Claudia Ferreira dos Santos Ruiz Figueiredo

**PAPEL DA PROTEÍNA QUINASE C (PKC) NA MODULAÇÃO
DA ISOFORMA 1 DO PERMUTADOR Na^+ - H^+ (NHE1),
EM CÉLULAS MDCK**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Fisiologia Humana).**

SÃO PAULO

2008

RESUMO

FERREIRA-FIGUEIREDO, C. S. R. **Papel da Proteína quinase C (PKC) na Modulação da Isoforma 1 de Permutador Na⁺- H⁺ (NHE1), em Células MDCK.** 90 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2008.

O presente trabalho visa contribuir para o esclarecimento da seqüência de eventos intracelulares produzidos pelas PKCs α e ϵ , na modulação do pH_i , via NHE1. Os estudos foram realizados em células MDCK e as medidas de pH_i efetuadas por microscopia de fluorescência. A expressão das PKCs α e ϵ , bem como do NHE1 foi investigada por western blot, utilizando anticorpos específicos para cada proteína. Os estudos foram realizados na situação controle ou na vigência de PMA ou ANG II, AVP e /ou inibidores específicos para cada receptor hormonal ou isoforma de PKC. Nossos resultados indicam que PMA (10^{-7} M) estimula a recuperação do pH_i , por modular a atividade das PKCs α e ϵ . ANG II e AVP em concentrações fisiológicas estimulam a recuperação do pH_i após sobrecarga ácida, concomitante com o aumento da fosforilação da PKC α . Em concentração elevada, ambos hormônios não alteram estes parâmetros. O efeito de ANG II ou de AVP depende da interação de cada hormônio com receptores específicos para modular as vias de sinalização celular envolvidas com o aumento dos níveis de diacilglicerol e cálcio citosólico.

Palavras-chave: Angiotensina II, Arginina Vasopressina, Células MDCK, NHE1, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), Isoformas de PKC.

ABSTRACT

FERREIRA-FIGUEIREDO, C. S. R. **Role of PKC on Na⁺-H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) modulation in MDCK cells.** 90 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The purpose of this work was to investigate the signaling events of PKCs α e ϵ on the NHE1 activity. The effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), angiotensin II (ANG II) or arginine vasopressin (AVP) on the intracellular pH (pH_i) was investigated in MDCK cells by using the fluorescence microscopy and fluorescent probe BCECF/AM. The NHE1 or PKCs α e ϵ expression was examined by western blot and specific antibodies. Our results indicate that PMA (10^{-7}M) or low concentration of ANG II and AVP induced a significant increase of pH recovery rate and PKC α expression, after intracellular acidification with NH_4Cl pulse. ANG II or AVP did not change the PKC ϵ expression. However, in right concentration, both hormones did not change these parameter. In conclusion, the effect of ANG II and AVP on NHE1 activity, depend of specifics membrane receptors and cellular signaling of intracellular calcium, DAG and PKCs α or ϵ .

Key words: Angiotensin II, Arginine Vasopressin, MDCK cells, NHE1, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, PKC isoforms.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

No organismo, a maioria dos produtos catabólicos, são ácidos e por isso, o indivíduo necessita de mecanismos que evitem primordialmente a queda do pH intracelular (pH_i), assegurando o adequado funcionamento dos processos bioquímicos celulares. O rim, favorecendo a excreção de radicais ácidos, exerce papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo (RECTOR, 1983; MALNIC, 1987). Os mecanismos que contribuem para a regulação do pH_i são amplamente estudados e dependem tanto de transportadores iônicos localizados na membrana plasmática ($\text{Na}^+\text{-H}^+$, $\text{H}^+\text{-ATPase}$, $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ e $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$, além dos canais para Cl^- , K^+ , Ca^{2+} e Na^+) como dos tampões intracelulares (KURTZ e GOLCHINI, 1987; SCHUSTER et al., 1991).

