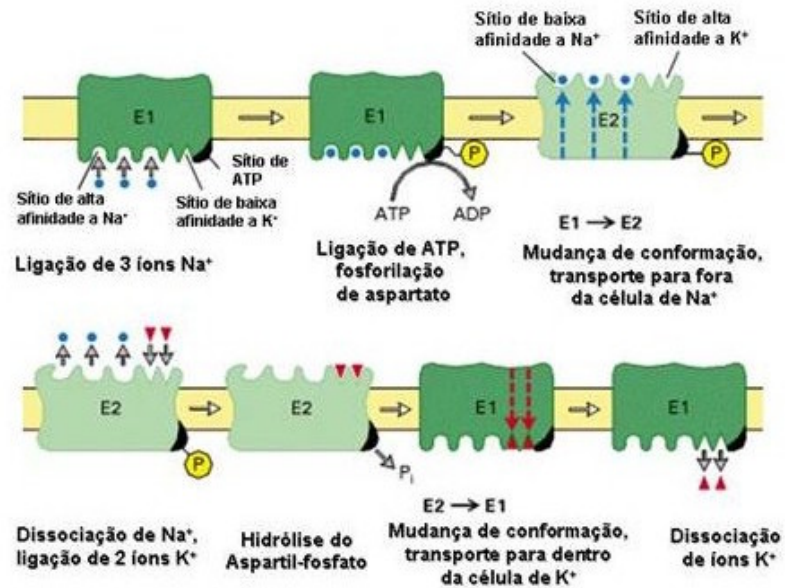


Figure 10 – Ciclo de funcionamento da $(Na^+K^+)ATPase$. Observa-se o transporte iônico dependente do acoplamento de ATP. A fosforilação e defosforilação da proteína levam a mudança conformacional da mesma, permitindo o transporte iônico transmembranar. Abreviações: ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; E, intermediário enzimático. Adaptado. (LODISH H., 2006).

O $K_{0,5}$ da $(Na^+K^+)-ATPase$ para ATP é de 300 a 800 μM , sendo a concentração de ATP saturante para a enzima na maioria das células. No entanto, condições de hipóxia determinam queda importante do $[ATP]_i$, podendo limitar a ativação da $(Na^+K^+)-ATPase$ (THERIEN e BLOSTEIN, 2000).

Os glicosídeos digitálicos, sendo a ouabaína o mais descrito e utilizado, inibem a $(Na^+K^+)-ATPase$. A ouabaína se liga ao domínio extracelular da

(Na⁺+K⁺)-ATPase em sua conformação E2 e diminui a afinidade para o potássio, atuando como um inibidor competitivo. A ouabaína, portanto, bloqueia a transformação de E2 para E1. Outro potente inibidor da (Na⁺+K⁺)-ATPase, porém inespecífico, é o vanadato. Este se liga ao sítio de fosforilação da enzima e a bloqueia na forma E2. A ouabaína também inibe a atividade da forma não gástrica da H⁺-K⁺-ATPase (BUFFIN-MEYER *et al.*, 1998). Já a forma gástrica dessa enzima pode ser inibida pelo composto SCH28080 (FERNANDEZ *et al.*, 2000).

1.5 A Na⁺-ATPase

A extrusão ativa de sódio do interior celular para o meio extracelular, independente da (Na⁺+K⁺)-ATPase, insensível à ouabaína, mas completamente inibida pelo ácido etacrínico, foi caracterizada em 1970 por Proverbio em fatias de córtex de rim de cobaio (*Cavia porcellus*). Desta observação surgiu a hipótese de haver duas bombas envolvidas na regulação do sódio intracelular e no controle do volume celular, a (Na⁺+K⁺)-ATPase e a Na⁺-ATPase, que atuariam de forma independente (PROVERBIO F., 1970; PROVERBIO *et al.*, 1988).

Em 1981 foi verificado que essa atividade ATPásica insensível à ouabaína estava presente em frações de membrana basolateral de células obtidas do córtex de rim de porco (PROVERBIO e DEL CASTILLO, 1981). Sua presença foi confirmada em homogeneizado de córtex renal e membrana basolateral de células tubulares renais de rim de porco (DEL CASTILLO *et al.*, 1982) e de rato (MARIN *et al.*, 1985a; b; PROVERBIO *et al.*, 1986). Foram encontradas evidências indicando sua possível participação no controle do volume celular, tendo sido sugerido que, na verdade, a atividade da (Na⁺+K⁺)-

ATPase não seria afetada por variações do volume celular, cabendo esta função à Na^+ATPase (PROVERBIO *et al.*, 1988). A Figura 11 representa esquematicamente a localização e o funcionamento da Na^+ATPase na célula do túbulo proximal.

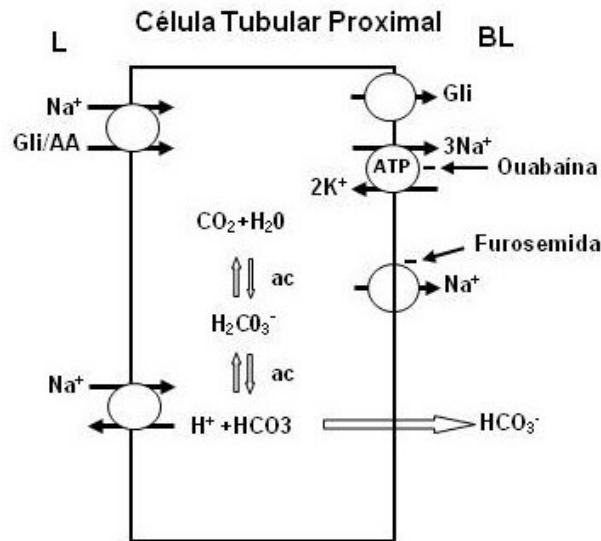


Figura 11 - Desenho esquemático da célula do túbulo proximal indicando a localização da Na^+ATPase e da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$. A $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ é inibida por glicosídeos digitálicos (como a ouabaína) e a Na^+ATPase por diuréticos de alça (como a furosemida). Os demais transportadores presentes na célula do túbulo proximal também estão representados. Abreviaturas: Gli, glicose e AA, aminoácido.

Nas células do túbulo proximal a atividade $\text{Na}^+\text{ATPásica}$ representa 10% da atividade basal da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$. No entanto, esse pequeno percentual pode representar um transporte significativo de sódio, considerando que no segmento proximal ocorre reabsorção de 65% a 70% do sódio ultrafiltrado no glomérulo.

A Na^+ATPase foi caracterizada como uma ATPase do tipo P, com peso molecular de 100 KD (CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; MORCILLO, 2004), que

transporta ativamente sódio do meio intracelular para o extracelular. Seu ciclo catalítico é semelhante ao da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$, ocorrendo duas formas conformacionais: as formas E1 e E2, que serão fosforiladas. Inicialmente o sódio se liga à forma E1, em seguida, o ATP se une a este complexo, formando o intermediário $\text{NaE1}\sim\text{P}$, que sofre então mudança conformacional, direcionando o Na^+ para o meio extracelular, onde perde afinidade a este íon, liberando-o para o meio extracelular, assim passando para a forma $\text{E2}\sim\text{P}$. O intermediário $\text{E2}\sim\text{P}$ é então hidrolisado com liberação do P e liberação da forma E2, que retorna posteriormente à forma E1 (DE SOUZA, 2003; QUINTANA-GOMES, 2004). Várias características próprias da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, apresentadas na Tabela 1, indicam tratar-se de uma enzima distinta da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ (DEL CASTILLO *et al.*, 1982).

Tabela 1: Características que diferenciam a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ (adaptado de Del Castillo, Marin *et al.*, 1982).

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

Nas células do túbulo proximal de rim de porco foi verificado que a atividade da Na⁺-ATPase pode ser modulada pela ação hormonal. A angiotensina II estimula a atividade da Na⁺-ATPase (CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; RANGEL *et al.*, 2005), a angiotensina (1-7) a estimula via AT1 e a inibe via AT2 (LARA *et al.*, 2006), a urodilatina e o ANP inibem sua atividade (CARUSO-NEVES *et al.*, 2004) e a bradicinina, via receptor B2, inibe a sua ação, enquanto a estimula via receptor B1 (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999b). A modulação da Na⁺-ATPase, leva a crer que a enzima atue no ajuste fino da reabsorção de sódio pelo túbulo proximal. A Tabela 2 resume a resposta da Na⁺-ATPase a alguns hormônios e autacóides.

Tabela 2: Modulação de atividade da Na⁺-ATPase em células do túbulo proximal de rim de porco.

Hormônio/Autacóide	Efeito	
Angiotensina II	AT1↑	AT2↓
Angiotensina (1-7)	AT1↑	AT2↓
ANP	↓	
Urodilatina	↓	
Bradicinina	B1↑	B2↓
Adenosina	A2 ↑	

Ainda que os dados disponíveis indiquem que em mamíferos essa enzima se distribui paralelamente à (Na⁺+K⁺)-ATPase, pouco se sabe sobre sua expressão ao longo do néfron, excetuando o túbulo proximal, onde foi bastante estudada. Sua presença foi identificada anteriormente em células MDCK I, derivadas de rim de cão e com características funcionais semelhantes às das células do ducto coletor (DE SOUZA *et al.*, 2007b).

A Na⁺-ATPase também foi identificada no epitélio intestinal e tecido neuronal de mamíferos (BORGATTI *et al.*, 1985; MORETTI *et al.*, 1991; CARUSO-NEVES *et al.*, 2002), em *Trypanosoma cruzi* (CARUSO-NEVES *et al.*, 1999a), em túbulos de Malpighi de *Rodhnius prolixus* (CARUSO-NEVES *et al.*, 1998), em *Leishmania amazonensis* (DE ALMEIDA-AMARAL *et al.*, 2008), em *Entamoeba histolytica* (DE SOUZA *et al.*, 2007a). Recentemente, foi clonada no *Trypanosoma cruzi* a estrutura de um transportador ativo de Na⁺, denominado ENA, com características que se assemelham à Na⁺-ATPase, (IIZUMI *et al.*, 2006).

1.6 H⁺-ATPase e (H⁺+K⁺)-ATPase

As células intercalares do ducto coletor expressam altos níveis de H⁺-ATPase quando comparadas a outras células tubulares. A H⁺-ATPase é uma ATPase do tipo V (vacuolar), com dois domínios, um catalítico extracelular (V₁) e um ligado à membrana (V₀). Cada domínio é composto de várias subunidades, sendo as isoformas B1, a4, G3, C2 e d2 expressas caracteristicamente no rim e em particular nas células intercalares. No domínio V₀ se localiza o sítio de ligação do próton. Este transportador é potentemente inibido por níveis nanomolares de antibióticos macrolídios como a bafilomicina A₁ e a concanamicina. Ambas interagem com subunidades do domínio membranoso do transportador. A H⁺-ATPase localiza-se em vesículas intracelulares, onde participa da acidificação dos vacúolos fagocíticos e vesículas endossomais ou na superfície de algumas células, entre elas as intercalares do tipo α (na membrana luminal) e do tipo β (na membrana basolateral). Na célula intercalar α, a H⁺-ATPase secreta o H⁺, enquanto que o reabsorve na célula intercalar β. Nas células do tipo α o

funcionamento deste transportador depende da presença do tampão urinário (fosfato, citrato e amônia), da anidrase carbônica no citossol, e do transportador de bicarbonato na membrana basolateral. O sistema tampão reduz a concentração de hidrogênio livre tubular e mantém o gradiente de próton favorável à atividade da H⁺-ATPase. A anidrase carbônica cataliza a reação que produz hidrogênio livre no meio intracelular e fornece substrato para a enzima e o transporte de bicarbonato equilibra o pH intracelular. A expressão do transportador na superfície celular pode ser aumentada através do acoplamento das vesículas citoplasmáticas à membrana. Estudos de imunohistoquímica demonstraram que em condições de acidose sistêmica há aumento da expressão da H⁺-ATPase na borda luminal do epitélio do ducto coletor, enquanto que na alcalose esse aumento ocorre na membrana basolateral. Estímulos hormonais, como o da angiotensina II e o da aldosterona, aumentam a atividade da H⁺-ATPase (WAGNER *et al.*, 2004; JEFFERIES *et al.*, 2008).

A (H⁺+K⁺)ATPase é uma P-ATPase encontrada nas células tubulares do ducto coletor, principalmente nas intercalares. A (H⁺+K⁺)ATPase é composta pelas subunidades α , com função catalítica, e β , responsável pela estabilização da enzima, seu direcionamento à membrana, e pela troca ativa de H⁺ por K⁺. A subunidade α tem diferentes isoformas, enquanto a subunidade β é única. Diferentes tipos de enzima foram identificados, caracterizados pelas isoformas da subunidade α , a saber: a forma gástrica (HK_{a1}, isolada de células secretoras de ácido no estômago), a forma colônica (HK_{a2a}, isolada de células de cólon de rato), e suas versões isoladas de rim de rato (HK_{a2b}) e de coelho (HK_{a2c}), uma forma clonada de bexiga de sapo (HK_{a3}) e uma outra clonada de pele humana (HK_{a4}) (KRAUT *et al.*, 2001). A forma gástrica é inibida pelo SCH-28080 e a forma

colônica é inibida pela ouabaína, sendo insensível ao Sch-28080 (CODINA e DUBOSE, 2006). Ambas as formas gástrica e colônica foram identificadas em células principais e intercalares de ducto coletor de rato e coelho. Em rim humano foi somente identificado a presença das isoformas HK_{a1} e HK_{a4}. Ambas estão presentes nas células intercalares a e, em menor extensão, nas células principais (KRAUT *et al.*, 2001). Como ilustrado na Figura 8, a atividade desta enzima é modulada pela concentração plasmática de potássio. Não há relato de modulação da (H⁺+K⁺)ATPase pela aldosterona em ducto coletor de ratos (EIAM-ONG *et al.*, 1993).

1.7 Descrição da Na⁺-ATPase em células MDCK

Ainda que haja muitos trabalhos mostrando a presença da Na⁺-ATPase no túbulo proximal, uma única publicação a descreve na linhagem de células MDCK I, que apresentam características semelhantes às do túbulo distal (DE SOUZA *et al.*, 2007b). Esses autores detectaram a presença da Na⁺-ATPase através da medida da atividade ATPásica inibida por furosemida e por vanadato na presença de ouabaína, tendo observado que essa atividade era estimulada pelo aumento da concentração de sódio e não respondia ao aumento da concentração do potássio. Houve ainda a preocupação da diferenciação das atividades das Na⁺-ATPase e do intermediário ativo da (Na⁺+K⁺)-ATPase, tendo sido demonstrada a presença de atividade ATPásica sensível à furosemida após imunoprecipitação da subunidade α da (Na⁺+K⁺)-ATPase. Em homogenato, a atividade basal da Na⁺-ATPase encontrada foi de 4,49±0,6, e a da (Na⁺+K⁺)-ATPase foi de 8,61±0,7 nmol Pi.mg⁻¹ min⁻¹. Em fração microsomal a atividade da

Na⁺-ATPase foi de 19,30±1,5 nmol Pi.mg⁻¹ min⁻¹ e a da (Na⁺+K⁺)-ATPase foi de 34,42±4,8 nmol Pi.mg⁻¹ min⁻¹. A atividade da Na⁺-ATPase em homogenato aumentava com exposição a concentrações crescentes de NaCl, mas não de KCl.

1.8 Modelo de estudo do ducto coletor: a célula MDCK

Considerando a localização dos túbulos coletores no tecido renal, as opções de modelo experimental que melhor se aplicam para seu estudo são o uso de segmentos dessa porção do néfron obtidos através de microdissecção, cultura primária de células ou cultura de células imortalizadas. Os principais modelos de cultura de células do ducto coletor utilizados experimentalmente são: células A6; células Ma-1; células MDCK; células de IMCD e OMCD isoladas de ratos ou coelhos, mpKCCD, ASCD, entre outras.

As células MDCK (*Mardin Darby Canine Kidney*) foram isoladas de rim de um cachorro aparentemente normal, de gênero feminino, da raça *Cocker Spaniel* em 1958 por S.H. Madin e N.B. Darby (MEIER *et al.*, 1983). Esta linhagem celular forma epitélio com a capacidade de transporte transepitelial de fluido e mantém respostas a estímulos hormonais semelhantes às observadas em células epiteliais renais distais *in situ*. Além disso, apresenta características de células imortais, o que facilita o seu uso como material para experimentação biológica (RINDLER *et al.*, 1979).

As características de transporte iônico e de água, bem como a facilidade de cultura, tornaram esta linhagem celular um modelo muito utilizado para o estudo do transporte de sódio nesse segmento do néfron. Macroscopicamente, o transporte de água e soluto pode ser identificado pela formação de macro-

estruturas quando as células encontram-se confluentes, denominados domos, que são elevações no tapete celular determinadas por acúmulo de água e íons logo abaixo do epitélio em cultura. As células MDCK apresentam junções do tipo *tight*, sendo o transporte de água e íons realizado através da via transcelular. Vários estudos determinaram que o transporte iônico é modulado por diversos estímulos, incluindo aldosterona, vassopresina, ocitocina, prostaglandinas e catecolaminas (RINDLER *et al.*, 1979; MEIER *et al.*, 1983).

Uma característica importante das células MDCK primitivas em cultura é sua heterogeneidade, sendo encontrados pelo menos dois tipos celulares distintos, como descrito inicialmente por Valentich *et al.* em 1981. A diferenciação dos subtipos foi feita a partir de critérios morfológicos, bioquímicos e funcionais. Após comparar morfológicamente a estrutura da MDCK com células do ducto coletor de outros mamíferos, os autores descreveram dois tipos celulares distintos, um com a presença de cílios e outro não ciliado (VALENTICH, 1981). Em 1989 esses dados foram confirmados com a descrição de clones móveis e não móveis (NAKAZATO *et al.*, 1989) que teriam homologia com as células ciliadas e as não ciliadas, respectivamente. Posteriormente, foi determinado que essas sub-populações de células apresentam resistividade elétrica e transporte iônico distintos (ARTHUR, 2000). Em 1994 Gekle *et al.* descreveram de modo mais detalhado as diferenças das células MDCK, relatando a existência de dois clones com características distintas, MDCK-C7 e MDCK-C11, caracterizados respectivamente como células principais e intercalares (GEKLE *et al.*, 1994). As diferenças existentes entre os dois clones estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Diferenças entre células MDCK-C7 e MDCK-C11 (GEKLE *et al.*, 1994).

	MDCK-C7	MDCK-C11
Resistência elétrica transepitelial	Alta (56488±206 Ω)	Baixa (330±52 Ω)
Secreção iônica apical	K ⁺	Cl ⁻
Estímulo hormonal	Secreção de K ⁺ estimulada por aldosterona e inibida por amilorida	Secreção de H ⁺ estimulada por cAMP
<i>Peanut Lecithin</i> (PNA)	Negativo	Maioria é positiva
pH intracelular	7,39±0,05	7,16±0,05
Acidificação do meio	Acidifica fortemente	Acidifica levemente

Os sub- clones MDCK-C7 e MDCK-C11 foram isolados de células MDCK originalmente obtidas da ATCC (*American Type Cell Collection*) na passagem 53. Foram sub-clonadas pelo grupo de H. Oberleithner (Departamento de Fisiologia, Universidade de Munique, Alemanha) na passagem 57 e utilizadas em experimentação para definição de suas diferentes características nas passagens 62 a 72 (GEKLE *et al.*, 1994). Tais clones não podem ser encontrados atualmente na ATCC. Os clones disponíveis no ATCC são CCL34, CRL-2285 e CRL-2286, ilustrados na Figura 12 (ATCC (*American Type Cell Collection*)).

O uso dessas células como modelo experimental é pouco freqüente e restringe-se a poucos centros de pesquisa. Ao procurarmos citações no PubMed/Medline (rede de referencia bibliográfica da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos) que utilizaram essas células como modelo experimental encontramos 55 referências para MDCK-C7 e 27 para MDCK-C11. As primeiras publicações advém do grupo de Oberleithner, que originalmente clonou as células. Esse grupo posteriormente cedeu os clones a outros pesquisadores, disseminando seu uso, mas ainda de maneira restrita. Essas

células foram utilizadas para o estudo de transporte iônico (FERNANDEZ *et al.*, 2000; TARARTHUCH *et al.*, 2002; TARARTHUCH *et al.*, 2007), de junções paracelulares (AMASHEH *et al.*, 2002), resposta hormonal (aldosterona e vasopressina) (BLAZER-YOST *et al.*, 1996; GEKLE *et al.*, 2002b) e farmacotoxicidade (SCHRAMEK *et al.*, 1997; GEKLE *et al.*, 2000).

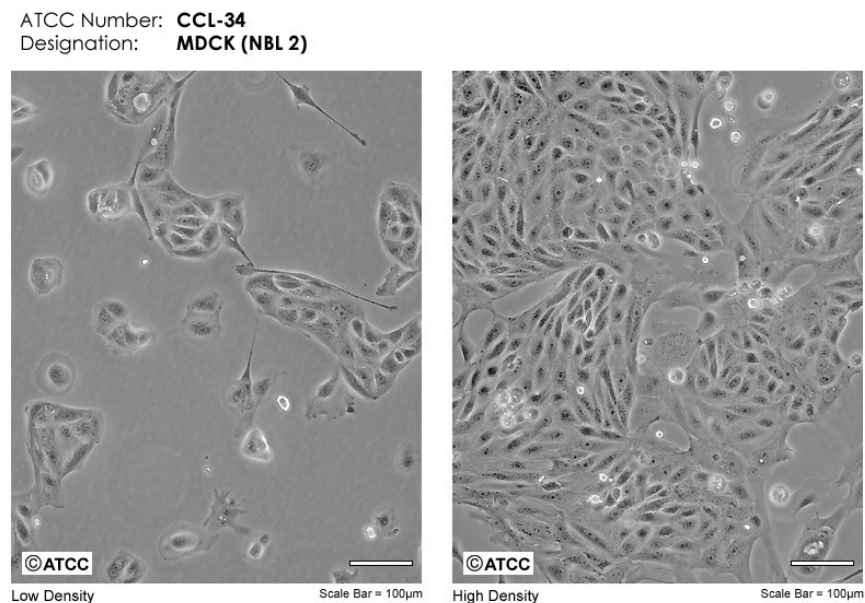


Figura 12 - Fotomicrografia de células MDCK encontradas na ATCC - *American Type Cell Collection* ([www: http://atcc.org](http://atcc.org), acesso 2 agosto de 2009).

1.9 Diferenciação celular no ducto coletor

Um aspecto relevante a ser descrito é a plasticidade das células intercalares. Como dito anteriormente, há evidências de que em condições de acidose predominam as células do tipo α e em alcalose as células do tipo β e que isso se deve à mudança fenotípica destas células ao estímulo ácido-básico. Essa capacidade de mudança fenotípica está relacionada à presença de uma proteína

da matriz extracelular denominada hensina (WAGNER *et al.*, 2004). A expressão de hensina dispara o mecanismo para diferenciação de célula tipo β para α . Verificou-se *in vitro* que em situação de densidade superconfluenta há conversão do tipo β para α (AL-AWQATI *et al.*, 1998; AL-AWQATI *et al.*, 2000), dependente da expressão de hensina na matriz extracelular. Ao contrário, células semeadas em densidade subconfluenta mantêm fenótipo de célula β (SCHWARTZ e AL-AWQATI, 2005). Também foi relatada a interconversão entre células intercalares e células principais (FEJES-TOTH e NARAY-FEJES-TOTH, 1992; WAGNER *et al.*, 2004) e que o uso de lítio por 4 semanas em ratos, leva à redução expressiva de células marcadas para AQP-2 em ducto coletor e um aumento das células intercalares, marcadas positivamente para H^+ -ATPase (CHRISTENSEN *et al.*, 2004). Também foi verificado, em tecido cortical embrionário de coelho, que a formação de células β é estimulada por aldosterona e inibida por alta concentração de uréia (SCHUMACHER *et al.*, 2003). Portanto, há evidências de plasticidade nas células do ducto coletor, com transformação fenotípica dependente da condição ácido-básica do meio extracelular, da expressão de proteínas na matriz extracelular, do estímulo por hormônios, da densidade de cultivo e da concentração de uréia no meio.

1.10 Resposta celular à variação do pH

Em células de mamífero o pH intracelular (pH_i) é mantido em torno de 7,2 através de mecanismos regulatórios que envolvem diferentes transportadores iônicos. O metabolismo aeróbico celular em situação basal produz CO_2 que, combinado com a água em reação cuja velocidade é aumentada em cerca de 400

vezes pela ação da anidrase carbônica, produz H_2CO_3 , um ácido fraco que se dissocia em HCO_3^- e H^+ .

A eliminação do H^+ intracelular depende de um conjunto de transportadores iônicos específicos. Em situação de acidose intracelular três transportadores podem ser ativados, o $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$; o $\text{Na}^+:2\text{HCO}_3^-$ e o Na^+/H^+ . O $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, determina a entrada de $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ na célula em troca de Cl^- . No meio intracelular o $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ se dissocia em Na^+ e HCO_3^- . Sob a ação da anidrase carbônica o HCO_3^- reage com o H^+ , formando H_2CO_3 , que se dissocia em água e CO_2 que se difundem para o exterior celular. Outra via possível seria o HCO_3^- , sob a ação da anidrase carbônica, formar CO_2 e OH^- , que reagiria com o H^+ , tamponando esse íon sob a forma da molécula de água (H_2O). Para que isso ocorra é necessária a manutenção de concentrações adequadas de sódio e de cloreto no meio intracelular. O trocador Na^+/H^+ possibilita a entrada de Na^+ a favor de seu gradiente eletroquímico em troca da saída de H^+ . Algumas células possuem ainda transportadores ativos de H^+ (H^+ -ATPase e (H^++K^+) -ATPase) que atuam na regulação do H^+ intracelular.

Em situações de alcalose intracelular há excesso de OH^- , a qual se combina com o CO_2 formando HCO_3^- , que é transportado para fora da célula através do trocador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ou do cotransporte $\text{Na}/3\text{HCO}_3^-$ regulando, assim, sua concentração intracelular. Portanto, de acordo com a situação ácido-básica do meio intracelular, diferentes transportadores iônicos são envolvidos no ajuste do pH_i , como ilustra a Figura 13 (BORON, 2004).

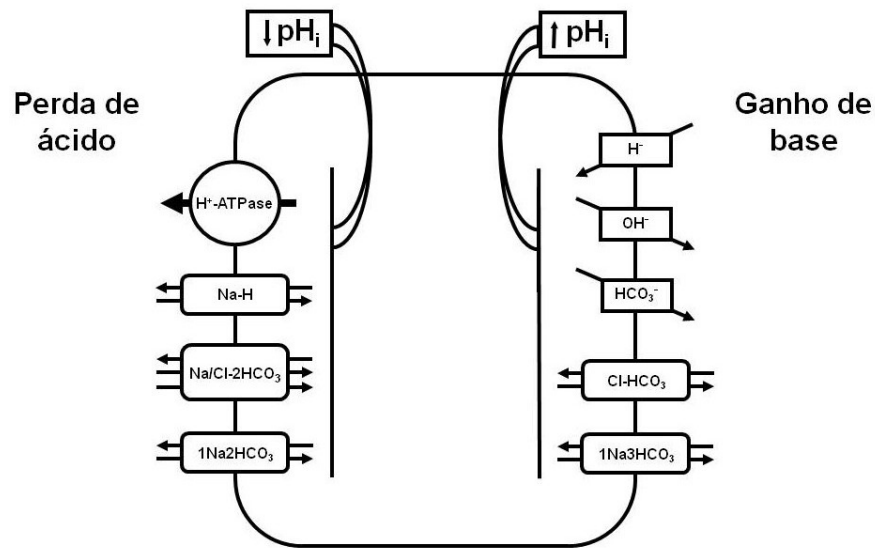


Figura 13 - Transportadores presentes na membrana celular dependente do pH intracelular. Adaptado de Boron, 2004.

Assim sendo, em situações de estresse ácido a célula se protegerá evitando a acidificação do pH_i e, em situação de estresse alcalino, a célula se protegerá evitando alcalinização do pH_i (BORON, 2004).

1.11 Resposta celular à hiperosmolaridade do meio

A exposição de uma célula a um meio hiperosmolar desencadeia uma resposta adaptativa. O estresse hiperosmolar leva inicialmente à saída de líquido do meio intracelular causando crenação. A crenação ocorre devido à combinação de alta permeabilidade hidráulica e baixa permeabilidade iônica, o que causa perda hídrica sem perda iônica. Há, então, aumento relativo tanto da osmolaridade como da concentração (e força) iônica intracelular, o que permite o equilíbrio entre a osmolaridade intracelular com a do meio externo. Esta situação deve ser ajustada, pois a redução do volume da célula perturba seu

funcionamento e a hiperosmolaridade determinada pelo excesso de íons, principalmente o Na^+ , leva a dano no DNA e apoptose (BURG, 2002; DMITRIEVA e BURG, 2005; DMITRIEVA *et al.*, 2005). Inicia-se então uma fase denominada de regulação de aumento do volume celular (RVI), ilustrada na Figura 14, que corresponde à ativação de canais iônicos para a captação rápida de íons inorgânicos, orgânicos e de água, com retomada do volume inicial. Os transportadores iônicos ativados são o Na^+/H^+ (NHE1), internalizando Na^+ em troca de H^+ ; o NKCC1, internalizando Na^+ , 2Cl^- , e K^+ ; e canais de cátions induzidos por hipertonidade. Há indução também de transportadores de osmólitos orgânicos, sendo o principal o de $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{Taurina}$ (TauT), com transporte na proporção de 2-3:1:1 (LANG *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2009). Assim, ocorre reajuste do volume intracelular, mas à custa de maior concentração de íons inorgânicos, entre eles a de Na^+ . O excesso de Na^+ captado é em parte extruído pela $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em troca de K^+ , mantendo a força iônica intracelular à custa de altas concentrações intracelulares de K^+ (LANG, 2007).

Caso a tonicidade do meio permaneça elevada, é necessária uma adaptação crônica da célula ao meio hiperosmolar. Nesta fase os íons inorgânicos que geram a osmolaridade serão gradativamente substituídos por íons orgânicos (mio-inositol, betaína, taurina, sorbitol e glicerofosfocolina). Os íons orgânicos ou são capturados do meio ou são sintetizados pela célula. Diferentemente do que ocorre com os íons inorgânicos, a alta osmolaridade determinada por íons orgânicos não causa injúria do DNA e permite adequado funcionamento celular. O acúmulo de osmólitos orgânicos dependente de exposição prolongada a meio hiperosmolar decorre da ativação de co-transportadores $\text{Na}^+/\text{mio-inositol}$ (SMIT),

Na⁺/Cl⁻/betaina (BGT), TauT e da aldose redutase que catalisa a conversão da glicose em sorbitol.

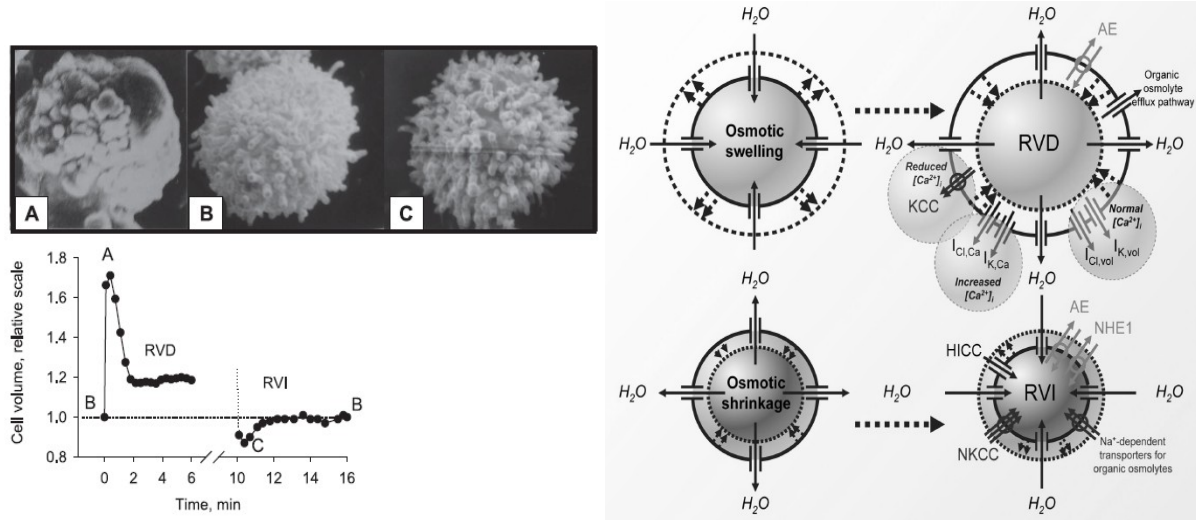


Figura 14 – Mecanismos de regulação do volume celular. RDV (*regulatory volume decrease* – redução regulatória de volume), RVI (*regulatory volume increase* – aumento regulatório de volume). No painel à esquerda observa-se a célula crenada (A) retornando ao volume normal (B). No painel à direita são representados os transportadores de membrana envolvidos na regulação do volume celular. Abreviações: AE, trocador de ânions; HICC, canais de cátion induzido por hipertonicidade; NKCC, cotransportador tríplice de sódio, potássio e cloro. (HOFFMANN *et al.*, 2009).

A síntese de várias proteínas também é estimulada pela hipertonicidade do meio. A mais importante é a proteína de choque térmico (HSP, *heat shock proteins*), ou mais especificamente a HSP70. A HSP70 protege a célula contra as elevações de Na⁺ e uréia no meio intracelular, possivelmente através de redução do estresse oxidativo (LANG *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2009).

Os dados da literatura revistos neste capítulo permitem contextualizar o trabalho proposto, como veremos no delineamento de seus objetivos.

2 JUSTIFICATIVA

O controle sobre a reabsorção de Na^+ é uma das funções mais importantes dos túbulos renais. Em epitélios transportadores de água e sal os dois principais mecanismos de transporte ativo de Na^+ contra seu gradiente de potencial eletroquímico são a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$, sensível à ouabaína, e a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, insensível à ouabaína e sensível à furosemida. Na célula tubular renal, esses mecanismos, presentes na membrana basolateral, geram e mantêm o gradiente de Na^+ que permite sua entrada passiva através da membrana luminal.

Nosso laboratório vem trabalhando há mais de 15 anos com a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, tendo formulado a hipótese de que sua função no túbulo renal seria a de promover o ajuste fino do transporte de Na^+ , enquanto o transporte de massa seria processado pela $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$. A $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foi amplamente caracterizada em células de túbulo proximal, mostrando atuar paralelamente com a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ e responder a diferentes estímulos modulatórios. Acredita-se que sua distribuição acompanhe a da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$, no entanto, ainda não foi adequadamente caracterizada nos outros segmentos tubulares.

Considerando que o ducto coletor é o segmento do néfron onde se estabelece, através de importante regulação hormonal, o ajuste final do balanço corpóreo do Na^+ , decidimos estudar nele a atividade e a função da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, tendo em vista que nestas células essa enzima pode apresentar características funcionais distintas das observadas no túbulo proximal. Ainda que tenha sido anteriormente identificada sua presença nas células da linhagem MDCK do tipo

selvagem, com características do ducto coletor (DE SOUZA *et al.*, 2007b), é importante observar que a literatura não registra nenhum estudo anterior que identifique a presença da Na⁺-ATPase em células principais e intercalares, que correspondem aos clones C7 e C11, respectivamente, da linhagem MDCK.

3 OBJETIVOS

Foi anteriormente verificado em nosso laboratório, através da determinação da atividade enzimática, a presença da Na⁺ATPase nas células MDCK do ducto coletor (DE SOUZA *et al.*, 2007b) . Esse modelo celular, todavia, não permite estudar as características próprias das células principais e intercalares, que se manifestam, respectivamente, nos sub- clones C7 e C11 dessa mesma linhagem celular.

Assim sendo, o objetivo principal deste trabalho é comparar as atividades das enzimas Na⁺-ATPase e (Na⁺+K⁺)-ATPase nas células MDCK-C7 e MDCK-C11 em situação basal e frente a variações do pH. O objetivo secundário é o de estudar a regulação da atividade da Na⁺ATPase nas células MDCK-C7 submetidas à hiperosmolaridade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Foram utilizados os clones C7 e C11 de células epiteliais derivadas de ducto coletor de rim de cachorro (MDCK) entre as passagens 74 e 90, cedidas pelo Prof. Gehrard Malnic do Instituto de Ciências Biomédicas da USP-SP. As células foram estocadas em freezer a -70°C , em soro fetal bovino adicionado de 5% de dimetil-sulfóxido (SIGMA, USA).

As células foram cultivadas em garrafas plásticas de cultura (Corning-Costar Corp., USA) em meio *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (GIBCO, USA), suplementado com penicilina e estreptomicina (GIBCO, USA) e 10% de soro fetal bovino (GIBCO, USA) e mantidas a 37°C em estufa para células (FANEM, Brasil).

A cada 48 ou 72 horas as células eram repicadas em capela de fluxo laminar classe II-A (Veco, Brasil). Após tripsinização (tripsina-EDTA, 0,5 g/L de tripsina e 0,2 g/L de EDTA•4Na, 0,20%, diluídos em PBS, GIBCO, USA) e raspagem, as células eram centrifugadas (centrífuga clínica FANEM, modelo Excelsa Baby II, Brasil), ressuspendidas em DMEM e tinham sua concentração determinada através de contagem em câmara de Neubauer (Loptik, Brasil). Após diluição apropriada, para os experimentos de medida de atividade ATPásica ou de *Western blotting*, 2 ml de células na concentração de 1×10^5 células/ml (baixa densidade, total de 2×10^5 células por poço) ou 5×10^5 células/ml (alta densidade,

total de 1×10^6 células por poço) eram semeadas em placas de seis poços. Para os experimentos de imunofluorescência, as células eram semeadas na concentração de 1×10^5 células/ml (1 ml por poço) em lamínulas de vidro colocadas em placas de 24 poços (Corning-Costar Corp., USA).

4.2 Estudo de histoquímica

A atividade de anidrase carbônica foi determinada pela técnica adaptada de coloração de Hansson, que utiliza cobalto/fosfato (HANSSON, 1967). As células foram semeadas em placas de 24 poços com densidade de 1×10^5 células/ml (1ml por poço) e incubadas por 48 horas a 37°C . Em seguida, as células eram lavadas 2 vezes com solução tampão de fosfato (PBS, NaCl 137mM; Na_2PO_4 8,1 mM; KH_2PO_4 1,5mM; KCl 2,7 mM; pH=7,4) e fixadas com formaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M por 20 min a 4°C . Após nova lavagem com PBS e posteriormente água-destilada, foi aplicado o método de Hansson, que consiste na incubação com solução de reação preparada no momento do uso (CoSO_4 1,75 mM; KH_2PO_4 11,7 mM; NaHCO_3 157 mM; H_2SO_4 53 mM). Com a finalidade de manter a capacidade de reação a solução era renovada a cada 30 segundos por um período total de 10 minutos. Após esse tratamento as células eram lavadas com água destilada, após o que era adicionado o agente revelador (sulfato de amônia a 0,5%, por 10 segundos). Após nova lavagem com água destilada a preparação era analisada em microscópio ótico, sendo revelada a presença da anidrase carbônica através de típica coloração escura, sendo o resultado final documentado por foto digital.

4.3 Estudo de imunofluorescência

Para os estudos de imunofluorescência 5×10^4 células foram semeadas em 1 ml de meio sobre lamínulas estéreis (Deckglaser, Alemanha) adicionadas a cada um dos poços das placas de cultura (24 poços). Após 24 horas as células foram fixadas e permeabilizadas com solução 1:1 de acetona-metanol. Em seguida foram lavadas com solução de PBS (NaCl 137mM; Na_2PO_4 8,1 mM; KH_2PO_4 1,5mM; KCl 2,7 mM; pH=7,4) por 3 vezes e incubadas com PBS suplementado com soro fetal bovino (SFB) 5% por 30min. Findo esse período, após remoção do PBS era adicionado o anticorpo primário monoclonal de camundongo para subunidade $\alpha 1$ (diluição de 1:50) ou anticorpo policlonal de cabra para subunidade $\beta 1$ (diluição de 1:20) da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Santa Cruz Biotechnology, USA), ambos diluídos em PBS+SFB 2%. Após 2 horas de incubação o anticorpo primário era retirado, as células eram lavadas 2 vezes com PBS+SFB 2%, e novamente incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário anti-camundongo ALEXA 488 (Invitrogen, USA) ou anticorpo secundário anti-cabra ALEXA 546 (Invitrogen, USA) (diluição de 1:600). Para a técnica da dupla marcação o procedimento era repetido com um segundo anticorpo (por exemplo, a subunidade $\beta 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$). Em alguns experimentos as células também foram incubadas por 20 minutos com *peanut agglutinin* - PNA (diluição de 1:200, Invitrogen, USA), com o objetivo de marcar as células intercalares do tipo β . Em outros experimentos, as células também foram incubadas por 30 segundos com o composto Hoeschst 33258 (diluição de 1:1000, Invitrogen, USA) para identificação dos núcleos. As lamínulas (Deckglaser, Alemanha) eram então retiradas do fundo do poço e montadas em lâminas de vidro (Deckglaser,

Alemanha) com glicerol (VETEC, Brasil), para visualização em microscópio invertido com fluorescência (Axiovert 100, Zeiss, Alemanha). O resultado final era registrado por meio de foto digital.

4.4 Marcação do ATP

O ATP radioativo ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$) foi preparado segundo o método descrito por Maia *et al.* (MAIA *et al.*, 1983) e purificado em uma micro-coluna de resina de troca aniônica (Dowex-Ag-100; 0,5 cm x 1 cm) com a finalidade de remover o fósforo radioativo ($\text{P}_i[^{32}\text{P}]$; obtido do IPEA - Instituto de Pesquisa Energética e Nuclear, São Paulo, Brasil) não incorporado. A resina era pré-lavada com água deionizada e posteriormente ativada com ácido clorídrico (HCl, SIGMA, USA) 250mM. O ATP marcado era eluído em 10 a 12 ml de HCl 250mM. Eram recolhidas amostras seqüenciais de 1 ml, armazenadas em gelo e neutralizadas pela adição de aproximadamente 100 microlitros de tampão Tris-HCl 500mM (pH9,0) e, logo após, tituladas com Tris-base para o pH 7,0. Para determinar o nível de ^{32}P contaminante (P_i não incorporado ao ATP), na alíquota recolhida era adicionado 0,5 ml de suspensão de carvão ativado (SIGMA, USA) em HCl 0,1 N (200mg/ml) a fim de adsorver o ATP. Após centrifugação durante 5 minutos em microcentrífuga (Eppendorf, USA) uma alíquota do sobrenadante era removida e aplicada sobre papel absorvente, que era então colocado dentro de frascos para medida de cintilação líquida (Packard, USA) contendo uma mistura de 1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]-benzeno-2,2-p-fenileno-bis[5-feniloxazol] (POPOP) com tolueno (SIGMA, USA). Os níveis de ^{32}P eram medidos por cintilação líquida em

aparelho Packcard Tri-carb modelo A2100TR (Illinois, EUA). Os níveis de P_i foram sempre inferiores a 2 %.

4.5 Estudo da atividade ATPásica

A atividade dos transportadores de membrana dependentes de ATPase foi determinada em homogenato de células pelo método previamente descrito (GRUBMEYER e PENEFSKY, 1981). Foram utilizadas culturas apresentando confluência, ou seja, nas quais as células ocupam no mínimo 90% do espaço da placa. As células após serem lavadas 3 vezes com PBS (NaCl 137mM; Na_2PO_4 8,1 mM; KH_2PO_4 1,5mM; KCl 2,7 mM; pH=7,4) eram raspadas da placa na presença de 1 ml de PBS, sem uso de tripsinização, e centrifugadas por 1 minuto a 8.000g em centrífuga Eppendorf. O *pellet* era então re-suspendido no tubo de reação com solução de solubilização composta de ácido deoxicólico 0,1%, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 1mM, Hepes-Tris 20mM e sacarose 250mM, sendo mantido nesse meio em ambiente resfriado por 30 minutos. Uma alíquota de 10 microlitros do homogenato, com concentração protéica final entre 0,1-0,3 mg/ml, era adicionada ao meio de reação composto de: $MgCl_2$ 4 mM, Hepes-Tris 20 mM, NaCl 120 mM, ATP-Na 4 mM e ATP[Pi^{32}] (cerca de 3.000 cpm). Após a reação se processar em banho-maria a 37°C por 10 minutos, ela era interrompida pela adição de 500 microlitros de carvão ativado com HCl 0,1N. Todos os sais utilizados nesses ensaios foram obtidos da SIGMA, USA.

As amostras eram então centrifugadas por 5 min a 1.500g em centrífuga Eppendorf e uma alíquota de 200 microlitros do sobrenadante era coletada e aplicada em papel de filtro, o qual, após secagem, era colocado em frasco

apropriado, contendo solução constituída por POPOP dissolvido em tolueno na proporção de 200 mg/L. A manipulação da solução contendo tolueno era feita em capela de exaustão (Permuton, Brasil). Esta solução permite a determinação da radiação presente na amostra proveniente do $\text{Pi}[\text{P}^{32}]$ liberado no sobrenadante pela hidrólise do ATP marcado. Este processo está baseado no fato da excitação molecular causada pela radiação produzir nessa solução a emissão de fluorescência, a qual é medida em aparelho de cintilação líquida, que permite avaliar a emissão luminosa através de fototubos de alto ganho. A atividade de cada uma das enzimas foi determinada pela diferença encontrada entre amostras semelhantes incubadas na presença e na ausência de seus inibidores específicos. A atividade ATPásica final era expressa em $\text{nmol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. A atividade da $(\text{Na}^{+}+\text{K}^{+})\text{-ATPase}$ foi determinada através da diferença das atividades encontradas em meio de reação na presença ou ausência de ouabaína 1 mM (SIGMA, USA). A atividade da $\text{Na}^{+}\text{-ATPase}$ foi determinada através da diferença das atividades encontradas na presença e ausência de furosemida 2 mM (SIGMA, USA) em meio de reação contendo ouabaína 1 mM. A furosemida (SIGMA, USA) foi diluída em DMSO e os demais compostos em água deionizada. Todos os reagentes foram pesados em balança de precisão (Bioanalítica, Brasil). Pipetas de precisão (Gilson, USA) foram utilizadas para pequenas alíquotas.

4.6 Dosagem de proteína

A concentração protéica do homogenato obtido com a lise celular foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) utilizando albumina

sérica bovina (BSA) como padrão. Foram utilizados como reagentes, Folin, duodecil sulfato de sódio (SDS) e BSA, todos adquiridos de SIGMA, USA.

4.7 Western blot

A expressão de subunidades α e β da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ nos clones C7 e C11 das células MDCK foi feita por *immunoblotting* utilizando anticorpos específicos para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ (Santa Cruz Biotechnology, USA). É importante citar que as células renais expressam somente a isoforma $\alpha 1$ da subunidade α da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. Após confluência das células na placa de cultura, o meio era aspirado e as células lavadas 3 vezes com PBS (NaCl 137mM; Na_2PO_4 8,1 mM; KH_2PO_4 1,5mM; KCl 2,7 mM; pH=7,4) em temperatura ambiente. Em seguida eram raspadas da placa e centrifugadas por 90 segundos a 8.000g. As células eram solubilizadas em solução tampão gelada contendo 1,5% de SDS, 10mM de Tris-HCl (pH 6,8), 0,6% de ditioneitol (DTT), 0,5% de mercaptoetanol e 6% de glicerol. Após aquecimento a 95°C por 2 min, as proteínas (20 μ g/poço) foram então imediatamente submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 10% e transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Toda a vidraria, cubas verticais e fonte de corrente elétrica, além dos demais componentes previamente descritos, fazem parte de kit Bio-Rad, Hercules, CA, USA. As membranas foram bloqueadas com solução apropriada contida no kit *Western Breeze* (Invitrogen, USA) e incubadas com anticorpos específicos para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ em diluição de 1:500 por 2 horas. O kit *Western Breeze* foi utilizado também para

visualizar as bandas nas membranas. A transferência foi escaneada e a densidade das bandas foi analisada pelo *software Image J*.