O túbulo distal cortical de rins de mamíferos apresenta importante papel no processo de acidificação tubular. O néfron distal é formado pela porção inicial (túbulo distal convoluto) e porção final (segmento de conexão e ducto coletor). O túbulo distal convoluto contém apenas um tipo de células, similares às do ramo ascendente da alça de Henle (MOREL et al., 1992), que possuem anidrase carbônica. O segmento de conexão possui células intercalares e o ducto coletor é composto por células principais e células intercalares, ricas em anidrase carbônica (LOENNERHOLM e RIDDERSTRALE, 1980). Conforme esquema proposto na **Figura 1**, as células principais são responsáveis pela reabsorção de Na^+ e secreção de K^+ . As células intercalares alfa (α) secretam H^+ e as intercalares beta (β) podem secretar bicarbonato (GEKLE et al., 1994).

Figura 1: Esquema representativo das células do ducto coletor. **CP**- Células Principais; **CI a** - Células Intercalares do tipo alfa; **CI b** - Células Intercalares do tipo beta, **TJ** - Tight Junction e **AC**- Anidrase Carbônica.

A regulação do pH_i se faz por mecanismos complexos que dependem do tipo celular considerado. Entretanto, o permutador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ é de fundamental importância na restauração do pH_i em resposta a uma carga ácida (POUYSSÉGUR et al., 1984), sendo a extrusão celular de H^+ assegurada, principalmente, pela alta sensibilidade desse permutador ao H^+ citosólico e ao gradiente de Na^+ mantido pela $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

A seguir serão abordados os principais dados da literatura envolvendo a função do permutador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ na regulação do pH_i , em cultura de células.

1.2 Permutador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE)

O permutador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ é uma proteína que na membrana, desempenha várias funções básicas, tais como: manutenção do pH_i e regulação do volume celular. Em pH_i fisiológico não se verifica pronunciada atividade do permutador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, provavelmente porque esta proteína deve funcionar no seu ritmo basal, com atividade de transporte reduzida e apenas adequada à manutenção do pH_i . No entanto, quando ocorre produção metabólica exacerbada de ácidos ou um aumento da concentração intracelular de H^+ , o permutador é rapidamente ativado e alcança sua taxa máxima de transporte quando o nível de acidificação celular está por volta de uma unidade de pH_i , menor que o meio extracelular (NOEL e POUYSSÉGUR, 1995). Em mamíferos, já foram identificadas 9 isoformas do permutador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHE_1 – NHE_9) (SARDET et al., 1989; TSE et al., 1992; TSE et al., 1993; ORLOWSKI et al., 1992 e 1997; WANG et al., 1993; KLANKE et al., 1995; NUMATA et al., 2001; GOYAL et al., 2003).

Existe similaridade entre as várias isoformas, uma vez que todas apresentam um longo domínio amino-terminal, 10 a 12 segmentos transmembrânicos e um domínio carboxi-terminal. O domínio amino-terminal é altamente conservado (40-70%) entre as diversas isoformas e compõe o núcleo catalítico da proteína. A porção que compreende o domínio carboxi-terminal é menos conservada (10 a 20%), participa da modulação do transporte iônico por diversos agentes (tais como fatores de crescimento, hormônios e alterações osmóticas) e possui sítios de fosforilação capazes de interagir com diferentes proteínas quinases [como as quinases A (PKA), C (PKC) e o complexo Ca^{2+} -calmodulina quinase]. Estas quinases modulam o permutador por interação com sítios específicos. Em mamíferos, todas as isoformas

são eletroneutras, com estequiometria de $1\text{Na}^+:1\text{H}^+$ (portanto, não geram diferença de potencial transmembranal) Porém, foram identificadas algumas diferenças entre as várias isoformas, tais como: resposta aos segundos mensageiros, sensibilidade a amilorida e distribuição tecidual (LEVINE et al., 1993, ORLOWSKI e KANDASAMY, 1997).

A regulação do pH_i é feita principalmente pela isoforma 1 do permutador Na^+-H^+ (NHE1), cuja estrutura encontra-se representada na **figura 2**. Essa isoforma corresponde a uma glicoproteína de 110 kDa (SARDET et al., 1989, 1990), cujo domínio amino-terminal (NH_2), denominado unidade de transporte é altamente sensível a amilorida; seu domínio carboxi-terminal (COOH) ou regulatório, apresenta grande sensibilidade a vários sinais extracelulares (WAKABAYASHI et al., 1992, 1994; BIANCHINE et al., 1995). Acredita-se que essa isoforma tenha distribuição ubíqua em todas as células de vertebrados, sendo nas células epiteliais, preferencialmente, localizada na membrana basolateral (TSE, et al., 1991; BOOKSTEIN et al., 1994). Assim, no rim, essa isoforma encontra-se na membrana basolateral de todas as células dos múltiplos segmentos do néfron (BIEMESDERFER et al., 1992).

Figura 2: Estrutura proposta para a isoforma 1 do permutador Na^+-H^+ (NHE1), apresentando 12 segmentos transmembrânicos e os domínios amino-terminal e carboxi-terminal, localizados no citosol.

1.3 Células MDCK

Em 1959, Madin e Darby decidiram estudar, pela primeira vez, a cultura de células obtidas de segmentos distais dos néfrons de rins de cães, denominando-as células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) (GAUSH et al., 1966). As células MDCK constituem uma linhagem celular permanente e quando cultivadas formam monocamadas com propriedades morfofuncionais similares ao epitélio do néfron distal (CEREIJIDO et al., 1978; WHITE et al., 1992; GEKLE et al., 1994), sendo amplamente utilizadas como modelo para estudos da função celular do epitélio desse segmento.

Quando confluem, as células MDCK formam "tight junctions" preferencialmente condutivas ao sódio (DEEN et al., 1997). Vários estudos demonstram na membrana plasmática dessas células, diferentes transportadores: $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (isoforma NHE_1 , basolateral, sensível ao amilorida), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$, $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{H}^+ - \text{ATPase}$ e $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, além dos canais para Cl^- , K^+ , Ca^{2+} e Na^+ (OBERLEITHNER et al., 1990; POUYSSÉGUR, 1994; FERNANDEZ e MALNIC, 1998). CASAVOLA et al., (1992) já haviam indicado a importância de vários hormônios na regulação do transporte iônico transepitelial nessas células.

1.4 Ação hormonal na regulação do pH_i

Acredita-se que os hormônios como Angiotensina (ANG II) e Arginina Vasopressina (AVP), participam dos mecanismos de regulação do pH_i , por modular vias de sinalização intracelular, responsáveis pelo controle da atividade dos transportadores $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$, $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ e $\text{H}^+ - \text{ATPase}$. Entre as principais vias, estão aquelas que proporcionam alterações nos níveis de AMPc, Cálcio Citosólico e Óxido Nítrico (LIU & COGAN, 1990; DOUGLAS & HOPFER, 1994; BARRETO-CHAVES & MELLO-AIRES, 1997, OLIVEIRA-SOUZA & MELLO-AIRES, 2000 e 2001, HAKAM & HUSSAIN, 2005; CAREY et al, 1999).

1.5 Angiotensina II (ANG II)

A ANG II é um octapeptídeo fisiologicamente ativo com múltiplas funções orgânicas. Além do controle hemodinâmico, a ANG II induz o aumento da reabsorção de Na^+ , da ingestão e retenção renal de água e conseqüente, elevação do volume do fluido extracelular.

O efeito da ANG II nos vários segmentos do néfron depende de sua interação com receptores de alta afinidade (DOUGLAS, 1987). Esses receptores são classificados em 2 tipos: AT1 e AT2, cujas atividades estão acopladas à proteína G (DOUGLAS e HOPFER, 1994). Ambos receptores apresentam alta homologia entre as espécies (KAMBAYASHI et al., 1993; NAKAJIMA et al., 1993). Porém, são diferentes quanto a seqüência de aminoácidos, embora a melhor diferenciação entre estes subtipos, seja feita pelos seus perfis de ligação e resposta à ligantes específicos. O receptor AT1 tem alta afinidade pelo antagonista não peptídico losartan (PERLAN et al., 1995), enquanto que o AT2 liga-se preferencialmente ao antagonista peptídico PD 123319 (TIMMERMANS et al., 1992).