4.8 Protocolos de estímulo celular

4.8.1 Alteração do pH do meio

Com a finalidade de estudar o papel do pH nas atividades da Na⁺-ATPase e da (Na⁺+K⁺)-ATPase, o pH dos meios de cultura das células foi ajustado para os valores de 6,7; 7,4; ou 7,8. O pH ácido ou básico foi obtido pela adição de NaOH ou HCl ao meio de cultura original (pH 7,4). Os pHs foram medidos em pHmetro (pH300, analyser, Brasil). Antes de serem utilizados, os meios de cultura foram esterilizados por filtração. As células com densidade inicial de 2x10⁵ células/poço (baixa densidade) foram incubadas por 6 horas no meio com pH alterado, após o que foram raspadas da placa e as atividades da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase foram determinadas como descrito anteriormente.

4.8.2 Resposta ao aumento da concentração de NaCl e alteração da osmolaridade do meio de cultura

As células foram cultivadas em meios nos quais se promoveu o aumento da concentração de NaCl e da osmolaridade, obtido tanto pela adição de NaCl como de manitol de maneira aguda (1 hora) e prolongada/subaguda (24 horas). Para isso foram utilizadas solução de NaCl 1M e Manitol 0,5 M (SIGMA, USA), que eram adicionadas ao meio de cultura para se obter a osmolaridade final desejada. No experimento agudo as células eram incubadas por 1 hora após adição de 100

e 200 mM de NaCl ou de 200 e 400 mM de manitol. No ensaio de adaptação prolongada/subaguda (24 horas) foi adicionado NaCl (100 e 200 mM) ou manitol (200 e 400mM). As atividades da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ foram determinadas após esse período.

5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados das atividades ATPásicas foram registrados em planilha de Excel e transferidos ao Prisma Software, onde foram realizados os cálculos estatísticos e as representações gráficas. As comparações envolvendo dois grupos experimentais foram analisadas através do teste *t*. Quando ocorreram mais de duas variáveis foi utilizada a análise de variância com correção pós-teste de Bonferroni ou com teste de comparação múltipla de Dunnett. Os resultados das atividades dos transportadores são fornecidos em $\text{nmol Pi. mg}^{-1}.\text{min}^{-1} \pm \text{EP}$ (erro padrão).

6 RESULTADOS

6.1 Aspecto morfológico das células dos clones MDCK-C7 e MDCK-C11

As células dos clones C7 e C11 da linhagem MDCK em cultura não confluyente, quando observadas com microscopia óptica, apresentaram aspectos morfológicos distintos. As células do clone MDCK-C11 eram compactas e tinham formato cuboidal ou retangular e formavam pequenos grupos celulares com crescimento organizado e de aspecto esférico. As células do clone MDCK-C7 apresentavam expansão da membrana, o que lhes conferia um aspecto estrelado, e cresciam de modo desorganizado. No clone MDCK-C11 as junções celulares apresentavam-se como um halo branco, enquanto que no clone MDCK-C7 as junções eram indistinguíveis, como mostram as fotos apresentadas na Figura 15. Em situação de confluência, todavia, tornava-se difícil diferenciar morfológicamente os dois tipos celulares (dados não mostrados).

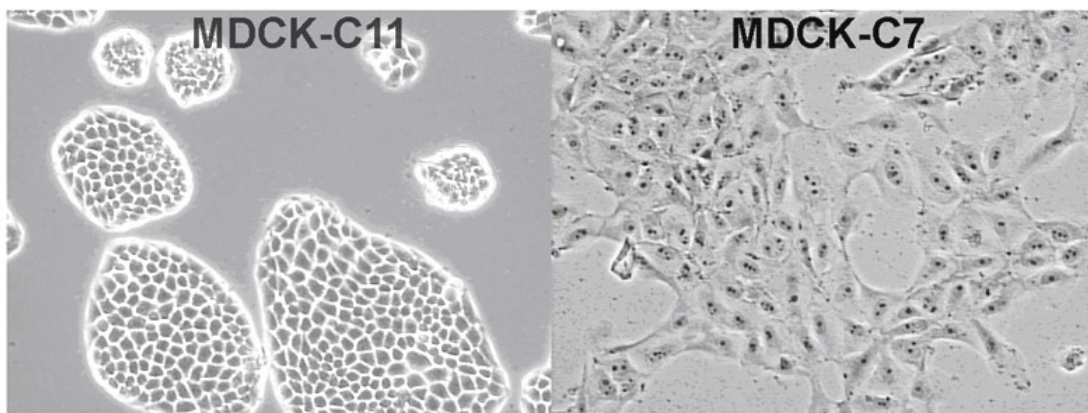


Figura 15: Células MDCK-C11 e MDCK-C7 semeadas com baixa densidade (1×10^5 células/ml) em placa de cultura com poços de 1 ml, sobre lamínulas de vidro. Após 24 horas de incubação as células foram visualizadas em microscopia óptica.

6.2 Heterogeneidade celular da cultura do sub-clone MDCK-C11

Com a finalidade de verificar a ocorrência de heterogeneidade na cultura de células MDCK-C11 semeadas em baixa densidade, o aspecto morfológico do crescimento da cultura foi atentamente acompanhado, o que permitiu verificar mudança no aspecto das células. Em alguns grupamentos celulares o aspecto inicial, de célula cuboidal pequena, agrupada em formas esféricas, dava origem a células largas, mais fusiformes, que cresciam de maneira mais desorganizada (Figura 16 A a D). Em algumas dessas novas células era possível notar que a junção intercelular deixava de aparecer como um halo branco, e passava a ser menos perceptível (Figura 16B), indicando possível diferenciação do fenótipo celular, o que levaria à heterogeneidade da cultura de MDCK-C11. Para verificar essa hipótese utilizamos marcadores celulares específicos.

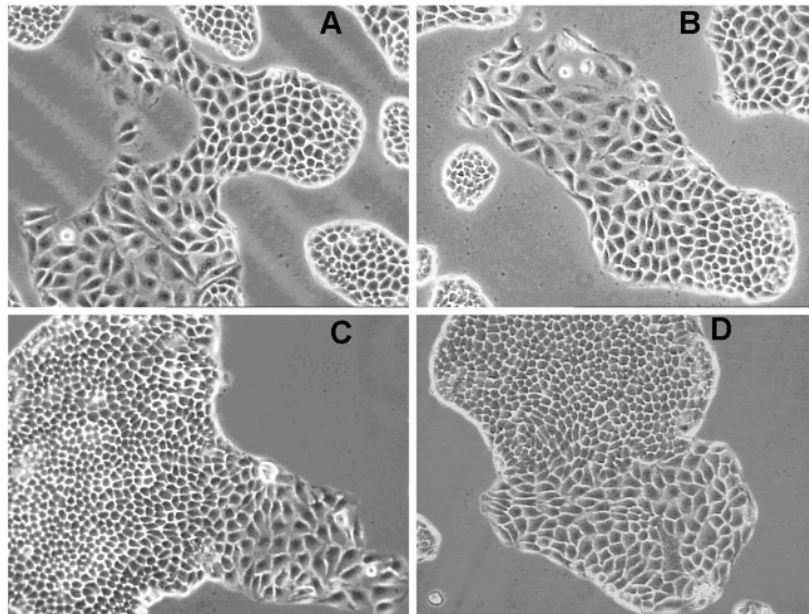


Figura 16 – Células MDCK-C11 em cultura após 24 horas. As células MDCK-C11 foram semeadas com densidade inicial de 1×10^5 células/ml em placa de cultura com poços de 1 ml, sobre lamínulas de vidro, cultivadas por 24 horas em lamínulas de vidro. Percebe-se brotamento de células com morfologia distinta à das células da colônia inicial (n=3).

Inicialmente, exploramos a possibilidade de ocorrer heterogeneidade do clone MDCK-C11 usando a técnica de Hansson, que permite identificar as células que expressam anidrase carbônica no citoplasma. Nessa técnica, enquanto essas células ficam coradas em tom escuro, as células com ausência de anidrase carbônica mantêm a coloração padrão. As células do clone MDCK-C7, com características semelhantes às da célula principal, não apresentariam anidrase carbônica, enquanto que as células do clone MDCK-C11, por se assemelharem funcionalmente à célula intercalar, deveriam expressar anidrase carbônica e serem marcadas, portanto, em tom escuro. Com o uso da técnica de Hansson observamos que as células do clone MDCK-C7 não eram tingidas, mantendo o citoplasma a coloração clara característica da ausência de anidrase carbônica (Figura 17 A-B). Já na cultura do clone MDCK-C11, notamos que algumas, mas não todas as células, apresentavam citoplasma escurecido, típico da presença de anidrase carbônica (Figura 17 C-D).

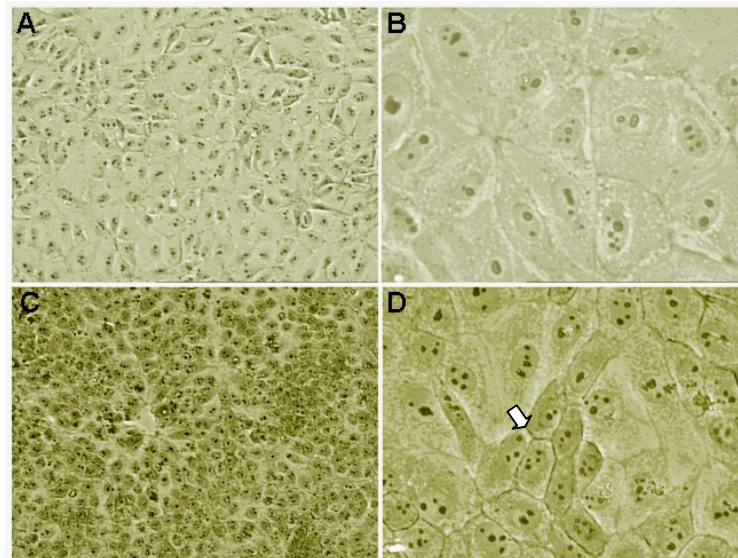


Figura 17 - Clones MDCK-C7 (A-B) e MDCK-C11 (C-D) visualizados pela técnica de coloração de Hansson para identificação da anidrase carbônica. À direita fotos com maior aumento. Células em A e B com coloração uniforme. Células em C com citoplasma escurecido em sua grande maioria. Em D (maior aumento) percebe-se grupo de células no bordo inferior esquerdo e ao centro com citoplasma escurecido circundado de células com citoplasma pouco corado (seta). n=3. Células foram cultivadas em 1×10^5 células/poço (placa de 24 poços) e mantidas por 48 horas.

Tal achado indica a existência dos dois tipos celulares, com presença e ausência de anidrase carbônica, evidenciando a ocorrência de heterogeneidade celular na cultura de células MDCK-C11.

A aglutinina de amendoim (PNA, *peanut lectin agglutinin*) é um marcador da lectina que se encontra conjugada a carboidratos (glicoproteína) presentes na membrana celular. A PNA é um marcador específico da célula intercalar do tipo β , e é utilizado conjugado a uma fluoresceína (PNA-FITC) para identificação dessas células através de microscopia de fluorescência (LEHIR *et al.*, 1982; FEJES-TOTH e NARAY-FEJES-TOTH, 1993; KLOTH *et al.*, 1993; GEKLE *et al.*, 1994). Ao marcar a membrana celular das células intercalares do tipo β , permite diferenciá-las das células principais ou intercalares do tipo α . Como é mostrado na Figura 18-A, em nossos experimentos as células MDCK-C7 não foram marcadas pelo PNA. Por outro lado, como é mostrado na figura 18-B, as células MDCK-C11 com morfologia tipicamente encontrada em semeadura com baixa densidade foram coradas de maneira homogênea e intensa. No entanto, quando as células começam a se multiplicar, como demonstrado anteriormente na Figura 16, um grupo de células passam a ter fraca ou nenhuma marcação para PNA (Figura 18-C e 18-D). Este achado sugere que perda da expressão do marcador de superfície da célula intercalar β , podendo significar mudança de fenótipo de algumas células resultante da multiplicação celular.

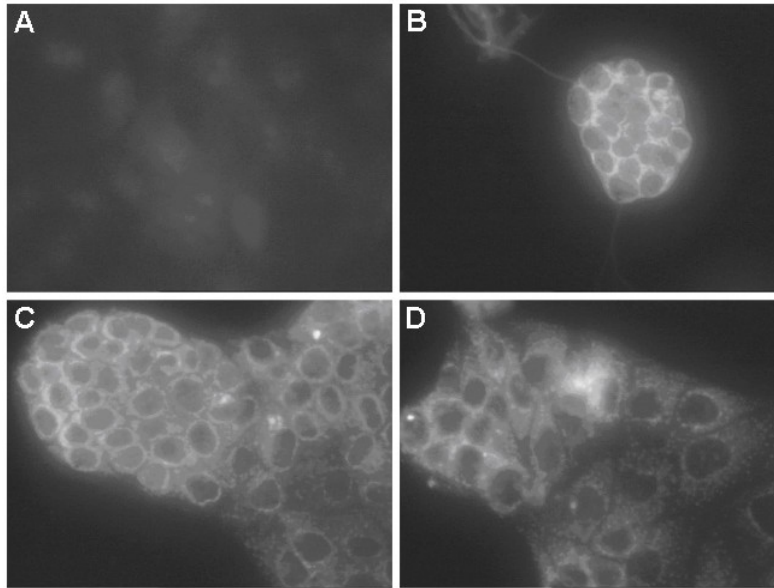


Figura 18 – Células MDCK-C7 (A) e MDCK-C11 (B-D) marcadas com PNA, identificadas por imunofluorescência. Não há marcação da MDCK-C7. MDCK-C11 é intensamente marcada com PNA (B), no entanto algumas células são fracamente marcadas ou há somente marcação do citoplasma de maneira difusa, sem marcar a membrana (C-D, setas). $n=3$. Células semeadas com 5×10^4 células/poço em placa de 24 poços, incubadas por 24 horas.

Com a finalidade de melhor caracterizar os tipos celulares presentes nas culturas utilizamos a marcação para aquaporina 2 (AQP-2), proteína tipicamente expressa nas células principais, sendo sua intensidade na membrana apical dependente da ação do hormônio antidiurético. Como era de se esperar, verificamos que as células MDCK-C7 foram marcadas com o anticorpo para AQP-2. No entanto, algumas células da cultura de MDCK-C11 aparentemente também foram marcadas com o anticorpo contra aquaporina do tipo 2 (dados não mostrados), indicando a presença de células com características típicas das principais, evidenciando que o sub-clone MDCK-C11 se torna heterogêneo durante o crescimento celular.

6.3 Caracterização das atividades basais da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase em células dos clones MDCK C7 e C11

Os dois subtipos das células MDCK foram semeados em densidades baixa (1x10⁵ células/ml) e alta (5x10⁵ células/ml) em placas de seis poços com 2 ml cada. Após 24 ou 72 horas de crescimento em meio de cultura, foram medidas as atividades basais da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4 (apêndice - A) e na Figura 19. Em baixa densidade, após 24 ou 72 horas de cultura, a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase determinada no sub-clone C11 era significativamente menor quando comparada à atividade da Na⁺-ATPase.

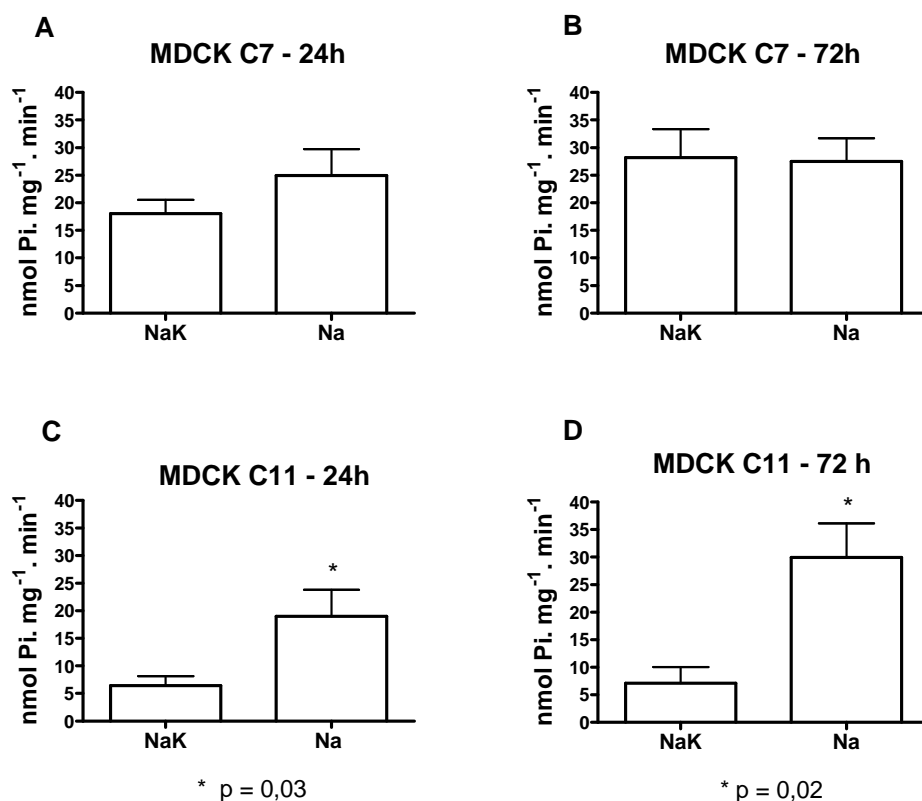


Figura 19 - Comparação da atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase nas células MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram semeadas com densidade de 1x10⁵ células/ml em placas de seis poços com 2 ml, incubadas por 24 ou 72 horas. As atividades da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. * diferença estatisticamente significante em relação ao controle, n=6.

Ao comparar a atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ entre células MDCK-C7 e MDCK-C11 ela foi sempre significativamente menor no clone MDCK-C11, como ilustram a Tabela 5 (apêndice - A) e a Figura 20.

Portanto, em baixa densidade de cultivo, a atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ é menor nas células intercalares MDCK-C11 em comparação com as células principais MDCK-C7 e não muda com o tempo de cultivo. Já no clone MDCK-C7, a atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ aumenta com o tempo de incubação. Além disso, a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ é significativamente maior do que a da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ em células do clone MDCK-C11, e essa diferença aumenta com o tempo de cultivo, diferentemente do que ocorre com as células do clone MDCK-C7, em que as atividades basais da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ são semelhantes.

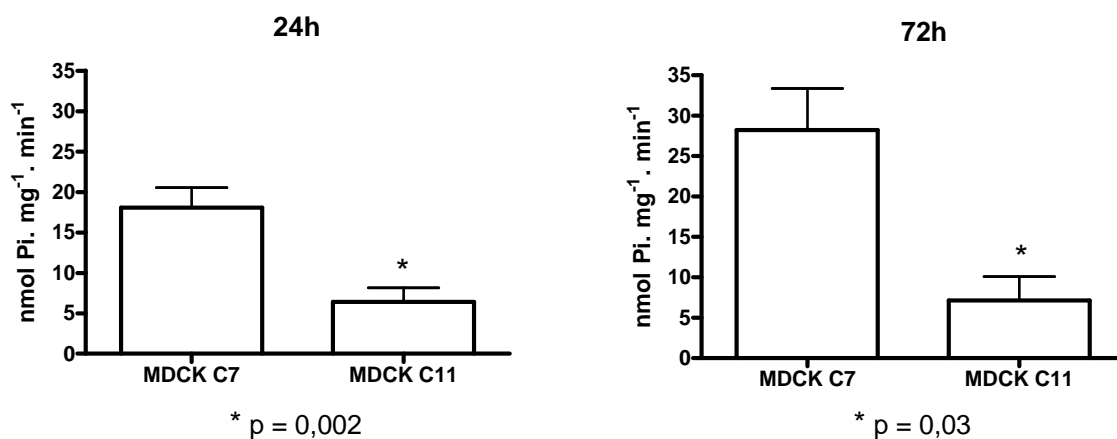


Figura 20 - Atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ nos clones das células MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram semeadas com baixa densidade (1×10^5 células/ml) em placas de seis poços com 2 ml, incubadas por 24 ou 72 horas. A atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ foi determinada como descrito em Materiais e Métodos. * diferença estatisticamente significativa em relação aos dados obtidos nas células do clone MDCK-C7, n=6.

Com o objetivo de obter rápida confluência e facilitar o uso experimental, as células do clone MDCK-C11 foram inicialmente semeadas com alta densidade (1×10^6 células por poço) por 24 horas, o que levou à observação de um padrão diferente da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Como mostram os dados apresentados na Figura 21-A e Tabela 6 (apêndice - A), em alta densidade de cultivo a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em células MDCK-C11 após 24 horas de cultura era semelhante à observada em células do clone MDCK-C7, diferente do observado em culturas de baixa densidade. No entanto, como pode ser observado na Figura 21-A e 21-B e na Tabela 6 (apêndice - A), as células do clone C11 mantêm o padrão da atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ maior que o da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, indicando que a densidade do cultivo influencia a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$.

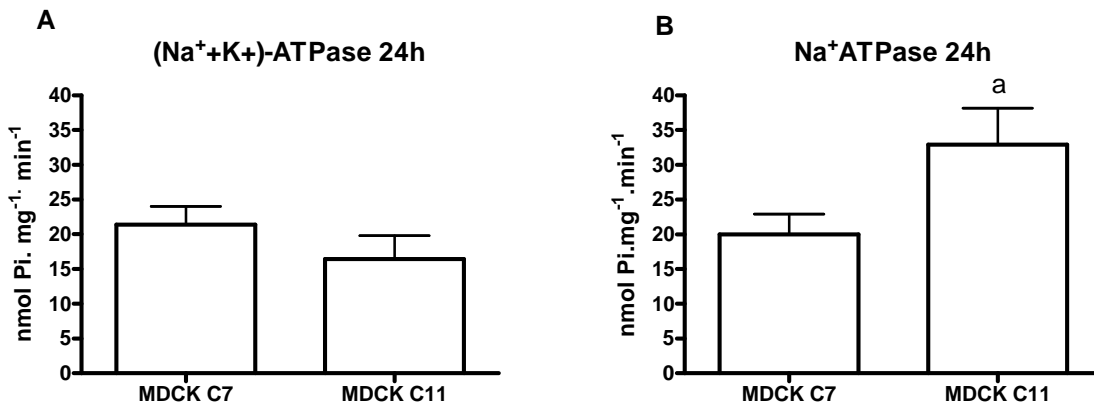


Figura 21 - Atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em clones MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram semeadas com alta densidade (1×10^6 células) em placa de seis poços de 2 ml e cultivadas por 24 horas. A atividade das ATPases foram medidas como descrito em Materiais e Métodos. a = diferença estatisticamente significativa em relação aos dados obtidos nas células do clone MDCK-C7, n=8.

6.4 Estudos sobre a baixa atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase no sub-clone MDCK-C11

6.4.1 Expressão protéica de subunidades α e β nas células dos sub- clones MDCK-C7 e MDCK-C11

Para investigar a razão da baixa atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase observada nas células MDCK-C11, foi primeiramente avaliada a expressão protéica das subunidades α 1 e β 1 da (Na⁺+K⁺)-ATPase por *immunoblotting* em homogenato de célula. Observamos que o homogenato de células MDCK-C7 apresentava intensa expressão das subunidades α e β , enquanto o homogenato de células MDCK-C11 mostrava fraca intensidade de marcação, referente à expressão de proteína α 1, e uma banda marcante, comparável à da célula MDCK-C7, para a proteína β 1 (Figura 22). A reduzida expressão da subunidade α 1 é coerente com a baixa atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase medida pela hidrólise do ATP.

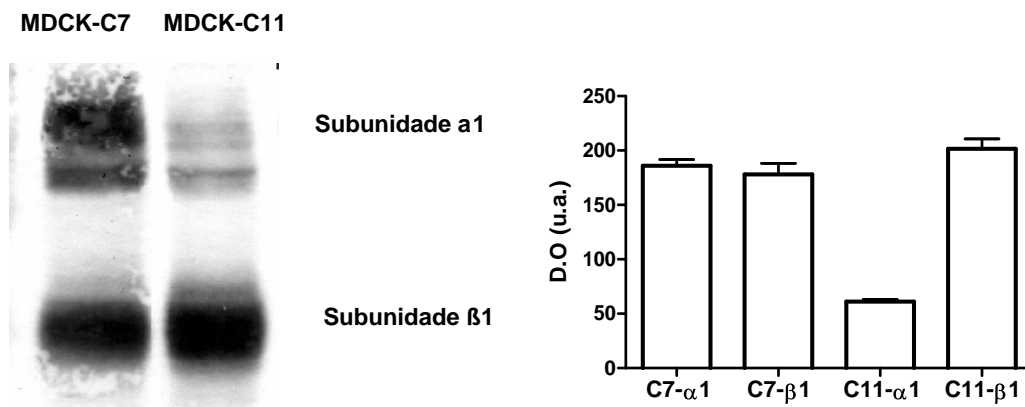


Figura 22 - Expressão de subunidades α 1 e β 1 da (Na⁺+K⁺)-ATPase em homogenato de células MDCK-C11 e MDCK-C7 determinada através de *immunoblot*. As bandas dos homogenatos obtidos de células inteiras foram marcadas com anticorpos específicos para as subunidades α 1 e β 1 da (Na⁺+K⁺)-ATPase, como descrito em Material e Métodos. A figura é representativa dos *immunoblot* de três experimentos distintos. O gráfico representa a média da densidade ótica das bandas dos três experimentos. Utilizamos uma proteína como controle da outra. As células foram semeadas em baixa densidade para obtenção do homogeneizado.

Duas possibilidades podem ser aventadas para explicar a baixa expressão protéica da subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em células do clone MDCK-C11: ou poucas células expressam a proteína ou todas as células apresentam, homogeneamente, baixa expressão da proteína. Nas duas hipóteses seria baixa a atividade mensurável da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, reflexo da baixa quantidade de proteína existente no homogenato celular.

6.4.2 Determinação por imunofluorescência da presença das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas células principal e intercalar

Diante dos dados obtidos no *immunoblot* procurou-se esclarecer se as células do clone MDCK-C11 apresentam homogeneamente uma baixa expressão da proteína ou se co-existem células que expressam e outras que não expressam a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Com essa finalidade a técnica de imunocitoquímica foi utilizada para determinar a presença das subunidades α e β da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nos clones de células MDCK, empregando anticorpos específicos anti- $\alpha 1$ e anti- $\beta 1$. Para a marcação nuclear e melhor definição celular foi utilizado o composto Hoestch 33258. Com o uso do anticorpo anti- $\alpha 1$ verificou-se marcação da membrana em todas as células MDCK-C7 (Figura 23 A-C). Nas células MDCK-C11, por outro lado, houve intensa marcação em poucas células, fraca marcação na maioria, e em algumas não houve nenhuma expressão desta subunidade (figura 23 D-F). A reduzida ou ausente expressão da subunidade α na maioria das células está de acordo com uma atividade reduzida da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ no clone C11.

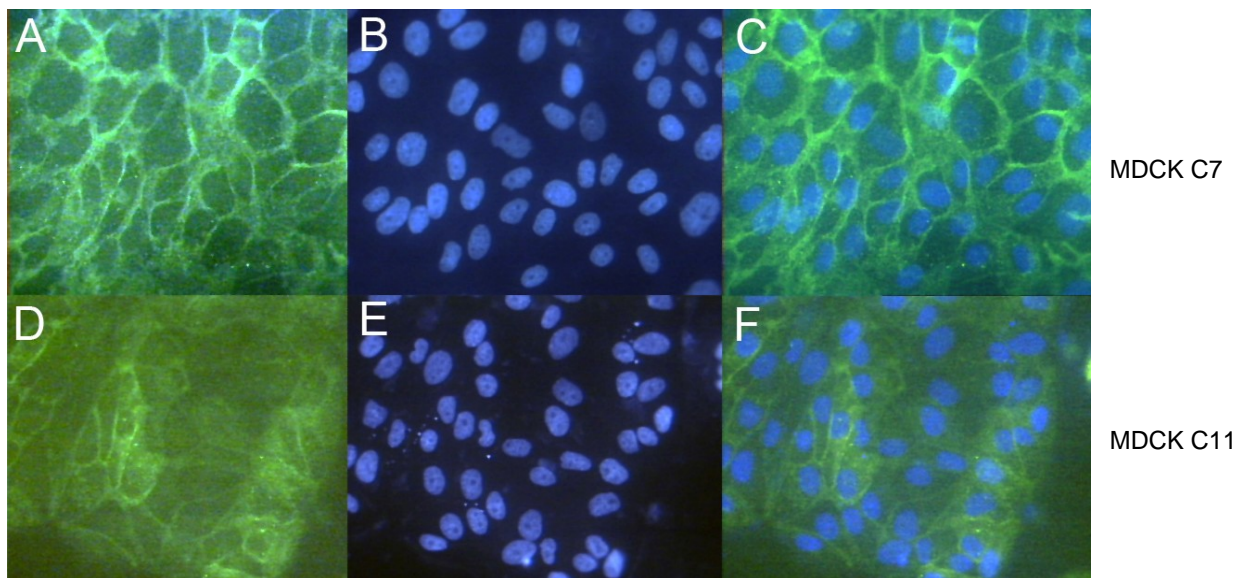


Figura 23 - Expressão da subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase em clones de células MDCK (C7 e C11) visualizada por imunofluorescência. As células foram cultivadas em lamínulas de vidro e posteriormente incubadas com anticorpo específico para subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, como descrito em Materiais e Métodos. Os painéis superiores (A-C) correspondem às células MDCK-C7 e os painéis inferiores (D-F) às células MDCK-C11. Os painéis à esquerda (A e D) se referem às células marcadas com anticorpo contra a subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. Os painéis centrais (B e E) mostram as mesmas células marcadas com Hoechst 33258, corante fluorescente para o núcleo. Os painéis à direita (C e F) apresentam as imagens combinadas. As figuras são representativas de três experimentos. Culturas semeadas com 5×10^4 células por poço (placa de 24 poços) incubadas por 24 horas. Ampliação de 400 vezes.

Para confirmar a ocorrência de expressão aumentada da subunidade β nas células do clone MDCK-C11 em relação à baixa expressão da subunidade α , comparou-se a marcação da subunidade $\alpha 1$ (Figura 24 - A,C,G,E,I, a esquerda) com a da subunidade $\beta 1$ (Figura 24 – B,D,F,H,J, a direita) da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase.

Foi assim verificado que: 1) nem todas as células MDCK-C11 são marcadas para a subunidade α ; 2) algumas células co-expressam as subunidades α e β , e 3) outras células são claramente marcadas para a subunidade β e não para α .

De maneira geral, em todas as fotos a marcação observada para a subunidade β foi bem mais intensa do que a marcação para a subunidade α , o que é perfeitamente coerente com o achado do *immunoblot*, na figura 22.

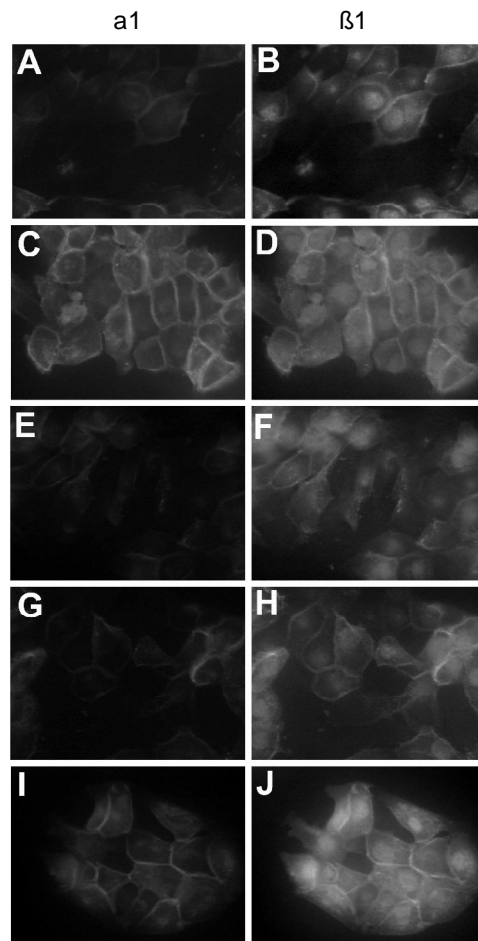


Figura 24 - Expressão das subunidades α 1 e β 1 da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$ em células MDCK-C11, visualizadas por imunofluorescência. As células cresceram em lâminas de vidro e foram incubadas sequencialmente com anticorpos para as subunidades α 1 e β 1 da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$, como descrito em Materiais e Métodos. As fotomicrografias à esquerda (A,C,E,G,I) mostram as células marcadas com anticorpo para a subunidade α 1 da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. As fotomicrografias à direita (B,D,F,H,J) mostram a mesma célula marcada com anticorpo para a subunidade β 1 da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPase}$. As figuras são representativas de três experimentos. Cultura semeada com 5×10^4 células por poço (placa de 24 poços) por 24 h. Ampliação de 400 vezes.

6.4.3 Caracterização do subtipo celular do clone MDCK-C11 com expressão $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{-ATPásica}$

Nas culturas das células MDCK-C11 podem co-existir dois tipos de células intercalares, α e β . Como citado anteriormente, PNA é um marcador específico para a célula intercalar do tipo β . Com a finalidade de identificar qual é o subtipo de célula intercalar presente no clone MDCK-C11 que expressa a subunidade α 1,

que confere a capacidade ATPásica da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$, utilizamos a dupla marcação para a subunidade $\alpha 1$ e PNA. Assim verificamos que a maioria das células marcadas com o anticorpo para a subunidade α também o foi para a PNA, sugerindo fortemente que a célula intercalar que apresenta atividade $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPásica}$ é a do tipo β (Figura 25). Todavia, também poderia se tratar de uma célula com fenótipo misto ou intermediário, como as já descritas células do tipo não α não β (WALL, 2005).

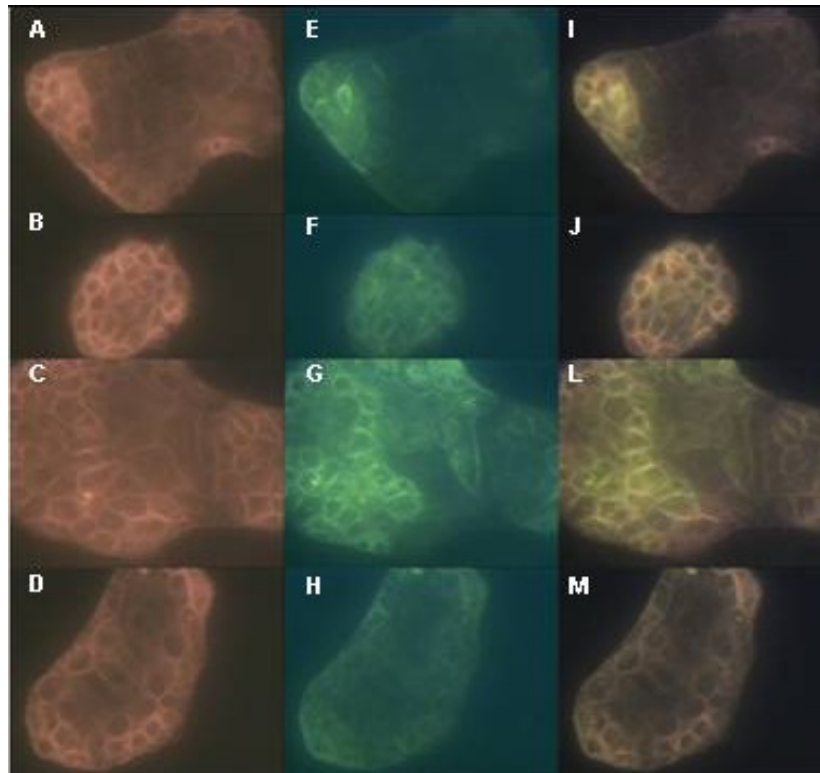


Figura 25 – Co-expressão da subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ e aglutinina de amendoim (PNA) em células MDCK-C11, visualizadas por imunofluorescência. As células cresceram em lamínulas de vidro e foram incubadas com anticorpo para subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ e PNA, como descrito em Materiais e Métodos. Os painéis à esquerda (A-D) mostram as células marcadas com o anticorpo para a subunidade $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$. Os painéis centrais (E-H) apresentam as mesmas células marcadas com PNA. Nos painéis à direita (I-J) são apresentadas as imagens combinadas. As figuras são representativas de três experimentos independentes. Cultura semeada com 5×10^4 células por poço (placa de 24 poços) por 24 h. Ampliação de 400 vezes.

6.5 Modulação da atividade das ATPases de sódio em células MDCK-C7 e MDCK-C11

6.5.1 Modulação da atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase das células MDCK-C7 e MDCK-C11 pelo pH do meio de cultura

As células principais e intercalares localizam-se nos segmentos do néfron onde ocorrem os processos finais do equilíbrio ácido-básico, razão pela qual o pH do fluido tubular varia aproximadamente entre 5,5 e 7,8. De fato, as células intercalares do ducto coletor são as responsáveis por esse ajuste final do pH urinário. As células intercalares α são secretoras de H⁺ e reabsorvem HCO₃⁻, enquanto que as células β são secretoras de HCO₃⁻ e reabsorvem H⁺. Considerando que a atividade tanto da (Na⁺+K⁺)-ATPase como da Na⁺-ATPase são sabidamente dependentes do pH do meio e, por outro lado, o pH ótimo para cada uma delas é diferente, como visto anteriormente na Tabela 3, estudamos, nos sub- clones das células MDCK, o efeito da mudança do pH do meio de cultura sobre a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase.

Células intactas cultivadas por 24 horas em baixa densidade foram incubadas por 6 horas com DMEM com pHs ajustados para 6,7; 7,4 e 7,8, após o que foram determinadas as atividades da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase. Os dados obtidos, apresentados na Tabela 7 e na Figura 26, mostram que a exposição a diferentes pHs não promoveu alteração estatisticamente significativa da atividade dessas enzimas nas células do clone MDCK-C7. No entanto, ainda que sem ser estatisticamente significativa, a diferença entre as atividades das duas ATPases nas células incubadas em pH 7,8 foi maior que a determinada no pH fisiológico de 7,4.

Nas células MDCK-C11 a atividade da Na⁺-ATPase aumentou significativamente com a exposição a meio alcalino (pH 7,8) quando comparada com os valores medidos em meio com pH fisiológico (pH 7,4). Em relação à (Na⁺+K⁺)-ATPase, não foi verificada variação significativa de sua atividade frente à variação do pH do meio de incubação, tendo sido mantido o padrão de maior atividade de Na⁺-ATPase comparado à da (Na⁺+K⁺)-ATPase em todos os pHs. Os dados obtidos, demonstrados na figura 26 e tabela 7 (apêndice - A), indicam que nas células MDCK-C11 a atividade da Na⁺-ATPase é bastante estimulada em meio alcalino.

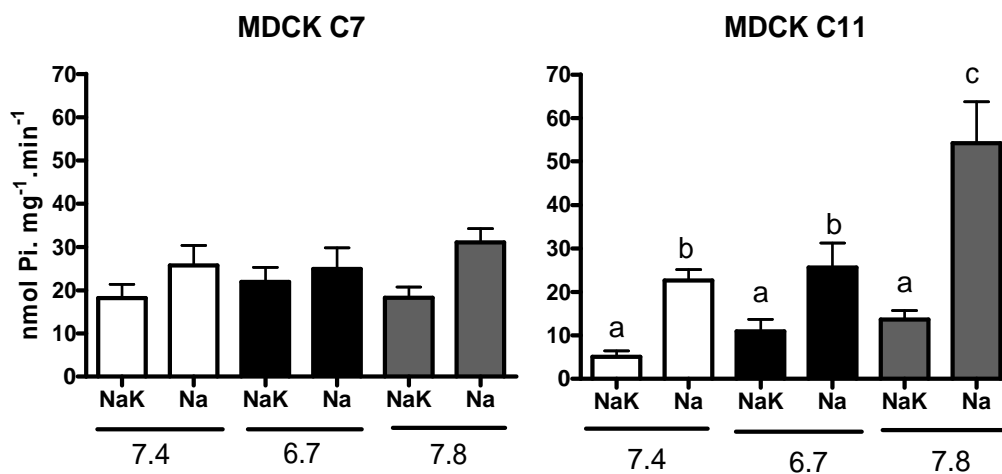


Figura 26 – Efeito da variação do pH sobre a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase em células MDCK-C7 e MDCK-C11. As células foram cultivadas por 24 horas e então expostas durante 6 horas a meios com diferentes pHs (7,4; 6,7 e 7,8), após o que as atividades da (Na⁺+K⁺)-ATPase e da Na⁺-ATPase foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Culturas semeadas com 2x10⁵ células por poço (placa de 6 poços). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA e correção pós-teste com Bonferroni, p<0,05). O total de experimento com células MDCK-C7 foi de 9 para a determinação da Na⁺-ATPase e 10 para a (Na⁺+K⁺)-ATPase. Foram realizados 6 experimentos com células MDCK-C11 para a determinação da Na⁺-ATPase e da (Na⁺+K⁺)-ATPase.

6.5.2 Efeito da adição de NaCl e manitol ao meio de cultura sobre a atividade da Na⁺-ATPase e da (Na⁺+K⁺)-ATPase em células do clone MDCK-C7

A presença de uma segunda bomba de sódio, a Na⁺-ATPase, nas células do clone MDCK-C7, modelo experimental das células principais, ainda não havia

sido estudada, não havendo, portanto, informações sobre seu possível papel fisiológico nesta estrutura. Diferentemente do que ocorre na célula do túbulo proximal, nas células MDCK-C7 a atividade da Na^+ -ATPase em condições basais é comparável à da (Na^++K^+) -ATPase. Considerando que as células principais estão altamente envolvidas no ajuste do balanço corpóreo do sódio, sendo responsivas a diferentes estímulos que regulam a capacidade reabsortiva desse íon, é possível que a atividade da Na^+ -ATPase seja modulada à semelhança do que ocorre com a (Na^++K^+) -ATPase. Para avaliar esta hipótese expusemos as células do clone MDCK-C7 ao aumento da osmolaridade por adição de NaCl e manitol, tendo sido comparado o padrão de resposta da Na^+ -ATPase com o da (Na^++K^+) -ATPase.

6.5.3 Efeito do aumento da osmolaridade do meio de cultura induzido pela adição de NaCl sobre a atividade da Na^+ -ATPase e da (Na^++K^+) -ATPase

Com a finalidade de verificar o efeito da hiperosmolaridade induzida pela adição de NaCl nas atividades da Na^+ -ATPase e da (Na^++K^+) -ATPase, foram utilizadas células intactas do clone MDCK-C7 tendo em vista que nas células intactas ficam preservados tanto os mecanismos de síntese e de acoplamento das proteínas à membrana como os mecanismos regulatórios da atividade dos diferentes transportadores necessários para a homeostase do meio intracelular.

A atividade da Na^+ -ATPase foi comparada à da (Na^++K^+) -ATPase, que foi tomada como padrão conhecido de resposta da célula ao estímulo aplicado.

Inicialmente foi analisada a resposta da Na^+ -ATPase e da (Na^++K^+) -ATPase frente a variações da hiperosmolaridade induzida por adição de concentrações crescentes de NaCl ao meio de cultura. Em células cultivadas por

24 horas (densidade inicial de 1×10^6 células por poço) foram adicionados 100 ou 200 mM de NaCl ao meio de cultura e, após 1 ou 24 horas de incubação, foram determinadas as atividades das duas enzimas.

Como mostram os dados apresentados na Figura 27, com o incremento da osmolaridade causado pela adição de NaCl ao meio houve aumento significativo da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$, o que não ocorreu com a atividade da $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$. Foi verificada morte celular após 24 horas de incubação com meio suplementado com 200 mM de NaCl. Por isso, não foi possível medir a atividade desta enzima nessa condição.

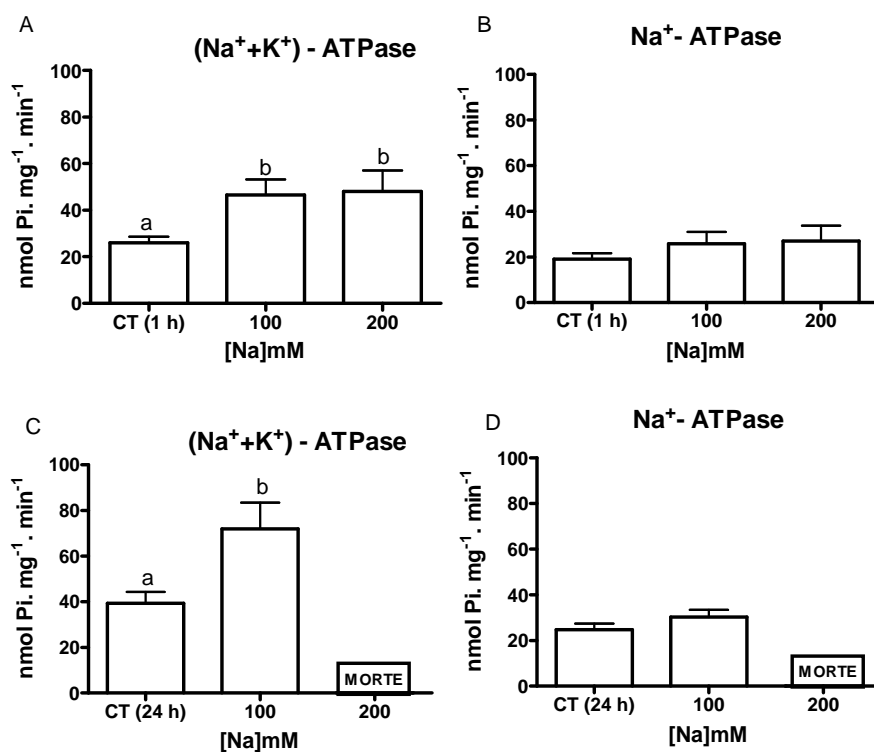


Figura 27 – Efeito da adição de NaCl ao meio de cultura sobre a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$ em células do clone MDCK-C7. Culturas semeadas com 1×10^6 células por poço (placas de seis poços), incubadas por 24 horas. Após a adição de 100 ou 200 mM de NaCl ao meio de cultura e incubação por 1 hora (A-B) ou por 24 horas (C-D) as atividades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$ foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. (teste t ou ANOVA com múltipla comparação por Dunnett, $p < 0,05$) $n=7$ e $n=5$ para $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ em 1 e 24 horas, respectivamente. $n=9$ e $n=10$ para a $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$ em 1 e 24 horas, respectivamente.

Os resultados obtidos, indicados na Figura 27, mostram que o aumento da osmolaridade causado pelo acréscimo de NaCl leva ao aumento da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas células intactas do clone MDCK-C7 enquanto que a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ permanece inalterada.

6.5.4 Efeito do aumento da osmolaridade do meio de cultura induzido pela adição de manitol sobre a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$

O manitol, ao contrário do sódio, não é substrato enzimático para as enzimas em estudo, não altera a força iônica do meio, não ativa diretamente a enzima e não é permeável pela membrana celular. Por essa razão, foi investigado o efeito da hiperosmolaridade induzida pela adição manitol nas atividades da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Para tanto foram usados os mesmos protocolos utilizados nos experimentais descritos anteriormente.

Para tanto células intactas foram submetidas a diferentes graus de hiperosmolaridade do meio de cultura obtidos pela adição de 200 mM e 400 mM de manitol, o que corresponde aos aumentos da osmolaridade do meio obtidos com a adição 100 mM e 200 mM de NaCl. As células foram incubadas por 1 ou 24 horas antes de serem determinadas as atividades ATPásicas estudadas.

Como pode ser visto na Figura 28, a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ nas células intactas incubadas em meios hiperosmóticos pela adição de manitol aumentam tanto após 1 hora de exposição (3x em relação ao controle) quanto após 24 horas (50% em relação ao controle). No entanto, a adição ao meio de 400 mM de manitol se mostrou letal após 24 horas, o que impossibilitou a medida das atividades ATPásicas. Com o uso das duas concentrações de manitol não foi observado aumento significativo da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em nenhum momento.