O receptor AT1 tem papel importante sobre a via de sinalização que modula os clássicos eventos fisiológicos e patológicos da ANG II, tais como contração de células do músculo liso vascular, liberação de aldosterona pelas células da zona glomerulosa na glândula adrenal e crescimento celular (TIMMERMAN et al., 1992). Por outro lado, sabe-se que após um estímulo, o receptor AT1 poderá ser dessensibilizado e internalizado (HOLLOWAY et al., 2002). A ANG II liga-se ao receptor AT1 e via ativação da fosfolipase C (PLC), inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), induz aumento dos níveis de cálcio citosólico e ativa a proteína quinase C (PKC). A ANG II via receptor AT1, também pode estimular a liberação de ácido aracdônico (AA), por ativação da fosfolipase A2 (PLA2), mediada pela proteína G. O AA também eleva os níveis de cálcio citosólico, principalmente por ativar canais de Ca^{2+} na membrana plasmática, sensíveis à voltagem (DOUGLAS e HOPFER, 1994; HOULLIER et al., 1996; OLIVEIRA-SOUZA e MELLO AIRES, 2000). Esses dados sugerem que o efeito da ANG II sobre a PKC ou níveis de cálcio no citosol, pode estar associado com a modulação da atividade do permutador Na^+/H^+ .

O receptor AT2 tem sua atividade associada aos estágios de desenvolvimento fetal (SESHI et al., 2002) e em adultos, ocorre principalmente no

pâncreas, coração, rim, adrenais, cérebro e vasos. Recentemente, foi demonstrado a importância do receptor AT2 nos processos biológicos, tais como relaxamento vascular, anti-proliferação, diferenciação celular e apoptose (CAREY, 2005). Após um estímulo, o receptor AT2 diferentemente do AT1, não é internalizado (MIURA e KARNIK, 2002) e ao ser ativado, induz efeitos diferentes e opostos aos do receptor AT1, sugerindo vias distintas de transdução de sinal (NAKAJIMA et al., 1993 e ISHII et al., 2001). As vias de sinalização mediadas pelo receptor AT2 ainda não são muito claras. Porém, há indícios de que os receptores AT1 e AT2 formam dímeros, o que resulta na inibição do AT1, independente da presença do agonista (ANG II) (ABDALLA et al., 2001; OUCHI et al., 2004). Outra possibilidade é que, a ANG II liga-se ao receptor AT2 e via ativação da proteína G_s /PLA2, potencializa a liberação de AA. O receptor AT2 pode também interagir com a proteína G para induzir a queda da atividade da adenilato ciclase (AC) e nesta condição, os níveis de AMPc intracelular estão reduzidos, o que facilita a atividade da isoforma 1 do permutador Na^+-H^+ .

1.6 Hormônio Antidiurético (ADH) ou Arginina Vasopressina (AVP)

O Hormônio antidiurético (ADH) é um peptídeo formado por nove aminoácidos. Como a primeira função descrita para esse hormônio foi uma ação vasopressora, o ADH humano é também denominado arginina vasopressina (AVP). Em nossos estudos, o nome desse hormônio será sempre mencionado como arginina vasopressina. A AVP é primariamente sintetizada nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo. Daí é transportada e armazenada na neuro-hipófise, de onde é secretada para a circulação. A secreção de AVP pela neuro-hipófise pode ser influenciada por muitos fatores, entre os quais, a osmolaridade plasmática, o volume e pressão sanguíneos.

No rim, em especial no ducto coletor, a AVP atua regulando o volume e a osmolaridade da urina, por modular a reabsorção tubular de água e eletrólitos (YOSHITOME et al., 1996). A resposta de AVP depende de sua interação com receptores do tipo V_1 e V_2 , localizados na membrana celular.

Em concentrações baixas (10^{-12} ou 10^{-11} M) a AVP liga-se ao receptor V_2 das células principais do ducto coletor, ativa a adenilato ciclase (AC) que por sua vez, induz um aumento dos níveis de AMPc. Nessa condição, o AMPc estimula a PKA e

conseqüentemente, modula a inserção e atividade de canais de água do tipo 2 (aquaporina 2) (ANDO et al., 1989; DEEN et al., 1997; LEMOS et al., 1997; SCHRIER et al., 1998). Em concentrações elevadas (10^{-9} , 10^{-7} ou 10^{-6} M), a AVP liga-se ao receptor V_2 para potencializar a via de ativação da AC, AMPc e PKA. Em muitas células epiteliais, esta condição contribui para um grande aumento dos níveis de cálcio no citosol, principalmente por ativar canais de Ca^{2+} na membrana apical (BREYER e FREDIN, 1991; BAAL et al., 1996; HOLDA et al., 1998). Dessa forma, tanto o cálcio muito elevado como a PKA, podem reduzir a atividade do permutador $Na^+ - H^+$ (CASAVOLA et al., 1997).