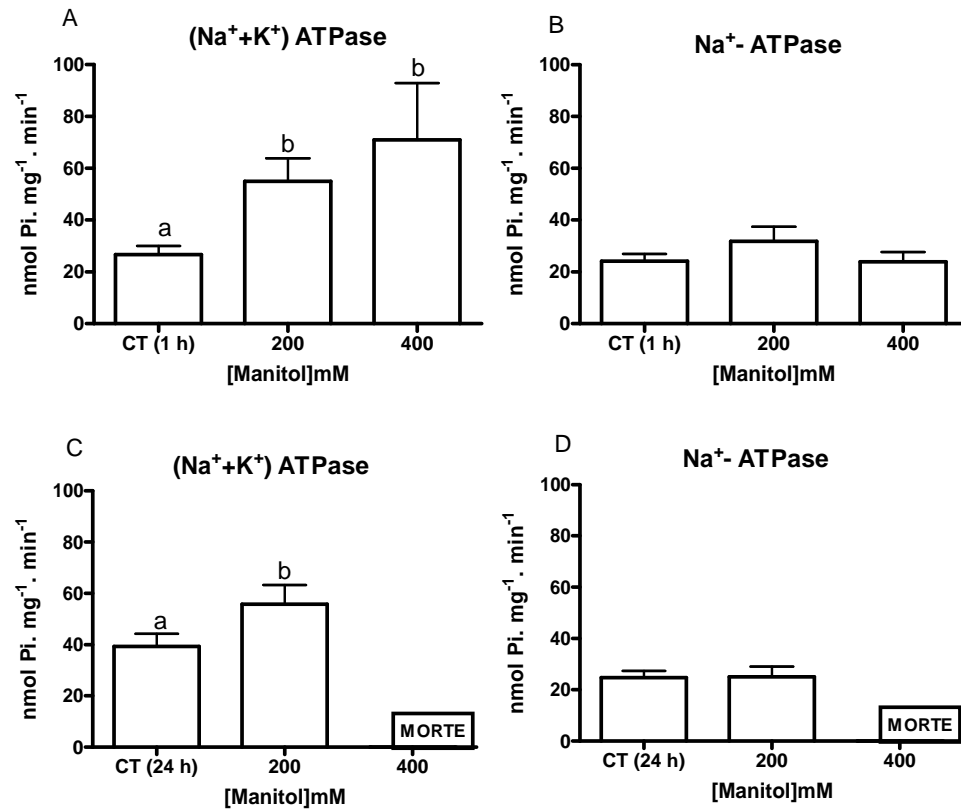


Figura 28 – Efeito da adição de manitol ao meio de cultura sobre a atividade da $(Na^+ + K^+)$ -ATPase e da Na^+ -ATPase nas células MDCK-C7. Culturas semeadas com 1×10^6 células por poço (placas de seis poços) incubadas previamente por 24 horas, após o que foi adicionado ao meio de cultura 200 ou 400 mM de manitol e novamente incubadas por 1 hora (A-B) ou de 24 horas (C-D). As atividades da $(Na^+ + K^+)$ -ATPase e da Na^+ -ATPase foram medidas como descrito em Materiais e Métodos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (teste t ou ANOVA e com múltipla comparação por Dunnett, $p < 0,05$). $n=6$ e $n=5$ para $(Na^+ + K^+)$ -ATPase em 1 e 24 horas respectivamente. $n=8$ e $n=10$ para Na^+ -ATPase em 1 e 24 horas, respectivamente.

7 DISCUSSÃO

Na sua grande maioria, a literatura científica abordando a atividade da Na⁺-ATPase insensível à ouabaína e sensível à furosemida se refere às observações realizadas no túbulo proximal. Os únicos dados disponíveis sobre sua atividade e regulação no ducto coletor foram obtidos em nosso laboratório (DE SOUZA *et al.*, 2007b).

O presente estudo é o primeiro em que foi descrita a atividade de Na⁺-ATPase nos clones MDCK-C7 e MDCK-C11 que, devido às semelhanças funcionais que apresentam com as células principais e intercalares do ducto coletor, respectivamente, são modelos experimentais utilizados para estudá-las. Os dados obtidos mostraram que a atividade basal da Na⁺-ATPase é semelhante nos dois clones. No entanto, foi observado que a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase se apresenta menor no clone C11 quando comparada com a observada no clone C7.

De Sousa e colaboradores haviam descrito anteriormente a atividade da Na⁺-ATPase em homogenato total e em fração microsomal de células MDCK do tipo I. A atividade basal da Na⁺-ATPase foi de 4,5±0,6 e 21,0±2,8 nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ em homogenato e fração microsomal, respectivamente. A atividade basal da (Na⁺+K⁺)-ATPase foi de 8,6±0,7 e 34,4±4,8 nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ em homogenato e fração microsomal, respectivamente. (DE SOUZA *et al.*, 2007b)

Em células do clone MDCK-C7 obtidas de culturas semeadas com densidade inicial de 1x10⁶ células por poço e incubadas por 24 horas, verificamos

atividades de $20,0 \pm 2,9$ e $21,4 \pm 2,6$ $\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para a Na^+ -ATPase e para a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, respectivamente (Figura 21). Quando semeadas com baixa densidade inicial (2×10^5 células por poço), os resultados obtidos foram semelhantes entre si, como mostram os valores das atividades enzimáticas obtidos de $25,0 \pm 4,8$ e $18,1 \pm 2,4$ $\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para a Na^+ -ATPase e para a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase ($p=0,2$), respectivamente (Figura 19A).

Comparados aos resultados obtidos por De Souza e colaboradores, os valores verificados neste estudo foram próximos aos obtidos na fração microsomal e bem mais elevados que os referidos para a fração de homogenato de células MDCK I. Deve ser notado, no entanto, que nesses estudos foram utilizados procedimentos experimentais diferentes para o preparo do homogenato. No presente trabalho a lise celular foi causada por deoxicolato, enquanto que De Souza e colaboradores utilizaram fragmentação mecânica. Dados anteriores mostraram que as atividades da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase são maiores em material obtido através de lise com saponinas do que as observadas com o uso de congelamento e descongelamento (FERAILLE *et al.*, 2003). Isto se deve ao fato da saponina lisar também as vesículas citoplasmáticas, que atuam como reservatório da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, aumentando assim o número de enzimas expostas ao estímulo e, portanto, ativáveis ao contacto com o sódio (VINCIGUERRA *et al.*, 2005). Esta manobra, portanto, levaria à determinação de uma maior atividade enzimática.

Em outro trabalho de nosso laboratório foi utilizado o deoxicolato na preparação do homogenato de células MDCK provenientes do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LARA *et al.*, 2005). A atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase então determinada foi de $20,3 \pm 0$, $\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, próxima à encontrada nas células do clone MDCK-C7 ($21,4 \pm 2,6$ $\text{nmol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; Figura

21A). Estes valores são semelhantes aos obtidos em estudos que utilizaram homogenatos obtidos por sonicação de sub- clones “móveis” de células MDCK (semelhantes às células principais), em que a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase foi de 27,0±7,2 e 32,9±8,0 nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ nos sub- clones A4 e A5, respectivamente (NAKAZATO *et al.*, 1989). Portanto, a atividade basal da Na⁺-ATPase e da (Na⁺+K⁺)-ATPase que encontramos nas células do sub-clone MDCK-C7 são bastante próximas das encontradas em trabalhos previamente publicados, o que valida a metodologia que utilizamos.

A observação atenta do processo de multiplicação das células do sub-clone MDCK-C11 permitiu constatar que algumas células intercalares perdiam suas características próprias, não só mudando seu aspecto morfológico, mas, também, perdendo a marcação para PNA e anidrase carbônica e apresentando marcação para AQP 2. Tais achados são compatíveis com o processo de alteração fenotípica, sugerindo transformação da célula inicial, fortemente marcada com PNA, sugestivo de célula intercalar do tipo β, para célula com características intermediárias ou bem próximas às do sub-clone MDCK-C7. Dependendo da densidade de cultivo inicial e do tempo de incubação, verificamos que as células do sub-clone MDCK-C11 passavam a apresentar características heterogêneas.

Ao lado dessa observação, também verificamos que a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase, mas não da Na⁺-ATPase, nas células MDCK-C11 é dependente da densidade celular com que as culturas são semeadas, o que pode estar relacionado com a alteração fenotípica que foi acima descrita. A atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase passou de 6,4±1,7 para 16,0±3,4 nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ na dependência das culturas terem sido semeadas com baixa (2x10⁵ células por poço; Figura 19C) ou alta (1x10⁶ células por poço; Figura 21A) densidade inicial.

A atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase nas células MDCK C11 advindas de culturas semeadas com densidade inicial baixa foi bem menor do que a observada em células MDCK C7 em condições semelhantes de semeadura. No entanto, nas células MDCK C11 advindas de culturas semeadas com densidade inicial alta a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase se aproxima daquela medida nas células MDCK-C7 também semeadas em alta densidade. Uma explicação para este achado seria que durante o crescimento celular e em condições de confluência, possa ocorrer diferenciação das células MDCK-C11 em fenótipo semelhante à MDCK-C7. Há vários relatos na literatura de que as células intercalares apresentam plasticidade, com possibilidade tanto de a célula intercalar do tipo β passar a apresentar o fenótipo da célula do tipo α (AL-AWQATI *et al.*, 1998; AL-AWQATI e SCHWARTZ, 2004; WAGNER *et al.*, 2004) como células do tipo β passarem a apresentar características das células do tipo principal (FEJES-TOTH e NARAY-FEJES-TOTH, 1992). Um dos mecanismos atribuídos para a indução da alteração fenotípica é a confluência das células em cultura. Estes achados sugerem a possibilidade das células β intercalares serem pluripotentes, já que as células primitivas do sub-clone MDCK-11 se coram fortemente para PNA, característica das células do tipo β.

A partir da observação de que as células do sub-clone MDCK-C11 quando semeadas em baixa densidade inicial davam origem a culturas que preservavam as características originais após incubação por até 72 horas, resolvemos determinar a atividade de (Na⁺+K⁺)-ATPase nessas condições, tendo verificado ser esta reduzida e não se alterar ao longo do tempo. Assim sendo, nos propusemos a investigar as causas deste achado. Inicialmente determinamos a expressão protéica da subunidade α1 da (Na⁺+K⁺)-ATPase nas células MDCK-

C11, verificando que, na sua maioria, apresentavam marcação da subunidade $\alpha 1$ baixa ou ausente, ou seja, muito menor que a encontrada nas células do subclone MDCK-C7 cultivadas em condições semelhantes. Por outro lado, as células que expressavam a proteína $\alpha 1$ da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$, na maioria das vezes, também apresentavam marcação para a PNA, sugerindo tratar-se de células com características semelhantes às do tipo β intercalar.

A literatura não é clara quanto à expressão de $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ em células intercalares do ducto coletor. Alguns autores não conseguiram provar a existência dessa enzima nas células intercalares (KASHGARIAN *et al.*, 1985; HOLTHOFER *et al.*, 1987; PIEPENHAGEN *et al.*, 1995; BUFFIN-MEYER *et al.*, 1998), enquanto outros detectaram uma baixa expressão (RIDDERSTRALE *et al.*, 1988; SABOLIC *et al.*, 1999). Como indicamos na Figura 29, as células com ausência de $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ são as intercalares do tipo a. Em nossos experimentos é possível que a falta da detecção dessa enzima se deva à sua pequena expressão, fora da sensibilidade dos métodos empregados. Por outro lado, a dificuldade encontrada por outros autores em determinar a presença da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ pode ser explicada pelo fato de a maioria das células intercalares localizadas no ducto coletor serem as do tipo a.

A expressão protéica da subunidade β da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ sem expressão concomitante de subunidade $\alpha 1$ nas células MDCK-C11 pode ser entendida a partir dos dados apresentados em publicações recentes que demonstraram ser a subunidade $\beta 1$ importante para mecanismos de adesão celular, sendo que seu papel funcional seria distinto daquele relacionado com a atividade enzimática da $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$ (VAGIN *et al.*, 2006).

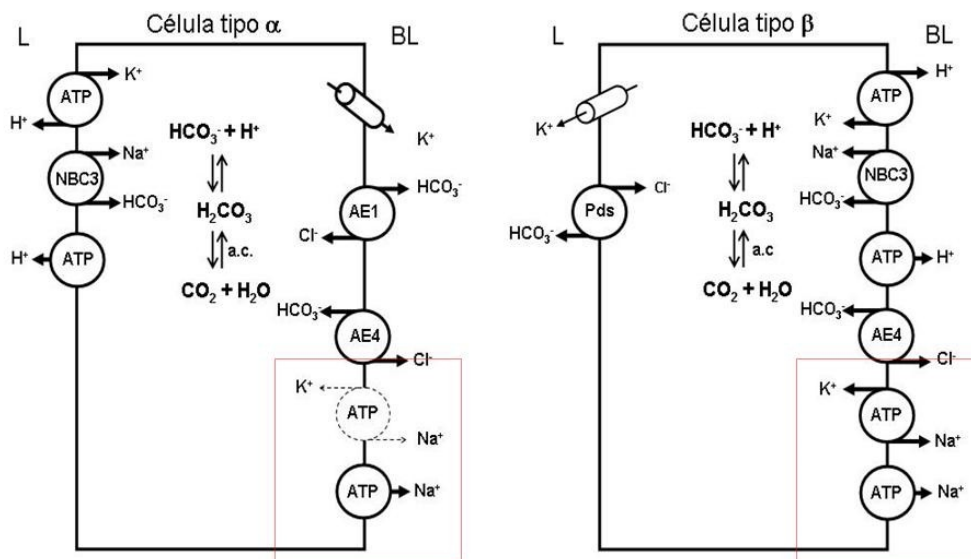


Figura 29 – Representação esquemática das células intercalares α e β com a indicação da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$. A ausência ou pequena expressão da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nas células do tipo α é indicada pelo uso de linhas pontilhadas. Abreviações: L, luminal; BL, basolateral, ATP, adenosina trifosfato; AE, trocador de ânion; NBC3, co-transportador de sódio e bicarbonato do tipo 3 e Pds, Pendrina.

A existência de células que se mantêm viáveis na ausência da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ é um achado intrigante, pois essa enzima, presente nas células dos organismos eucarióticos, responde pela manutenção das características do meio intracelular. Por outro lado, é plausível postular que a homeostase intracelular das células MDCK-C11 do tipo α , por não expressarem a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, dependa da atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$. De fato, a atividade basal da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em ducto coletor, comparada à da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, difere do padrão descrito em túbulo proximal. Enquanto no túbulo proximal a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ corresponde a 10% da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, nas células do sub-clone MDCK-C7, que

utilizamos como modelos de células principais do ducto coletor, a atividade basal das duas enzimas é comparável. Mais ainda, nossos dados evidenciam que a atividade basal da Na^+ -ATPase nas células do sub-clone MDCK-C11 é superior à da (Na^++K^+) -ATPase (Figura 19). Estas observações indicam que nas células do ducto coletor a Na^+ -ATPase deve desempenhar um papel funcional diferente do exercido nas células do túbulo proximal.

Como é sobejamente conhecido, as células intercalares são responsáveis pela regulação fina do equilíbrio ácido-básico do meio interno e são extremamente sensíveis às mudanças do pH. A regulação do pH envolve a ativação de transportadores de membrana que realizam o transporte iônico, incluindo o do Na^+ .

Para determinar o papel do pH na modulação da atividade da Na^+ -ATPase presente nas células dos sub-clones MDCK-C7 e MDCK-C11, foram realizados estudos comparativos em que ambos os tipos celulares eram submetidos à mudança do pH do meio de cultura. Observamos aumento significativo da atividade da Na^+ -ATPase nas células MDCK-C11 na vigência de alcalose e nenhuma modificação dependente do pH na atividade da Na^+ -ATPase e da (Na^++K^+) -ATPase em células MDCK-C7.

Estudos anteriores mostraram que as células MDCK-C7 não mantêm adequadamente a regulação do pH intracelular frente a choque alcalino prolongado, sofrendo alterações fenotípicas e genéticas, enquanto as células MDCK-C11 regulam o pH intracelular (GEKLE *et al.*, 1994; WUNSCH *et al.*, 1995). Nossos resultados sugerem que a ativação da Na^+ -ATPase possa contribuir para o melhor ajuste do meio intracelular nas células MDCK-C11 em situação de alcalose (Figura 26) .

Em fungos a atividade de uma Na⁺-ATPase, chamada ENA, é essencial para a manutenção da concentração intracelular do Na⁺. Nesses organismos foi relatado que ocorre aumento importante da atividade da ENA quando expostos à ambientes alcalinos ou de concentração aumentada de Na⁺ no meio extracelular (CARACUEL *et al.*, 2003; PLATARA *et al.*, 2006). A ausência de ativação deste transportador leva à inviabilidade do organismo. Portanto, o aumento da atividade de Na⁺-ATPase em meio básico deve estar relacionada à homeostasia intracelular em células intercalares. Resta verificar se esse processo depende do aumento da expressão, da translocação de um *pool* intracelular de unidades ou, alternativamente, da ativação de unidades da Na⁺-ATPase já presentes na membrana plasmática, todavia funcionalmente silenciosas.

O esquema apresentado na Figura 30 auxilia na compreensão de uma possível função fisiológica da Na⁺-ATPase nas células do tipo α . Tendo em vista a baixa ou ausente expressão da (Na⁺+K⁺)-ATPase nesse tipo celular, a Na⁺-ATPase seria fundamental para a manutenção das baixas concentrações intracelulares de sódio necessárias para o funcionamento adequado do transportador NBC3, diretamente envolvido na geração de fluxo transcelular e reabsorção do íon bicarbonato.

No clone MDCK C11 ocorrem tanto células α como β , sendo que, como mostra a Figura 29, as primeiras são aptas para secretar ácido e reabsorver bicarbonato e as β , ao contrário, são adequadas para reabsorver H⁺ e secretar bicarbonato. Nas condições de cultura o epitélio não está organizado de tal modo que estabeleça uma barreira eficiente entre os meios luminal e basolateral, razão pela qual é aceitável supor que ao elevar o pH do meio, tanto a membrana luminal como a basolateral são agudamente submetidas a concentrações maiores

de HCO_3^- . Os dados obtidos (Figura 26) mostram que ocorre grande aumento da atividade da Na^+ -ATPase, enquanto que há sutil aumento da atividade da (Na^++K^+) -ATPase que não é estatisticamente significativa. É razoável supor que frente a maiores concentrações extracelulares de bicarbonato o fluxo desse íon, tanto através do cotransportador NBC3 como dos trocadores AE1 e AE4, seja alterado em decorrência da variação dos gradientes iônicos. Assim sendo, é plausível supor que através do NBC3 ocorra maior entrada de Na^+ para o interior celular (Figura 30). Frente ao aumento da concentração intracelular de Na^+ , portanto, é coerente que se observe uma maior atividade da Na^+ -ATPase, como observado nos experimentos relatados. Como a cultura do clone C11 apresenta tanto células α como β , sendo que as do tipo α não apresentam expressão substancial da (Na^++K^+) -ATPase, o fato do aumento da atividade dessa enzima não ter sido estatisticamente significativo é compreensível, pois mesmo que aumente nas células β , onde essa ATPase se expressa, a existência de outras células onde isso não ocorre leva a uma dispersão dos valores observados e conseqüente falta de significância estatística, justificando os dados observados. Por outro lado, como a Na^+ -ATPase está presente nos dois tipos celulares, o aumento da concentração intracelular de Na^+ leva ao aumento consistente de sua atividade em todas as células da cultura, o que se evidencia nos resultados obtidos.

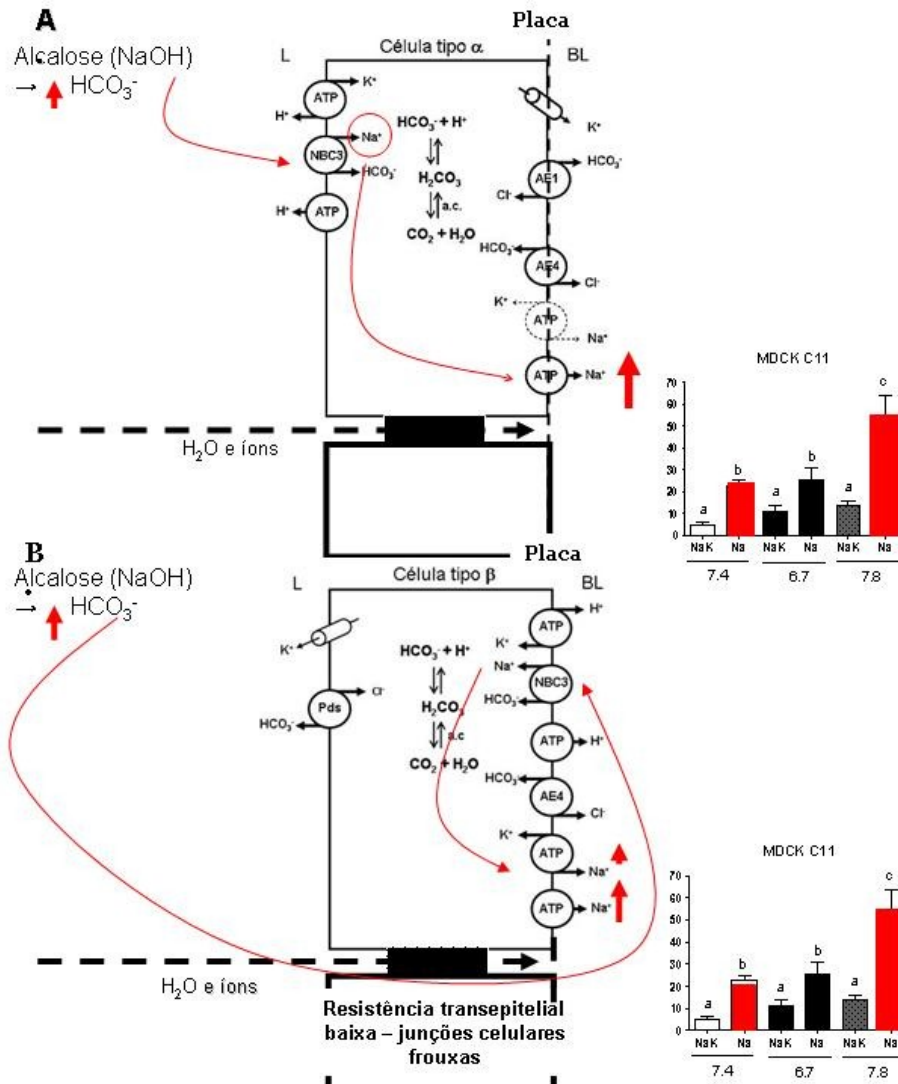


Figura 30 – Representação esquemática das células intercalares α (A) e β (B) frente a estímulo alcalino (situação experimental). Interação da Na^+ -ATPase com o transportador NBC3. Abreviações: L, luminal; BL, basolateral, ATP, adenosina trifosfato; AE, trocador de anion; NBC3, co-transportador de sódio e bicarbonato do tipo 3 e Pds, Pendrina.

Nas células C7, por outro lado, não foi observada alteração das atividades de nenhuma das duas ATPases transportadoras de Na^+ com a variação do pH extracelular (Figura 26), o que é coerente, tendo em vista que as células principais não apresentam mecanismos de transporte de bicarbonato significativamente detectáveis. Corrobora essa análise o fato de que as células C7 quando expostas a estresse alcalino perdem a capacidade de regular o pH

intracelular, o que causa mutações ou morte celular (GEKLE *et al.*, 1994; WUNSCH *et al.*, 1995).

As células do ducto coletor de mamíferos são fisiologicamente expostas a variações nas osmolaridades tanto intersticial como luminal, o que pode alterar o transporte de Na⁺ pelas células principais. É sabido que a hiperosmolaridade do meio leva a perda parcial de volume celular e deflagra a ativação de mecanismos de regulação do volume celular (NEUHOFER e BECK, 2006). Rapidamente a célula ajusta seu volume à custa do aumento da concentração de íons inorgânicos, entre eles de Na⁺, e de reabsorção de água. Por outro lado, há também ganho osmolar causado pela reabsorção de osmólitos orgânicos através de transportadores acoplados ao transporte de sódio, como taurina, betaína e inositol (MONTROSE-RAFIZADEH e GUGGINO, 1990). A concentração intracelular alta de sódio, ainda que possa ocorrer transitoriamente, não é a resposta regulatória adequada, pois causa disfunção mitocondrial, lesão no DNA da célula e apoptose (DMITRIEVA e BURG, 2005; DMITRIEVA *et al.*, 2005). Sendo assim, é importante a ação de mecanismos ativos de extrusão de sódio para evitar o excesso intracelular desse íon, restaurar sua concentração inicial e garantir gradiente favorável à entrada de íons orgânicos acoplados ao transporte de Na⁺ em substituição ao próprio Na⁺. Os transportadores de sódio são, portanto, fundamentais para o ajuste das concentrações intracelulares desse íon, sem comprometer a recuperação do volume intracelular e a força iônica (BURG *et al.*, 1997). Recentemente foi descrito que a ativação de um fator de transcrição chamado TonEBP (*tonicity responsive enhancer binding protein*) é fundamental para o mecanismo de adaptação da célula à hiperosmolaridade. A sua ativação promove mecanismos responsáveis por acúmulo de osmólitos orgânicos

(transcrição de transportadores de osmólitos orgânicos), proteção contra estresse oxidativo (transcrição de “*heat shock proteins*”), canais de uréia e aumento da expressão de aquaporina-2 independente de estímulo por vasopressina (NEUHOFER e BECK, 2006; BURG *et al.*, 2007; HOFFMANN *et al.*, 2009; KWON *et al.*, 2009). Sua atividade é proporcional e diretamente estimulada pelo aumento da tonicidade do meio (KWON *et al.*, 2009).

É sabido que células MDCK em confluência apresentam acúmulo de fluido no lado basocelular, entre membrana e placa. Isto é evidenciado na microscopia pela formação dos domos no epitélio celular. Os domos comprovam a existência de mecanismos ativos de transporte transcelular de água e solutos. Acreditamos que ao expor a célula ao aumento da tonicidade haverá perda de água tanto pela face apical como pela basolateral. Na face apical, a presença de aquaporina-2, ainda que em pequena quantidade (célula não estimulada), permitiria a perda inicial de água. O incremento da osmolaridade intracelular levaria ao aumento do transporte de sódio via $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ e aumento da hipertonicidade no espaço entre a membrana basolateral e a placa, e conseqüente transporte de água via aquaporina 3-4. Em seqüência, haveria o disparo de mecanismos de ganho de solutos inorgânicos (NHE1, NKCC1 e HICC, canais de cátions sensíveis a estiramento) e orgânicos acoplados ao sódio (transportador $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{Taurina}$), que determinam ganho de sódio e aumento da tonicidade intracelular para restabelecer o equilíbrio com o meio externo e manter o volume celular. Paralelamente, a tonicidade aumentada do meio estimula a expressão do TonEBP, que promove a transcrição de diferentes transportadores de osmólitos orgânicos, que substituem o sódio, e aumenta a expressão de canais de uréia e aquaporina-2 independentemente do estímulo por vasopressina (STORM *et al.*, 2003;

HASLER *et al.*, 2008; HASLER, 2009). Por outro lado, também foi verificado o aumento de expressão de aquaporina-3 por estímulo de hipertonicidade na célula MDCK (MATSUZAKI *et al.*, 2001). O aumento do número de canais de água permeabiliza a célula e facilita o equilíbrio do volume celular. As células são então protegidas contra efeitos lesivos da hipertonicidade, recuperam o volume celular e assim têm a morte celular evitada. Este mecanismo, no entanto, como descrito por outros autores, não é eficaz em culturas de células onde a osmolaridade do meio é agudamente elevada acima de 600 mOsmol/L (BURG *et al.*, 2007). Isto é compatível com nosso achado de morte celular ao incremento de 200mM de NaCl ou 400mM de manitol ao meio (Figura 27C-D e 28 C-D). Neste contexto de recuperação do volume é descrito que a atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase encontra-se aumentada, o que: (1) permite a formação de gradiente favorável à entrada de osmólitos inorgânicos em cotransporte acoplado ao sódio, (2) mantém a alta força iônica intracelular dependente de K, que é menos lesiva à estrutura do DNA da célula que a hipernatremia, e restaura progressivamente a concentração inicial de sódio intracelular em substituição aos osmólitos inorgânicos. Tal estímulo da atividade da (Na⁺+K⁺)-ATPase deve-se tanto ao aumento do sódio intracelular como pelo aumento da expressão da enzima (BURG *et al.*, 2007).

Estudos anteriores realizados tanto em modelo celular (células da linhagem mpkCCD_{c14}) como em segmentos retirados *ex vivo* do ducto coletor de ratos mostraram, através do uso de ionóforos apropriados, que o aumento da concentração intracelular de Na⁺ provoca o aumento da expressão da (Na⁺+K⁺)-ATPase (VINCIGUERRA *et al.*, 2003). Por outro lado, em cultura primária de células do ducto coletor medular interno (IMCD) de ratos foi mostrado que o aumento da osmolaridade do meio através da adição de NaCl, manitol ou

rafinose, induz aumento da expressão de mRNA das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ com pico após 12 horas do estímulo inicial. Neste mesmo experimento, o aumento da osmolaridade do meio através da adição de NaCl ou manitol (ambos para elevar a osmolaridade do meio a 500 mOsm /L) causou aumento da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ de 78,6 e 82,8%, respectivamente (OHTAKA *et al.*, 1996). Os experimentos realizados neste trabalho confirmam que o incremento da osmolaridade tanto através da adição de cloreto de sódio como de manitol aumentam a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ em MDCK C7. No entanto, não houve aumento da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ (Figuras 27 e 28). Isto sugere que a $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ não participe da regulação do volume celular nas células do clone MDCK-C7.

Em experimentos prévios, Caruso-Neves mostrou que a exposição de túbulos de Malpighi de *Rhodnius Prolixus* a meio tornado hiperosmótico (500 mOsm/L) pela adição de manitol reduz a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (CARUSO-NEVES e LOPES, 2000). Em um momento inicial, o choque hiperosmótico leva à crenação celular, com perda de água e aumento da concentração intracelular de Na^+ . A rápida recuperação do volume celular pode ser atribuída à redução da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ decorrente do estresse hiperosmolar o que levaria ao acúmulo de Na^+ no meio intracelular e conseqüente ganho de água, justificando, portanto, a rápida resposta regulatória parcial do volume celular observada nesses experimentos. Em contraste, no presente trabalho, verificamos aumento da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ quando as células MDCK C7 foram submetidas por 1 hora a choque hiperosmótico induzido pela adição de sódio ou manitol (correspondendo a uma osmolaridade final próxima de 500 mOsm/L), sem mudança significativa da atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$

(Figura 27A-B e 28A-B). A diferença observada entre os dois trabalhos pode ser devida ao fato da atividade ATPásica ter sido avaliada em momentos diferentes. Enquanto aplicamos 1 hora de choque hiperosmolar, os dados citados foram obtidos após uma pré-incubação em meio hiperosmótico de 30 minutos (CARUSO-NEVES e LOPES, 2000). Isso significa que medimos a atividade ATPásica em uma fase de regulação do volume celular mais adiantada, permitindo supor que após uma fase inicial com retenção de Na^+ outros mecanismos regulatórios são deflagrados, ocorrendo paralelamente redução da concentração intracelular desse íon através do aumento da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. Esta interpretação responde à necessidade fisiológica de manter a concentração intracelular de Na^+ baixa, pois, quando em excesso, induz mecanismos de morte celular e cria gradiente desfavorável à entrada de osmólitos orgânicos via mecanismo de cotransporte acoplados a ganho de Na^+ (BURG, 2002; DMITRIEVA e BURG, 2005; DMITRIEVA *et al.*, 2005). É plausível, portanto, supor que depois desse ajuste inicial rápido do volume celular à custa de retenção de Na^+ no interior celular causada pela inibição da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, esta enzima seja ativada para regularizar a concentração de sódio e gerar gradiente iônico favorável à entrada de osmólitos inorgânicos.

É interessante observar que tanto no presente trabalho como em estudo de nosso laboratório anteriormente publicado (CARUSO-NEVES e LOPES, 2000), foi verificado que o choque hiperosmolar não modifica a atividade da Na^+ -ATPase. Inicialmente devemos notar que o estresse osmolar aplicado em nossos experimentos provoca um aumento inicial da concentração intracelular do Na^+ , seguido de sua normalização. Considerando que o K_m da Na^+ -ATPase para Na^+ é de 8,0 mM, enquanto que o da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase é de 16,0 mM (DEL CASTILLO

et al., 1982), é de se esperar, portanto, que em uma situação de aumento progressivo da concentração intracelular de Na^+ , a atividade da Na^+ -ATPase atinja mais rapidamente sua atividade máxima do que a (Na^++K^+) -ATPase, o que perfeitamente explicaria os dados observados.

8 CONCLUSÕES

Em conclusão, a Na^+ -ATPase apresenta atividades semelhantes nos clones MDCK C7 e MDCK C11, células que se assemelham e são consideradas modelos experimentais de células principais e intercalares de ducto coletor respectivamente. No entanto, em C11 a atividade da (Na^++K^+) -ATPase é bastante reduzida ou ausente na maioria das células. As células que apresentavam atividade de (Na^++K^+) -ATPase também marcavam para PNA, sugerindo serem do tipo intercalares tipo β . Nossos achados mostram que há uma heterogeneidade na cultura de células MDCK C11 quando semeadas com alta densidade celular, sugerindo transformação do fenótipo inicial de “MDCK C11- β intercalar” para características de célula “MDCK C11-a intercalar” ou MDCK C7. Isto coincide com achados da literatura indicativos de plasticidade ou pluripotencialidade das células intercalares tipo β . A ausência de (Na^++K^+) -ATPase nas células MDCK C11 não inviabiliza as células e isto pode ser explicado pela presença de Na^+ -ATPase nestas células. Em MDCK C11, a atividade de Na^+ -ATPase é semelhante à encontrada em MDCK C7. A alcalinização do meio leva a significativo aumento da atividade da Na^+ -ATPase em MDCK C11, demonstrando importância desta enzima na homeostase destas células. Em MDCK C7, na vigência de hiperosmolaridade induzida pela adição de sódio ou manitol, não houve aumento da atividade de Na^+ -ATPase, mas sim a da (Na^++K^+) -ATPase. Este dado sugere a não participação, ou pequena contribuição, da Na^+ -ATPase na regulação do volume celular.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AWQATI, Q.; SCHWARTZ, G. J. A fork in the road of cell differentiation in the kidney tubule. **J Clin Invest**, v. 113, n. 11, p. 1528-30, Jun 2004.

AL-AWQATI, Q.; VIJAYAKUMAR, S.; HIKITA, C.; CHEN, J.; TAKITO, J. Phenotypic plasticity in the intercalated cell: the hensin pathway. **Am J Physiol**, v. 275, n. 2 Pt 2, p. F183-90, Aug 1998.

AL-AWQATI, Q.; VIJAYAKUMAR, S.; TAKITO, J.; HIKITA, C.; YAN, L.; WIEDERHOLT, T. Phenotypic plasticity and terminal differentiation of the intercalated cell: the hensin pathway. **Exp Nephrol**, v. 8, n. 2, p. 66-71, Mar-Apr 2000.

AMASHEH, S.; MEIRI, N.; GITTER, A. H.; SCHONEBERG, T.; MANKERTZ, J.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 24, p. 4969-76, Dec 15 2002.

ARTHUR, J. M. The MDCK cell line is made up of populations of cells with diverse resistive and transport properties. **Tissue Cell**, v. 32, n. 5, p. 446-50, Oct 2000.

ATCC (American Type Cell Collection). Disponível em: < <http://atcc.org> >. Acesso em: 02/08/2009.

BAGNASCO, S. M. How renal cells handle urea. **Cell Physiol Biochem**, v. 10, n. 5-6, p. 379-84, 2000.

BEDFORD, J. J.; LEADER, J. P.; WALKER, R. J. Aquaporin expression in normal human kidney and in renal disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 10, p. 2581-7, Oct 2003.

BLAZER-YOST, B. L.; RECORD, R. D.; OBERLEITHNER, H. Characterization of hormone-stimulated Na⁺ transport in a high-resistance clone of the MDCK cell line. **Pflugers Arch**, v. 432, n. 4, p. 685-91, Aug 1996.

BORGATTI, A. R.; TRIGARI, G.; PAGLIARANI, A.; VENTRELLA, V. Ouabain-insensitive Na⁺ stimulation of a microsomal Mg²⁺ -ATPase in gills of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Comp Biochem Physiol A**, v. 81, n. 1, p. 127-35, 1985.

BORON, W. F. Regulation of intracellular pH. **Adv Physiol Educ**, v. 28, n. 1-4, p. 160-79, Dec 2004.

BRENNER, B. M., Ed. **Brenner & Rector's The Kidney**: Saunders(Elsevier), v.1, 7th ed. 2004.

BUFFIN-MEYER, B.; VERBAVATZ, J. M.; CHEVAL, L.; MARSY, S.; YOUNES-IBRAHIM, M.; LE MOAL, C.; DOUCET, A. Regulation of Na⁺, K(+)-ATPase in the rat outer medullary collecting duct during potassium depletion. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, n. 4, p. 538-50, Apr 1998.

BURG, M. B. Response of renal inner medullary epithelial cells to osmotic stress. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n. 3, p. 661-6, Nov 2002.

BURG, M. B.; FERRARIS, J. D.; DMITRIEVA, N. I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiol Rev**, v. 87, n. 4, p. 1441-74, Oct 2007.

BURG, M. B.; KWON, E. D.; KULTZ, D. Regulation of gene expression by hypertonicity. **Annu Rev Physiol**, v. 59, p. 437-55, 1997.

CARACUEL, Z.; CASANOVA, C.; RONCERO, M. I.; DI PIETRO, A.; RAMOS, J. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na⁺ -ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 6, p. 1246-52, Dec 2003.

CARUSO-NEVES, C.; COELHO-SOUZA, S. A.; VIVES, D.; GOES, G.; LARA, L. S.; LOPES, A. G. Modulation of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg(2+), MgATP and furosemide. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 12, p. 1586-93, Dec 2002.

CARUSO-NEVES, C.; EINICKER-LAMAS, M.; CHAGAS, C.; OLIVEIRA, M. M.; VIEYRA, A.; LOPES, A. G. Ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Z Naturforsch [C]**, v. 54, n. 1-2, p. 100-4, Jan-Feb 1999a.

CARUSO-NEVES, C.; LOPES, A. G. Sodium pumps in the Malpighian tubule of *Rhodnius* sp. **An Acad Bras Cienc**, v. 72, n. 3, p. 407-12, Sep 2000.

CARUSO-NEVES, C.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SAAD-NEHME, J.; PROVERBIO, F.; MARIN, R.; LOPES, A. G. Ouabain-insensitive Na⁽⁺⁾-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 119, n. 4, p. 807-11, Apr 1998.

CARUSO-NEVES, C.; RANGEL, L. B.; LARA, L. S.; LOPES, A. G. Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 8, p. 1079-84, Aug 2001.

CARUSO-NEVES, C.; SIQUEIRA, A. S.; ISO-COHEN, G.; LOPES, A. G. Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. **Biochim Biophys Acta**, v. 1431, n. 2, p. 483-91, May 18 1999b.

CARUSO-NEVES, C.; VIVES, D.; DANTAS, C.; ALBINO, C. M.; FONSECA, L. M.; LARA, L. S.; ISO, M.; LOPES, A. G. Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase of proximal tubules is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. **Biochim Biophys Acta**, v. 1660, n. 1-2, p. 93-8, Jan 28 2004.

CHRISTENSEN, B. M.; MARPLES, D.; KIM, Y. H.; WANG, W.; FROKIAER, J.; NIELSEN, S. Changes in cellular composition of kidney collecting duct cells in rats with lithium-induced NDI. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 286, n. 4, p. C952-64, Apr 2004.

CODINA, J.; DUBOSE, T. D., JR. Molecular regulation and physiology of the H⁺,K⁺ -ATPases in kidney. **Semin Nephrol**, v. 26, n. 5, p. 345-51, Sep 2006.

CONTRERAS, R. G.; FLORES-BENI TEZ, D.; FLORES-MALDONADO, C.; LARRE, I.; SHOSHANI, L.; CEREIJIDO, M. Na⁺,K⁺-ATPase and hormone ouabain:new roles for an old enzyme and an old inhibitor. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 52, n. 8, p. 31-40, 2006.

DE ALMEIDA-AMARAL, E. E.; CARUSO-NEVES, C.; PIRES, V. M.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Leishmania amazonensis*: characterization of an ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 2, p. 165-71, Feb 2008.

DE SOUZA, A. M.; BATISTA, E. J.; PINHEIRO, A. A.; CARVALHAES, M.; LOPES, A. G.; DE SOUZA, W.; CARUSO-NEVES, C. *Entamoeba histolytica*: ouabain-

insensitive Na(+)-ATPase activity. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 2, p. 195-200, Oct 2007a.

DE SOUZA, A. M.; CARVALHO, T. L.; SABINO, P. M.; VIVES, D.; FONTES, C. F.; LOPES, A. G.; CARUSO-NEVES, C. Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na(+) -ATPase in MDCK I cells. **Biochimie**, v. 89, n. 11, p. 1425-32, Nov 2007b.

DE SOUZA, A. M. E. A. **Isolamento e Caracterização do Intermediário Fosforilado da Segunda Bomba de Sódio.** FESBE - Resumos do Congresso(divulgação por meio digital/CD-ROM) 2003.

DEL CASTILLO, J. R.; MARIN, R.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F. Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na+-stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 692, n. 1, p. 61-8, Oct 22 1982.

DMITRIEVA, N. I.; BURG, M. B. Hypertonic stress response. **Mutat Res**, v. 569, n. 1-2, p. 65-74, Jan 6 2005.

DMITRIEVA, N. I.; BURG, M. B.; FERRARIS, J. D. DNA damage and osmotic regulation in the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, n. 1, p. F2-7, Jul 2005.

DOSTANIC-LARSON, I.; LORENZ, J. N.; VAN HUYSSSE, J. W.; NEUMANN, J. C.; MOSELEY, A. E.; LINGREL, J. B. Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na+-K+-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 3, p. R524-8, Mar 2006.

EIAM-ONG, S.; KURTZMAN, N. A.; SABATINI, S. Regulation of collecting tubule adenosine triphosphatases by aldosterone and potassium. **J Clin Invest**, v. 91, n. 6, p. 2385-92, Jun 1993.

ELLISON, D. H. Chapter 2: Disorders of Sodium Balance. In: SCHRIER, R. W. (Ed.). **Atlas of Diseases of the Kidney**, 2004. p.2.1-2.22

FEJES-TOTH, G.; NARAY-FEJES-TOTH, A. Differentiation of renal beta-intercalated cells to alpha-intercalated and principal cells in culture. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 12, p. 5487-91, Jun 15 1992.

FEJES-TOTH, G.; NARAY-FEJES-TOTH, A. Differentiation of intercalated cells in culture. **Pediatr Nephrol**, v. 7, n. 6, p. 780-4, Dec 1993.

FENTON, R. A. Essential role of vasopressin-regulated urea transport processes in the mammalian kidney. **Pflugers Arch**, v. 458, n. 1, p. 169-77, May 2009.

FENTON, R. A.; KNEPPER, M. A. Urea and renal function in the 21st century: insights from knockout mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 3, p. 679-88, Mar 2007.

FERAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. **Physiol Rev**, v. 81, n. 1, p. 345-418, Jan 2001.

FERAILLE, E.; MORDASINI, D.; GONIN, S.; DESCHENES, G.; VINCIGUERRA, M.; DOUCET, A.; VANDEWALLE, A.; SUMMA, V.; VERREY, F.; MARTIN, P. Y. Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. **Ann N Y Acad Sci**, v. 986, p. 570-8, Apr 2003.

FERNANDEZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G. Na⁺-independent proton secretion in MDCK-C11 cells. **Pflugers Arch**, v. 441, n. 2-3, p. 287-93, Dec 2000.

GEKLE, M.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; SCHENK, K.; MARSCHITZ, I.; SCHRAMEK, H. Rapid activation of Na⁺/H⁺-exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinase ERK1/2. **Pflugers Arch**, v. 441, n. 6, p. 781-6, Mar 2001.

GEKLE, M.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; SILBERNAGL, S. Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 282, n. 4, p. F669-79, Apr 2002a.

GEKLE, M.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; SILBERNAGL, S. Rapid actions of aldosterone on cells from renal epithelium: the possible role of EGF-receptor signaling. **Steroids**, v. 67, n. 6, p. 499-504, May 2002b.

GEKLE, M.; SCHWERDT, G.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; WILFLINGSEDER, D.; POLLACK, V.; DANDER, M.; SCHRAMEK, H. Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 293, n. 3, p. 837-44, Jun 2000.

GEKLE, M.; WUNSCH, S.; OBERLEITHNER, H.; SILBERNAGL, S. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal

cell and intercalated cell properties. **Pflugers Arch**, v. 428, n. 2, p. 157-62, Sep 1994.

GIEBISCH, G.; HEBERT, S. C.; WANG, W. H. New aspects of renal potassium transport. **Pflugers Arch**, v. 446, n. 3, p. 289-97, Jun 2003.

GONIN, S.; DESCHENES, G.; ROGER, F.; BENS, M.; MARTIN, P. Y.; CARPENTIER, J. L.; VANDEWALLE, A.; DOUCET, A.; FERAILLE, E. Cyclic AMP increases cell surface expression of functional Na,K-ATPase units in mammalian cortical collecting duct principal cells. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 2, p. 255-64, Feb 2001.

GRUBMEYER, C.; PENEFSKY, H. S. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. **J Biol Chem**, v. 256, n. 8, p. 3718-27, Apr 25 1981.

GUMZ, M. L.; POPP, M. P.; WINGO, C. S.; CAIN, B. D. Early transcriptional effects of aldosterone in a mouse inner medullary collecting duct cell line. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 285, n. 4, p. F664-73, Oct 2003.

GUNTUPALLI, J.; ONUIGBO, M.; WALL, S.; ALPERN, R. J.; DUBOSE, T. D., JR. Adaptation to low-K⁺ media increases H⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase but not H⁽⁺⁾-ATPase-mediated pHi recovery in OMCD1 cells. **Am J Physiol**, v. 273, n. 2 Pt 1, p. C558-71, Aug 1997.

HANSSON, H. P. Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. **Histochemie**, v. 11, n. 2, p. 112-28, 1967.

HASLER, U. Controlled aquaporin-2 expression in the hypertonic environment. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 296, n. 4, p. C641-53, Apr 2009.

HASLER, U.; NUNES, P.; BOULEY, R.; LU, H. A.; MATSUZAKI, T.; BROWN, D. Acute hypertonicity alters aquaporin-2 trafficking and induces a MAPK-dependent accumulation at the plasma membrane of renal epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 283, n. 39, p. 26643-61, Sep 26 2008.

HOFFMANN, E. K.; LAMBERT, I. H.; PEDERSEN, S. F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. **Physiol Rev**, v. 89, n. 1, p. 193-277, Jan 2009.

HOLTHOFER, H.; SCHULTE, B. A.; PASTERNAK, G.; SIEGEL, G. J.; SPICER, S. S. Three distinct cell populations in rat kidney collecting duct. **Am J Physiol**, v. 253, n. 2 Pt 1, p. C323-8, Aug 1987.

IIZUMI, K.; MIKAMI, Y.; HASHIMOTO, M.; NARA, T.; HARA, Y.; AOKI, T. Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na(+)-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1758, n. 6, p. 738-46, Jun 2006.

JEFFERIES, K. C.; CIPRIANO, D. J.; FORGAC, M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. **Arch Biochem Biophys**, v. 476, n. 1, p. 33-42, Aug 1 2008.

KASHGARIAN, M.; BIEMESDERFER, D.; CAPLAN, M.; FORBUSH, B., 3RD. Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. **Kidney Int**, v. 28, n. 6, p. 899-913, Dec 1985.

KLOTH, S.; AIGNER, J.; BRANDT, E.; MOLL, R.; MINUTH, W. W. Histochemical markers reveal an unexpected heterogeneous composition of the renal embryonic collecting duct epithelium. **Kidney Int**, v. 44, n. 3, p. 527-36, Sep 1993.

KRAUT, J. A.; HELANDER, K. G.; HELANDER, H. F.; IROEZI, N. D.; MARCUS, E. A.; SACHS, G. Detection and localization of H⁺-K⁺-ATPase isoforms in human kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 281, n. 4, p. F763-8, Oct 2001.

KRIZ, W.; BANKIR, L. A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). **Kidney Int**, v. 33, n. 1, p. 1-7, Jan 1988.

KWON, M. S.; LIM, S. W.; KWON, H. M. Hypertonic stress in the kidney: a necessary evil. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 186-91, Jun 2009.

LANG, F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. **J Am Coll Nutr**, v. 26, n. 5 Suppl, p. 613S-623S, Oct 2007.

LANG, F.; BUSCH, G. L.; RITTER, M.; VOLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HAUSSINGER, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiol Rev**, v. 78, n. 1, p. 247-306, Jan 1998.

LARA, L. S.; CAVALCANTE, F.; AXELBAND, F.; DE SOUZA, A. M.; LOPES, A. G.; CARUSO-NEVES, C. Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT2-

mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na⁺-ATPase by Ang-(1-7). **Biochem J**, v. 395, n. 1, p. 183-90, Apr 1 2006.

LARA, L. S.; DE CARVALHO, T.; LEAO-FERREIRA, L. R.; LOPES, A. G.; CARUSO-NEVES, C. Modulation of the (Na⁺)+K⁺)ATPase activity by Angiotensin-(1-7) in MDCK cells. **Regul Pept**, v. 129, n. 1-3, p. 221-6, Jul 15 2005.

LAURSEN, U. H.; PIHAKASKI-MAUNSBACH, K.; KWON, T. H.; OSTERGAARD JENSEN, E.; NIELSEN, S.; MAUNSBACH, A. B. Changes of rat kidney AQP2 and Na,K-ATPase mRNA expression in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. **Nephron Exp Nephrol**, v. 97, n. 1, p. e1-16, 2004.

LE MOELLIC, C.; OUVRARD-PASCAUD, A.; CAPURRO, C.; CLUZEAUD, F.; FAY, M.; JAISSE, F.; FARMAN, N.; BLOT-CHABAUD, M. Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 5, p. 1145-60, May 2004.

LEHIR, M.; KAISLING, B.; KOEPPEN, B. M.; WADE, J. B. Binding of peanut lectin to specific epithelial cell types in kidney. **Am J Physiol**, v. 242, n. 1, p. C117-20, Jan 1982.

LODISH H., B. A., KAISER C.A., KRIEGER M., SCOTT M.P., BRETSCHER A., PLOEGH H. AND MATSUDAIRA P. Chapter 7: Transport of Ions and Small Molecules Across Cell Membranes. In: H., L. (Ed.). **Molecular Cell Biology**, 2006. p.244-300.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

MAIA, J. C.; GOMES, S. L.; JULIANI, M. H. In: MOREL, C. M. (Ed.). **Genes of antigens of parasites: a laboratory manual**. 2nd: Fundação Oswaldo Cruz, 1983. p.146-157.

MARIN, R.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F. Active sodium transport in basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 814, n. 2, p. 363-73, Apr 11 1985a.

MARIN, R.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F. Effect of Ca²⁺ on the ouabain-insensitive, active Na⁺ uptake in inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 817, n. 2, p. 299-306, Jul 25 1985b.

MATSUZAKI, T.; SUZUKI, T.; TAKATA, K. Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 1, p. C55-63, Jul 2001.

MCENEANEY, V.; HARVEY, B. J.; THOMAS, W. Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 107, n. 3-5, p. 180-90, Nov-Dec 2007.

MEIER, K. E.; SNAVELY, M. D.; BROWN, S. L.; BROWN, J. H.; INSEL, P. A. alpha 1- and beta 2-adrenergic receptor expression in the Madin-Darby canine kidney epithelial cell line. **J Cell Biol**, v. 97, n. 2, p. 405-15, Aug 1983.

MELLO-AIRES, M. Capítulo 46: Visão Morfofuncional do Rim. In: MELLO-AIRES, M. (Ed.). **Fisiologia**: Guanabara Koogan, 1991. p.495-507.

MONTROSE-RAFIZADEH, C.; GUGGINO, W. B. Cell volume regulation in the nephron. **Annu Rev Physiol**, v. 52, p. 761-72, 1990.

MOORE, K. L. Capítulo 13: O sistema urogenital. In: MOORE, K. L. (Ed.). **Embriologia Clínica**. 4^a: Guanabara Koogan S.A., 1990. p.197-226.

MORCILLO, L. D. S. L. **Possível Papel Modulador da Angiotensina (1-7) na Excreção de Na⁺: Modulação da Atividade Na⁺ ATPásica pela Interação entre Angiotensina II e Angiotensina (1-7)**. 2004. 136 Ph. D CCS/IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MORETTI, R.; MARTIN, M.; PROVERBIO, T.; PROVERBIO, F.; MARIN, R. Ouabain-insensitive Na-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. **Comp Biochem Physiol B**, v. 98, n. 4, p. 623-6, 1991.

NAKAZATO, Y.; SUZUKI, H.; SARUTA, T. Characterization of subclones of Madin-Darby canine kidney renal epithelial cell line. **Biochim Biophys Acta**, v. 1014, n. 1, p. 57-65, Oct 30 1989.

NEUHOFER, W.; BECK, F. X. Survival in hostile environments: strategies of renal medullary cells. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 171-80, Jun 2006.

NIELSEN, S.; FROKIAER, J.; MARPLES, D.; KWON, T. H.; AGRE, P.; KNEPPER, M. A. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 205-44, Jan 2002.

OHTAKA, A.; MUTO, S.; NEMOTO, J.; KAWAKAMI, K.; NAGANO, K.; ASANO, Y. Hyperosmolality stimulates Na-K-ATPase gene expression in inner medullary collecting duct cells. **Am J Physiol**, v. 270, n. 5 Pt 2, p. F728-38, May 1996.

PEDERSEN, P. L. Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview. **J Bioenerg Biomembr**, v. 37, n. 6, p. 349-57, Dec 2005.

PFEIFFER, R.; BERON, J.; VERREY, F. Regulation of Na⁺ pump function by aldosterone is alpha-subunit isoform specific. **J Physiol**, v. 516 (Pt 3), p. 647-55, May 1 1999.

PIEPENHAGEN, P. A.; PETERS, L. L.; LUX, S. E.; NELSON, W. J. Differential expression of Na(+)-K(+)-ATPase, ankyrin, fodrin, and E-cadherin along the kidney nephron. **Am J Physiol**, v. 269, n. 6 Pt 1, p. C1417-32, Dec 1995.

PLATARA, M.; RUIZ, A.; SERRANO, R.; PALOMINO, A.; MORENO, F.; ARINO, J. The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 281, n. 48, p. 36632-42, Dec 1 2006.

PREISS, R.; BUSSE, E.; BANASCHAK, H. An ouabain-insensitive Na-ATPase of the arterial vascular muscle cell and its relation to ouabain-sensitive Na,K-ATPase. **Acta Biol Med Ger**, v. 38, n. 10, p. 1387-97, 1979.

PROVERBIO, F.; DEL CASTILLO, J. R. Na⁺-stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 646, n. 1, p. 99-108, Aug 6 1981.

PROVERBIO, F.; DUQUE, J. A.; PROVERBIO, T.; MARIN, R. Cell volume-sensitive Na⁺-ATPase activity in rat kidney cortex cell membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 941, n. 1, p. 107-10, Jun 7 1988.

PROVERBIO, F.; PROVERBIO, T.; MARIN, R. Na⁺-ATPase is a different entity from the (Na⁺ + K⁺)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 858, n. 1, p. 202-5, Jun 13 1986.

PROVERBIO F., R. J. W. L., WHITTEMBURY G. Sensitivities of (Na⁺---K⁺)-ATPase and Na⁺ extrusion mechanisms to ouabain and ethacrynic acid in the cortex of the guinea-pig kidney. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 211, n. 2, p. 327-336, August 1970.

QUINTANA-GOMES, E. **Mecanismos Moleculares Envolvidos na Excreção Renal de Na⁺: Ativação Sequencial dos Sistemas PLC/PKC e PLA2/PGE2 na Regulação da Na⁺-ATPase por Bradicnina**. 2004. 116 Tese de Doutorado Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RAIKWAR, N. S.; THOMAS, C. P. Nedd4-2 isoforms ubiquitinate individual epithelial sodium channel subunits and reduce surface expression and function of the epithelial sodium channel. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 294, n. 5, p. F1157-65, May 2008.

RANGEL, L. B.; LOPES, A. G.; LARA, L. S.; CARVALHO, T. L.; SILVA, I. V.; OLIVEIRA, M. M.; EINICKER-LAMAS, M.; VIEYRA, A.; NOGAROLI, L.; CARUSO-NEVES, C. PI-PLCbeta is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. **Regul Pept**, v. 127, n. 1-3, p. 177-82, Apr 15 2005.

RIDDERSTRALE, Y.; KASHGARIAN, M.; KOEPPEN, B.; GIEBISCH, G.; STETSON, D.; ARDITO, T.; STANTON, B. Morphological heterogeneity of the rabbit collecting duct. **Kidney Int**, v. 34, n. 5, p. 655-70, Nov 1988.

RINDLER, M. J.; CHUMAN, L. M.; SHAFFER, L.; SAIER, M. H., JR. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). **J Cell Biol**, v. 81, n. 3, p. 635-48, Jun 1979.

SABOLIC, I.; HERAK-KRAMBERGER, C. M.; BRETON, S.; BROWN, D. Na/K-ATPase in intercalated cells along the rat nephron revealed by antigen retrieval. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 5, p. 913-22, May 1999.

SCHRAMEK, H.; WILFLINGSIEDER, D.; POLLACK, V.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; GEKLE, M. Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 283, n. 3, p. 1460-8, Dec 1997.

SCHUMACHER, K.; STREHL, R.; MINUTH, W. W. Urea restrains aldosterone-induced development of peanut agglutinin-binding on embryonic renal collecting duct epithelia. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 11, p. 2758-66, Nov 2003.

SCHWARTZ, G. J.; AL-AWQATI, Q. Role of hensen in mediating the adaptation of the cortical collecting duct to metabolic acidosis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 14, n. 4, p. 383-8, Jul 2005.

SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R. G.; ROLDAN, M. L.; MORENO, J.; LAZARO, A.; BALDA, M. S.; MATTER, K.; CEREJIDO, M. The polarized expression of Na⁺,K⁺-ATPase in epithelia depends on the association between beta-subunits located in neighboring cells. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 3, p. 1071-81, Mar 2005.

SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. Capítulo 8: Sistema Cardiovascular. In: SILBERNAGL, S. e DESPOPOULOS, A. (Ed.). **Fisiologia Texto e Atlas**. 5^a: Artmed, v.1, 2003. p.186-221,b.

SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. Capítulo 7: Rins. In: SILBERNAGL, S. e DESPOPOULOS, A. (Ed.). **Fisiologia Texto e Atlas**. 5^a: Artmed, v.1, 2003 p.148-185,a.

SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim Biophys Acta**, v. 23, n. 2, p. 394-401, Feb 1957.

STORM, R.; KLUSSMANN, E.; GEELHAAR, A.; ROSENTHAL, W.; MARIC, K. Osmolality and solute composition are strong regulators of AQP2 expression in renal principal cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 284, n. 1, p. F189-98, Jan 2003.

SUMMA, V.; CAMARGO, S. M.; BAUCH, C.; ZECEVIC, M.; VERREY, F. Isoform specificity of human Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase localization and aldosterone regulation in mouse kidney cells. **J Physiol**, v. 555, n. Pt 2, p. 355-64, Mar 1 2004.

SUMMA, V.; MORDASINI, D.; ROGER, F.; BENS, M.; MARTIN, P. Y.; VANDEWALLE, A.; VERREY, F.; FERAILLE, E. Short term effect of aldosterone on Na,K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47087-93, Dec 14 2001.

TAN, L. B.; SCHLOSSMAN, D.; BARKER, D. Fiftieth anniversary of aldosterone: from discovery to cardiovascular therapy. **Int J Cardiol**, v. 96, n. 3, p. 321-33, Sep 2004.

TANNER, G. A. Part VI: Renal Physiology and Body Fluids. Chapter 23 Kidney Function. In: RHOADES, A. R. e TANNER, G. A. (Ed.). **Medical Physiology**. 2nd: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p.377-402.

TARARTHUCH, A. L.; FERNANDEZ, R.; MALNIC, G. Cl⁻ and regulation of pH by MDCK-C11 cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 5, p. 687-96, May 2007.

TARARTHUCH, A. L.; FERNANDEZ, R.; RAMIREZ, M. A.; MALNIC, G. Factors affecting ammonium uptake by C11 clone of MDCK cells. **Pflugers Arch**, v. 445, n. 2, p. 194-201, Nov 2002.

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, n. 3, p. C541-66, Sep 2000.

THOMAS, C. P.; ITANI, O. A. New insights into epithelial sodium channel function in the kidney: site of action, regulation by ubiquitin ligases, serum- and glucocorticoid-inducible kinase and proteolysis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 13, n. 5, p. 541-8, Sep 2004.

VAGIN, O.; KRAUT, J. A.; SACHS, G. Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 296, n. 3, p. F459-69, Mar 2009.

VAGIN, O.; TOKHTAEVA, E.; SACHS, G. The role of the beta1 subunit of the Na,K-ATPase and its glycosylation in cell-cell adhesion. **J Biol Chem**, v. 281, n. 51, p. 39573-87, Dec 22 2006.

VALENTICH, J. D. Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. **Ann N Y Acad Sci**, v. 372, p. 384-405, 1981.

VERLANDER, J. W.; MOUDY, R. M.; CAMPBELL, W. G.; CAIN, B. D.; WINGO, C. S. Immunohistochemical localization of H-K-ATPase alpha(2c)-subunit in rabbit kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 281, n. 2, p. F357-65, Aug 2001.

VINCIGUERRA, M.; DESCHENES, G.; HASLER, U.; MORDASINI, D.; ROUSSELOT, M.; DOUCET, A.; VANDEWALLE, A.; MARTIN, P. Y.; FERAILLE,

E. Intracellular Na⁺ controls cell surface expression of Na,K-ATPase via a cAMP-independent PKA pathway in mammalian kidney collecting duct cells. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 7, p. 2677-88, Jul 2003.

VINCIGUERRA, M.; MORDASINI, D.; VANDEWALLE, A.; FERAILLE, E. Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the NA,K-pump in collecting duct principal cells. **Semin Nephrol**, v. 25, n. 5, p. 312-21, Sep 2005.

WAGNER, C. A.; FINBERG, K. E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; GEIBEL, J. P. Renal vacuolar H⁺-ATPase. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1263-314, Oct 2004.

WALL, S. M. Recent advances in our understanding of intercalated cells. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 14, n. 5, p. 480-4, Sep 2005.

WANG, W. H.; GIEBISCH, G. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. **Pflugers Arch**, v. 458, n. 1, p. 157-68, May 2009.

WETZEL, R. K.; SWEADNER, K. J. Immunocytochemical localization of Na-K-ATPase alpha- and gamma-subunits in rat kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 281, n. 3, p. F531-45, Sep 2001.

WUNSCH, S.; GEKLE, M.; KERSTING, U.; SCHURICHT, B.; OBERLEITHNER, H. Phenotypically and karyotypically distinct Madin-Darby canine kidney cell clones respond differently to alkaline stress. **J Cell Physiol**, v. 164, n. 1, p. 164-71, Jul 1995.

YANG, B.; BANKIR, L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 288, n. 5, p. F881-96, May 2005.

YANG, G.; LI, T.; XU, J.; LIU, L. PKC plays an important mediated effect in arginine vasopressin induced restoration of vascular responsiveness and calcium sensitization following hemorrhagic shock in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 628, n. 1-3, p. 148-54, Feb 25 2010.

ZIES, D. L.; GUMZ, M. L.; WINGO, C. S.; CAIN, B. D. The renal H⁺, K⁺-ATPases as therapeutic targets. **Expert Opin Ther Targets**, v. 11, n. 7, p. 881-90, Jul 2007.

10 APÊNDICE A - TABELAS

Tabela 4: Atividade ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) da Na^+ -ATPase e da (Na^++K^+) -ATPase em culturas de células MDCK C11 e C7 semeadas com densidade inicial de 2×10^5 células por poço, incubadas por 24 ou 72 horas.

	Na^+ -ATPase	(Na^++K^+) -ATPase	p valor
MDCK C11			
24 h	18,9±4,8	6,4±1,7	0,03
72 h	30,0±6,1	7,1±2,9	0,02
MDCK C7			
24 h	25,0±4,8	18,0±2,4	0,2
72 h	27,5±4,1	28,2±5,1	0,9

Tabela 5: Comparação das atividades ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) da (Na^++K^+) -ATPase em cultura de células MDCK-C11 e MDCK-C7 semeadas com densidade inicial de 2×10^5 células por poço, incubadas por 24 ou 72 horas.

(Na^++K^+) -ATPase	MDCK-C11	MDCK-C7	p valor
24 h	6,4±1,7	18,0±2,4	0,002
72 h	7,1±2,9	28,2±5,1	0,03

Tabela 6: Atividade ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) de Na^+ -ATPase e (Na^++K^+) -ATPase em cultura de células MDCK C11 e C7 semeadas com densidade inicial de 1×10^6 células por poço, incubadas por 24 horas.

	MDCK C11	MDCK C7	P valor
(Na^++K^+) -ATPase	16,5±3,4	21,4±2,6	0,18
Na^+ -ATPase	32,9±5,2	20,0±2,9*	0,04

Tabela 7: Atividade ($\text{nmol Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) da Na^+ -ATPase em cultura de células MDCK C11 e C7 semeadas com densidade inicial de 2×10^5 células por poço, incubadas por 6 horas em pH alcalino.

	pH 7,4	pH 7,8	P valor
MDCK C7	25,8±4,6	31,0±3,1	>0.05
MDCK C11	22,6±2,5	54,2±9,5	<0.01

11 APÊNDICE B - MANUSCRITO PUBLICADO

Research Article

Lack of Na^+, K^+ -ATPase expression in intercalated cells may be compensated by Na^+ -ATPase: A study on MDCK – C11 cells

M. S. Sampaio, I. P. Bezerra, F. L. Peçanha, P. H. Fonseca, M. A. M. Capella* and A. G. Lopes

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (Brazil),
Fax: 55 (21) 2280-8193, e-mail: mcapella@biof.ufrj.br

Received 09 July 2008; received after revision 03 August 2008; accepted 12 August 2008
Online First 2 September 2008

Abstract. The lack of Na^+, K^+ -ATPase expression in intercalated cells (IC) is an intriguing condition due to its fundamental role in cellular homeostasis. In order to better understand this question we compared the activities of Na^+, K^+ -ATPase and Na^+ -ATPase in two MDCK cell clones: the C11, with IC characteristics, and the C7, with principal cells (PC) characteristics. The Na^+, K^+ -ATPase activity found in C11 cells is far lower than in C7 cells and the expression of its β -subunit is similar in both cells. On the other hand, a

subset of C11 without α -subunit expression has been found. In C11 cells the Na^+ -ATPase activity is higher than that of the Na^+, K^+ -ATPase, and it is increased by medium alkalization, suggesting that it could account for the cellular Na^+ -homeostasis. Although further studies are necessary for a better understanding of these findings, the presence of Na^+ -ATPase may explain the adequate survival of cells that lack Na^+, K^+ -ATPase.

Keywords. Na^+, K^+ -ATPase, Na^+ -ATPase, MDCK-C11, MDCK-C7, intercalated cells.

Introduction

The Na^+, K^+ -ATPase plays an essential role in renal transporting epithelia, generating a transmembrane ionic gradient that drives secondary active transport of different filtered solutes. Although this enzyme has been localized in the basolateral membrane of the majority of cells along the mammalian nephron, several authors could not clearly demonstrate its presence in intercalated cells (IC) of distal tubule and collecting duct [1–4], and even those who were successful agreed that its expression was very low [5, 6]. Due to its fundamental role in the physiological cellular homeostasis, the lack of expression of Na^+, K^+ -

ATPase in IC is an intriguing condition. On the other hand, the furosemide inhibitable, ouabain insensitive Na^+ -ATPase [7, 8] has been detected in proximal tubules and in MDCK cells [9, 10], being modulated by hormones and autacoids such as angiotensin, and adenosine [11–13]. This enzyme could be the alternate molecular mechanism responsible for adequate survival of these cells in the absence of the classical Na^+, K^+ -ATPase sensitive to ouabain. Thus, the objective of the present study was to compare the activities of both sodium ATPases in two MDCK cells clones: C11, with IC characteristics, and C7, with principal cells (PC) characteristics.

* Corresponding author.

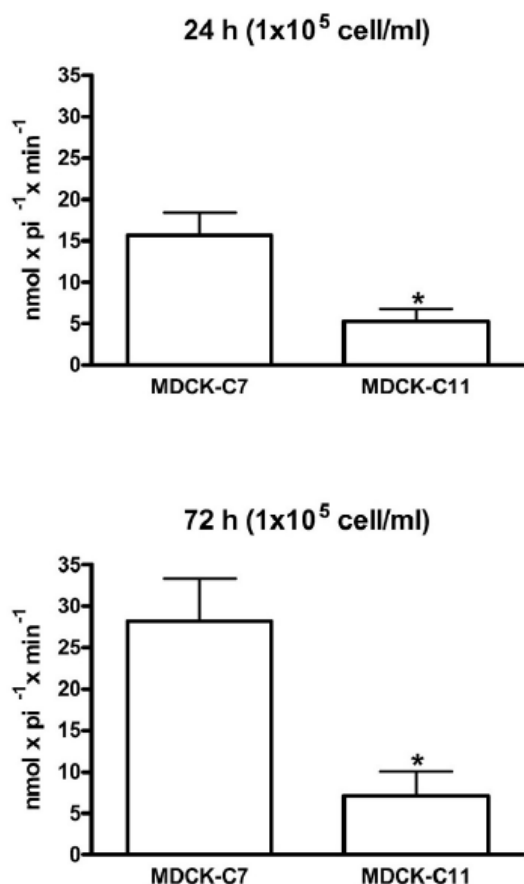


Figure 1. Na⁺,K⁺-ATPase activities of clones MDCK-C11 and MDCK-C7. The cells were plated at low density (1 x 10⁵ cells/ml) in six-well plates and grown for 24 or 72 h. The cells were harvested and the activity of Na⁺,K⁺-ATPase was measured as stated in Material and Methods. * Difference between means statistically significant (p<0.05), n = 6.

Materials and methods

Cells and Culture Conditions. The epithelial cell lines MDCK-C7 and MDCK-C11 were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (GIBCO, USA) with penicillin and streptomycin (GIBCO, USA) and supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA) in disposable plastic bottles, at 37°C, until reaching confluence. For each experiment, the cells were seeded in six-well plates at a concentration of 2 x 10⁵ cells/ml or in 24-well plates at a concentration of 5 x 10⁴ cells/ml.

In some experiments the cells were plated in media adjusted to different pH with NaOH or HCl.

Measurement of ATPase activity. Cells seeded in six-well plates (Corning-Costar Corp, USA) at 2 x 10⁵

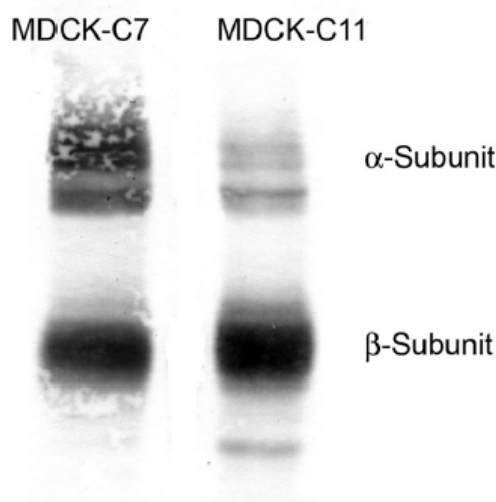


Figure 2. Expression of α 1 and β 1 subunits of Na⁺,K⁺-ATPase in MDCK-C11 and MDCK-C7 cells. A representative immunoblot for α 1 and β 1 subunits of Na⁺,K⁺-ATPase in cellular extracts prepared from MDCK C7 and C11 cells. Blots of whole cell extracts were probed with specific antibodies to α 1 and β 1 subunits of Na⁺,K⁺-ATPase, as described in Material and Methods. Representative blotting obtained from three distinct experiments.

cells/ml and grown for 24 h or 72 h were solubilized in a solution of deoxycholic acid 0.1%, EDTA 1 mM, HEPES-Tris 20 mM and sucrose 250 mM. All the reagents were obtained from SIGMA, USA. The ATPase activity was measured according to the method previously described [9–13]. The reaction was started by the addition of the homogenates to a final protein concentration of 0.1–0.3 mg/ml, and stopped after 10 minutes by the addition of charcoal activated by HCl (0.1 N). The [³²P]Pi released was measured in an aliquot of the supernatant obtained after centrifugation of the charcoal suspension for five minutes at 1,500 g. Spontaneous hydrolysis of [³²P]ATP was measured simultaneously in tubes with no protein added. The Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated from the difference between the [³²P]Pi released in the absence and in the presence of 1 mM ouabain. The Na⁺-ATPase activity was calculated from the difference between the [³²P]Pi released in the absence and in the presence of 2 mM furosemide, both in the presence of 1 mM ouabain. Protein concentrations were determined by the Folin phenol method using bovine serum albumin as a standard.

Western Blot Analysis. The only isoforms of Na⁺,K⁺-ATPase found in the kidneys are the α 1 and β 1 [14]. Moreover, it has been shown that the parental MDCK cells only express the alpha 1 isoform [15]. Therefore, the expression of α 1 and β 1 subunits of Na⁺,K⁺-

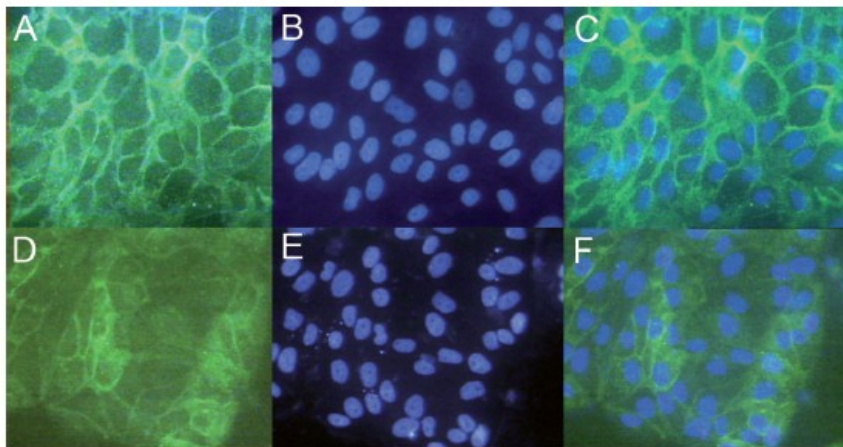


Figure 3. Expression of $\alpha 1$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase in clones C7 and C11, visualized by immunofluorescence. Cells were grown on coverslips and incubated with an antibody to the $\alpha 1$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase, as described in Material and Methods. Upper panels: MDCK-C7 cells; Lower panels: MDCK-C11 cells. Left panels: cells labeled with antibody against the $\alpha 1$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase. Middle panels: the same cells labeled with the nuclear fluorescent dye Hoechst 33258; Right panels: combined images. The figures are representative of three independent experiments.

ATPase in MDCK-C7 and C11 cells was assessed by immunoblotting using specific antibodies (Santa Cruz Biotechnology, USA). After the removal of the culture media, confluent cells were washed three times with PBS (pH 7.4) at room temperature, scraped, and centrifuged at 8,000 *g* for 90 s.

Whole cell extracts were prepared by diluting the cell pellets directly in sample buffer, consisting in 1.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris-Cl) pH 6.8, 0.6 % dithio-L-threitol (DTT), 0.5 % β -mercaptoethanol, and 6 % glycerol. The proteins (20 μg) were immediately submitted to 7.5 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked with Western Breeze blocking solution (Invitrogen, USA) and incubated with specific antibodies to $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of Na^+/K^+ -ATPase (Santa Cruz Biotechnology, USA). The phosphatase alkaline Western Breeze Kit (Invitrogen, USA) was used to visualize the bands in the membranes.

Immunofluorescence. Cells grown on coverslips in 24-well plates for 24 h were fixed and permeabilized with acetone-methanol. After washing, the cells were incubated with 5 % bovine serum albumin (BSA, INVITROGEN, USA) in PBS for 30 minutes, washed and incubated for 2 h with a mouse monoclonal antibody to $\alpha 1$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase (Santa Cruz Biotechnology, USA). After washing, the cells were incubated with ALEXA 488 antimouse secondary antibody (Molecular Probes, Invitrogen, USA) for 30 min. The cells were then washed and incubated with a goat polyclonal antibody to $\beta 1$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase (Santa Cruz Biotechnology, USA) for 2 h, washed and incubated for 30 min with anti-goat ALEXA 546 secondary antibody (Molecular

Probes, Invitrogen, USA). After washing, the cells were mounted on glass slides with an antifading kit (Molecular Probes, Invitrogen, USA) and the fluorescence was visualized under a fluorescence microscope (Axiovert 100, Zeiss, Germany). In some experiments, cells were also labeled with peanut agglutinin (PNA), a marker of β -intercalated cells, or Hoechst 33258, for nuclear staining.

Statistical Analysis. Each experiment was repeated from three to five times. Data are expressed as means \pm standard deviation of the means and were analyzed using Student's *t*-test for comparison of the differences, except for Figure 7, where One-Way ANOVA with Bonferroni's post-test was used. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Figure 1 shows the Na^+/K^+ -ATPase activities in MDCK-C11 and MDCK-C7 cells after 24 h and 72 h of growth. The Na^+/K^+ -ATPase activity increase in MDCK-C7 cells was time dependent during the period of cell culture. However, independent of time, MDCK-C11 cells have significantly lower Na^+/K^+ -ATPase activity when compared with MDCK-C7 cells. In order to verify if this reduced activity could be due to a diminished expression of the α -subunit of Na^+/K^+ -ATPase in clone C11, an immunoblotting was performed for α and β subunits. Figure 2 shows that, although the two clones have approximately the same amount of β -subunit, MDCK-C11 cells possess much less α -subunit than MDCK C7 cells. This result suggests that the reduced activity of Na^+/K^+ -ATPase in C11 cells is either due to a homogeneous reduced expression of the α -subunit in the population or that, on the other hand, some cells in

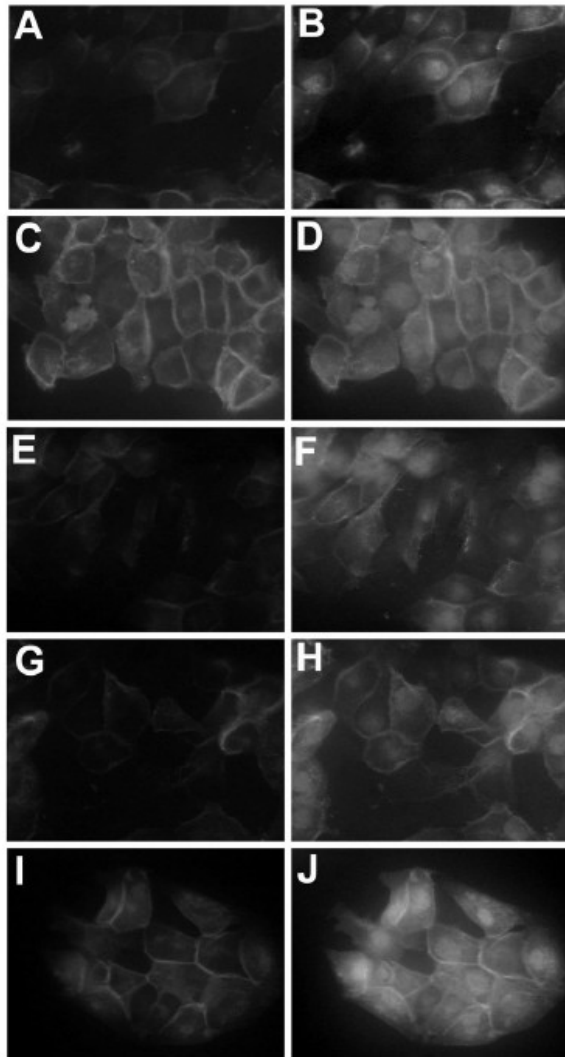


Figure 4. Expression of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of Na⁺,K⁺-ATPase in MDCK-C11 cells, visualized by immunofluorescence. Cells were grown on coverslips and incubated sequentially with antibodies to the $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of Na⁺,K⁺-ATPase, as described in Material and Methods. Left panels: cells labeled with antibody to the $\alpha 1$ -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. Right panels: the same cells labeled with antibody to the $\beta 1$ -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. The figures are representative of three independent experiments.

clone C11 express very low amounts of the α -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. To further study this issue, the expression of the α -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase in both clones was observed by fluorescence microscopy. As can be seen in Figure 3, the α -subunit is present at cell membranes of almost all MDCK-C7 cells (Figure 3 A–C). However, although some MDCK-C11 cells considerably express the α -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase, the majority of the cells have very low expression and there are some cells in clone C11 that virtually do not express this subunit (Figure 3 D–F).

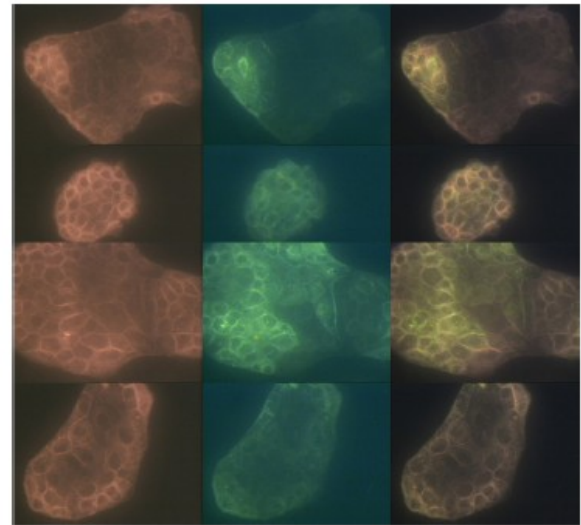


Figure 5. Co-expression of $\alpha 1$ subunit of Na⁺,K⁺-ATPase and peanut agglutinin (PNA) in C11 cells, visualized by immunofluorescence. Cells were grown on coverslips and incubated with an antibody to the $\alpha 1$ subunit of Na⁺,K⁺-ATPase and PNA, as described in Material and Methods. Left panels: cells labeled with antibody to the $\alpha 1$ -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. Middle panels: the same cells labeled with PNA; Right panels: combined images. The figures are representative of three independent experiments.

These results confirm that the reduced activity of Na⁺,K⁺-ATPase in C11 cells is due to reduced expression of the α -subunit. However, since the β -subunit was almost equally expressed in the two cell lines, as seen by immunoblotting, the expression of α and β subunits in MDCK-C11 was also observed by immunofluorescence. Figure 4 shows photographs of C11 cells labeled with anti- α (left panel) and anti- β (right panel) antibodies. Actually we see that there are several cells in clone MDCK-C11 that virtually do not express the α -subunit, although they express the β -subunit.

It has been shown that the majority of cells in clone C11 have characteristics of type β -intercalated cells, although the cells are not homogenous, as expected for a cloned cell line [16]. Moreover, it is known that β -intercalated cells may differentiate to type α -intercalated cells in culture [17–20]. Therefore, to evaluate whether the expression of the α -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase in C11 cells is restricted to type α or type β intercalated cells, the cells were labeled for the α -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase and PNA, a marker of β -intercalated cells. As can be seen in Figure 5, the majority of C11 cells expressing the α -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase was also labeled with PNA, strongly suggesting that type β -intercalated cells are the ones expressing the α -subunit of Na⁺,K⁺-ATPase.

As Na⁺,K⁺-ATPase is thought to be fundamental for the maintenance of low intracellular Na⁺ concentration, the

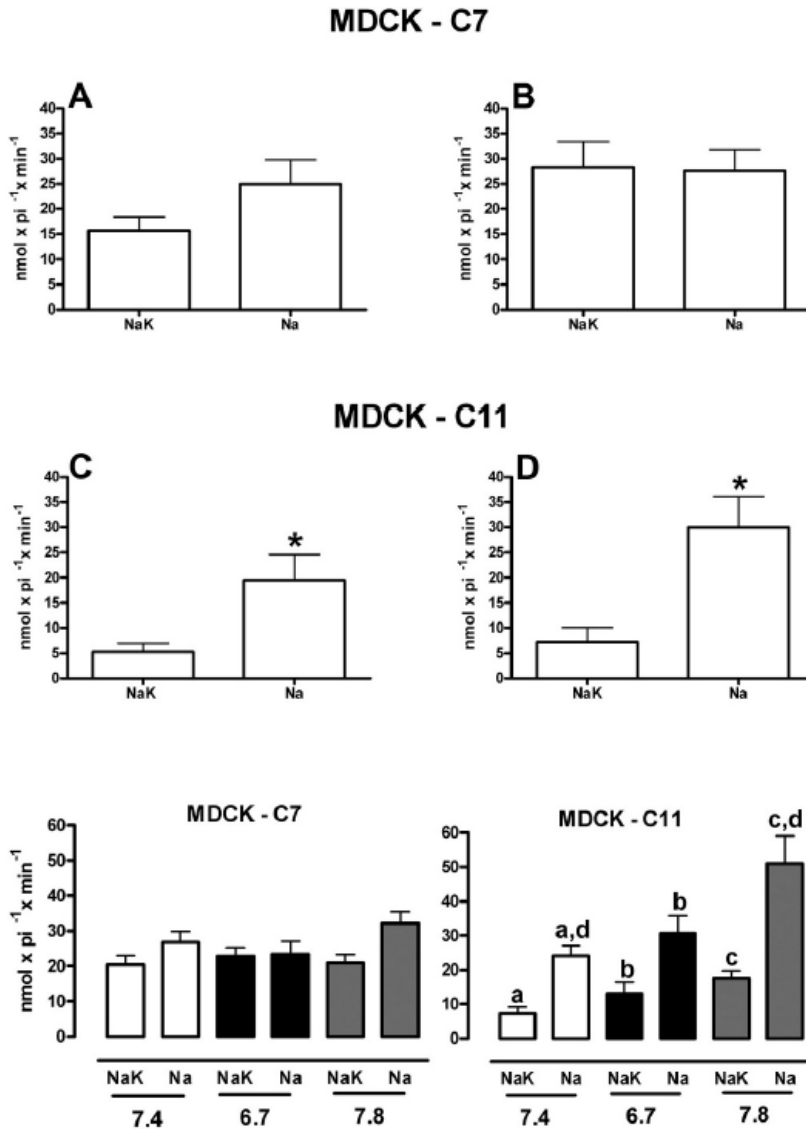


Figure 6. Comparison of Na⁺,K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase activities in MDCK-C7 and MDCK-C11 cells. Cells (2 x 10⁵ cells/ml) were plated in six-well plates and incubated for 24 or 72 h. The activities of Na⁺,K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase were measured as stated in Material and Methods. A,C – 24 h of incubation; B,D – 72 h of incubation. * Statistically different in relation to the control (p<0.05), n = 6.

Figure 7. Variation of Na⁺,K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase activities in MDCK-C7 and MDCK-C11 cells with pH. The cells were grown for 24 h in media at pH = 6.7 (acidic); 7.4 (normal) and 7.8 (alkaline) and the activities of Na⁺,K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase were measured as stated in Material and Methods. Same letters: statistically different between each other (p<0.05), n = 6.

absence of this protein could result in loss of viability. However, there is no evidence that this occurs, because the viability of a culture of MDCK-C11 cells is always ≥ 95 %, similar to that of MDCK-C7 (data not shown). A possible explanation is that the expression of the second Na⁺-pump [7–10] could be responsible for Na⁺ handling in these cells. Therefore, we tested whether MDCK-C11 cells possess Na⁺-ATPase activity. Figure 6 shows that both Na⁺-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in MDCK-C7 cells are similar, while the activity of Na⁺-ATPase in C11 cells is about four-times greater than that of Na⁺,K⁺-ATPase, suggesting that this protein might be mainly responsible for intracellular Na⁺ handling in MDCK-C11 cells.

Intercalated cells are involved in acid-base balance. While type α-intercalated cells are involved in H⁺ secretion and HCO₃⁻ reabsorption, type β cells are thought to secrete HCO₃⁻ and reabsorb H⁺. In all other renal epithelial cells the transport of ion and molecules is secondary to the Na⁺ gradient originating from the basolateral Na⁺,K⁺-ATPase. Therefore, it may be reasonable to hypothesize that the Na⁺-ATPase is the Na⁺ transport mechanism present in intercalated cells, since the expression of Na⁺,K⁺-ATPase in such cells is very low or even non-existent [1–6]. To evaluate the significance of Na⁺-ATPase in acid-base regulation in intercalated cells, the clones C7 and C11 were exposed to acidic or alkaline pH and the activities of both

Na⁺,K⁺-ATPase and Na⁺-ATPase were measured. Indeed, as can be seen in Figure 7, the activity of Na⁺-ATPase was greatly increased at alkaline pH in clone C11, but no significant alteration was observed in the activity of Na⁺,K⁺-ATPase. In no situation did MDCK-C7 present any significant alteration.

Discussion

The maintenance of a low intracellular Na⁺ concentration against its gradient has fundamental importance to a cell, and this feature is due to the presence of Na⁺,K⁺-ATPase in the majority of the cells. For a long time the very low expression or even absence of Na⁺,K⁺-ATPase in intercalated cells of collecting duct has intrigued researchers, and several of them have made intensive, although unsuccessful, efforts to show its presence in these cells [1–4]. Even those authors able to demonstrate the expression of Na⁺,K⁺-ATPase in IC cells agreed that this expression was very low [5, 6]. All those studies were performed in renal tissue or in isolated tubules, which might complicate the visualization of this protein. In the present work, we have studied a previously cloned renal cell line that retains characteristics of IC [16]. Using this approach, we have shown that the Na⁺,K⁺-ATPase activity of MDCK-C11 cells (which retain characteristics of intercalated cells) is far lower than that of MDCK-C7 cells (which retain characteristics of principal cells). We have also shown that, although the expression of the β-subunit of Na⁺,K⁺-ATPase was similar in clones C11 and C7, there is a subset of MDCK-C11 cells that virtually does not express the α-subunit. This subset seems to be of type α or non-α non-β intercalated cells, because cells labeling for α-subunit of Na⁺,K⁺-ATPase are also labeled for PNA, a marker of type β-intercalated cells. This result agrees with literature that shows low or no expression of Na⁺,K⁺-ATPase in IC, for in a normal kidney the type α intercalated cells are dominant. On the other hand, we have also observed that the activity of the furosemide inhibitable, ouabain insensitive Na⁺-ATPase was much higher than that of Na⁺,K⁺-ATPase, supporting the hypothesis that the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase could account for the Na⁺-homeostasis in intercalated cells. Moreover, the alkalinization of the medium led to a great increase in Na⁺-ATPase activity only in MDCK-C11 cells, corroborating the hypothesis that this second pump is of crucial importance for the homeostasis of intercalated cells. Gekle et al. [16] showed that under chronic alkaline stress MDCK-C7 cells were unable to maintain their intracellular pH within normal limits, suffering genetic and morphologic alteration, while MDCK-C11 cells were able to

regulate their intracellular pH. The great increase in Na⁺-ATPase activity in MDCK-C11 cells and no alteration in its activity in MDCK-C7 cells suggest that this protein may be involved in pH regulation in intercalated cells.

Maintaining low intracellular sodium concentrations is vital for almost all organisms. In animals Na⁺ efflux is generally governed by Na⁺,K⁺-ATPase and in fungi by a Na⁺-ATPase, called ENA [21, 22]. In the latter, increased activity of Na⁺-ATPase with medium alkalinization was observed, suggesting that this enzyme is essential for their survival under high pH environment [21, 22]. Although the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase has not been cloned so far in mammals, our results suggest that its function may be similar in mammalian cells. Although more studies must be performed to fully clarify our findings, the presence of the Na⁺-ATPase may explain the reason why a renal epithelial cell with no Na⁺,K⁺-ATPase expression is able to maintain its viability.

Acknowledgments. This work was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Oncobiologia (FECD/FAF/ONCO II), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- 1 Kashgarian M., Biemesderfer D., Caplan M., Forbush B. III (1985) Monoclonal antibody to Na/K-ATPase: Immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int.* 28(6), 899–913.
- 2 Holthofer H., Schulte B. A., Pasternak G., Siegel G. J., Spicer S. A. (1987) Three distinct cell populations in rat kidney collecting duct. *Am. J. Physiol.* 253(2 Pt 1), C323–C328.
- 3 Piepenhagen P. A., Peters L. L., Lux S. E., Nelson W. J. (1995) Differential expression of Na⁺-K⁺-ATPase, ankyrin, fodrin, and E-cadherin along the kidney nephron. *Am. J. Physiol.* 269:(6 Pt 1), C1417–C1432.
- 4 Buffin-Meyer B., Verbavatz J.-M., Cheval L., Marsy S., Younes-Ibrahim M., Le Moal C., Doucet A. (1998) Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase in the rat outer medullary collecting duct during potassium depletion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9(4), 538–550.
- 5 Ridderstrale Y., Kashgarian M., Koeppen B., Giebisch G., Stetson D., Ardito T., Stanton B. (1988) Morphological heterogeneity of the rabbit collecting duct. *Kidney Int.* 34(5), 655–670.
- 6 Sabolic I., Herak-Kramberger C. M., Breton S., Brown D. (1999) Na⁺,K⁺-ATPase in Intercalated Cells along the Rat Nephron Revealed by Antigen Retrieval. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10(5), 913–922.
- 7 Preiss R., Busse E., Banaschak H. (1979) An ouabain-insensitive Na-ATPase of the arterial vascular muscle cell and its relation to ouabain-sensitive Na,K-ATPase. *Acta Biol. Med. Ger.* 38(10), 1387–1397.
- 8 Del Castillo J. R., Marín R., Proverbio T., Proverbio F. (1982) Partial characterization of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 692(1), 61–88.
- 9 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(12), 1586–1593.

- 10 De Souza A. M., Carvalho T. L., Sabino P. M., Vives D., Fontes C. F., Lopes A. G., Caruso-Neves C. (2007) Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na⁽⁺⁾-ATPase in MDCK I cells. *Biochimie* 89(11), 1425–1432.
- 11 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 (1–2), 309–319.
- 12 Caruso-Neves C., Francisco-Pedro L. G., Souza L. P., Chagas C., Lopes A. G. (1997) Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 1329(2), 336–344.
- 13 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(1), 189–197.
- 14 Lingrel J.B. (1992) Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *J Bioenerg. Biomembr.* 24(3), 263–270.
- 15 De Souza A. M., Carvalho T.L., Sabino P. M., Vives D., Fontes C. F., Lopes A. G., Caruso-Neves C. (2007) Characterization and partial isolation of ouabain-insensitive Na⁽⁺⁾-ATPase in MDCK I cells. *Biochimie* 89(11), 1425–1432.
- 16 Gekle M., Wunsch S., Oberleithner H., Silbernagl S. (1994) Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch.* 428(2) 157–162.
- 17 Wagner C. A., Finberg K. E., Breton S., Marshansky V., Brown D., Geibel J. P. (2004) Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol. Rev.* 84(4), 1263–1314.
- 18 Al-Awqati Q., Vijayakumar S., Hikita C., Chen J., Takito J. (1998) Phenotypic plasticity in the intercalated cell: the hensin pathway. *Am. J. Physiol.* 275(2 Pt 2), F183-F190.
- 19 Schwartz G. J., Tsuruoka S., Vijayakumar S., Petrovic S., Mian A., Al-Awqati Q. (2002) Acid incubation reverses the polarity of intercalated cell transporters, an effect mediated by hensin. *J. Clin. Invest.* 109(1), 89–99.
- 20 Vijayakumar S., Takito J., Gao X., Schwartz G. J., Al-Awqati Q. (2006) Differentiation of columnar epithelia: the hensin pathway. *J. Cell. Sci.* 119(Pt 23), 4797–4801.
- 21 Caracul Z., Casanova C., Roncero M. I., Di Pietro A., Ramos J. (2003) pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na⁺-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* 2(6), 1246–1252.
- 22 Platara M., Ruiz A., Serrano R., Palomino A., Moreno F., Ariño J. (2006) The transcriptional response of the yeast Na⁽⁺⁾-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 281(48), 36632–36642.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/CMLS>

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

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](#)