Segundo Casavola et al. (1992), Borensztein et al. (1993), Burgess et al. (1994), Oliveira-Souza e Mello - Aires (2001) a AVP em concentração fisiológica (10^{-12} M) liga-se também ao receptor do tipo V_1 , ativa a via da PLC, IP3 e DAG, induz um pequeno aumento dos níveis de cálcio citosólico e ativa a PKC. Esta condição é bastante favorável para a estimulação do permutador $Na^+ - H^+$ na membrana basolateral. Dados da literatura apresentados por (BURGESS et al., 1994; COPPOLA e FRÖMPETER, 1994, SCHONEBERG et al., 1998; OLIVEIRA-SOUZA e MELLO AIRES, 2001), mostram que AVP em concentrações mais elevadas (10^{-9} , 10^{-7} ou 10^{-6} M) liga-se ao receptor V_1 potencializa a via de ativação da PLC, IP3 e DAG bem como a via de ativação da PLA_2 e AA. Nessas condições, ocorre um grande aumento dos níveis de cálcio no citosol e conseqüentemente, moderação na atividade do permutador $Na^+ - H^+$ e do co-transporte $Na^+ - HCO_3^-$ na membrana basolateral.

1.7 Proteína quinase C (PKC)

A PKC é uma quinase que fosforila resíduos serina e treonina em proteínas substratos, resultando em modulação funcional das mesmas. Na década de 70, a PKC foi identificada como uma proenzima que requer concentrações milimolares de cálcio para sua atividade, daí o nome. A PKC é uma enzima amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em praticamente todos os tecidos de mamíferos estudados. Atualmente, sabe-se que a PKC faz parte de uma grande família de proteínas, com várias isoformas que apresentam características enzimológicas sutilmente individuais. A família PKC é atualmente classificada em 4 grupos (SALAMANCA et al., 2005):

- 1) convencionais ou cPKCs: α , β , and γ , as quais são ativadas por Ca^{2+} , fosfatidilserina (PS) e diacilglicerol (DAG) ou éster de forbol;
- 2) novas ou nPKCs: δ , ϵ , η e θ , as quais são ativadas por PS e DAG ou éster de forbol, mas são independentes de Ca^{2+} ;
- 3) atípicas ou aPKCs: ζ e λ/τ , as quais são Ca^{2+} -independentes e insensíveis a DAG ou éster de forbol, mas são ativadas por PS;
- 4) PRKs: semelhantes às atípicas, são insensíveis a Ca^{2+} , DAG e éster de forbol, sendo ativadas pelas proteínas G monoméricas, Rho.

No rim, as diferentes isoformas de PKC estão relacionadas com o controle hemodinâmico e de vários mecanismos de transporte. Dados da literatura mostram que em túbulo proximal de rato, as PKCs α e β modulam a atividade do permutador Na^+/H^+ (NHE3), localizado na membrana de borda-em-escova. Por outro lado, Balboa et al (1994, 1995 e 1998) identificaram 5 isoformas de PKC em células MDCK [α (a), β (b), δ (d), ζ (?) e ϵ (e)]. Além disso, observaram que nessas células, a epinefrina estimula a translocação das isoformas a ou e.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que:

- Na situação controle, após a acidificação celular por NH_4Cl , a recuperação do pH_i é de $0,187 \pm 0,006$ (81) unidades de pH/min e depende da atividade do permutador Na^+-H^+ .
- As células MDCK expressam as isoformas de PKC α , β , δ , ϵ e ζ .
- O PMA estimula o NHE1 por permitir a fosforilação das PKCs α e ϵ .
- A ANG II (10^{-12} M), aumenta significativamente a recuperação do pH_i , por interagir com receptores AT1 ou AT2, e induzir um pequeno aumento dos níveis de cálcio e DAG. Esses mensageiros podem modular proteínas ativadoras do NHE1.
- A ANG II (10^{-9} M), aumenta significativamente a recuperação do pH_i , por interagir com receptores AT1 ou AT2, e induzir aumento dos níveis de cálcio e DAG, e conseqüentemente, estimular a PKC α , que por sua vez, fosforila o NHE1.
- A ANG II (10^{-6} M), não altera a recuperação do pH_i , mas estimula a fosforilação da PKC α , que nessa condição, pode estar envolvida com a internalização dos receptores AT1.
- O efeito de ANG II sobre a recuperação do pH_i não depende dos níveis de expressão ou fosforilação da PKC ϵ . Sugerindo a participação de outra isoenzima independente de cálcio.
- A AVP (10^{-12} M), aumenta significativamente a recuperação do pH_i , por interagir com receptores V1 e V2, e induzir aumento dos níveis de cálcio e DAG. Porém seu efeito sobre a fosforilação das PKCs α e ϵ , não foi evidenciado em nosso modelo experimental, sugerindo uma possível participação da isoforma β_1 sobre a atividade do NHE1.
- A AVP (10^{-6} M), não altera a recuperação do pH_i , mas induz aumento da fosforilação da PKC α , indicando uma possível participação dessa isoenzima, na dessintetização ou internalização de receptores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, Y.; BREYER, M. D.; JACOBSON, H. R. Dose-dependent heterogenous actions of vasopressin in rabbit cortical collecting ducts. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. 556 - 562, 1989.
- ABDALLA, S.; LOTHERS, H.; ABDEL-TAWAB, A. M.; QUITTERER, U. The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 39721 – 39726, 2001.
- AMLAL, H.; VERNIMMEN, C.; LEGOFF, C.; PAILLARD, M.; BICHARA, M. Control of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-(NH}_4^+)\text{-2Cl}$ cotransport by angiotensin II-activated transduction pathways in medullary thick ascending lim cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 4, p. 862, 1993.
- BAAL, J. V.; RABER, G.; SLEGTE, J.; PIETERS, R.; BINDELS, R. J. M.; WILLEMS, P. H. G. M. Vasopressin-stimulated Ca^{++} reabsorption in rabbit cortical collecting system: effects on cAMP and cytosolic Ca^{++} . **Pflügers Arch. Eur J. Physiol.**, v. 433, p. 109 -115, 1996.
- BALBOA, M. A.; INSEL, P. A. Stimulation of Phospholipase D via $\alpha 1$ -Adrenergic Receptors in Madin-Darby canine Kidney cells is independent of PKC α and ϵ activation. **Mol. Pharmacol.**, v. 53, p. 221-227, 1998.
- BALBOA, M. A.; FIRESTEIN, B. L.; GODSON, C.; BELL, K. S.; INSEL, P. A. Protein Kinase Ca^{++} mediates phospholipase D activation by nucleotides and phorbol ester in Madin-Darby canine kidney cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, V. 10511 - 10516, 1994.
- BALBOA, M. A.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A.; INSEL, P. A. A phospholipase D-mediated pathway for generating diacylglycerol in nuclei from Madin-Darby canine kidney cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 11738 - 11740, 1995.
- BARRETO-CHAVES, L. M.; MELLO-AIRES, M. Luminal arginine vasopressin stimulates $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchange and $\text{H}^+\text{-ATPase}$ in cortical distal tubule via V_1 receptor. **Kidney Int.**, v. 52, p. 1035 - 1041, 1997.
- BERTORELLO, A.; APERIA, A. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ is an effector protein for protein kinase C in renal proximal tubule cells. **Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.**, v. 256, p.370 – 373, 1989.
- BIANCHINE, L.; KAPUS, A.; LUKAES, G.; WASAN, S.; WAKABAYASHI, S.; POUYSSEGUR, J.; YU, F. H.; ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Responsiveness of mutants of NHE1 isoform of $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporter to osmotic stress. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 998 - 1007, 1995.

BIEMESDERFER, D.; REILLY, R. F.; EXNER, M.; IGARASHI, P.; ARONSON, P. S. Immunocytochemical characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE1 in rabbit kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. 833 - 840, 1992.

BOOKSTEIN, C.; MUSCH, M. W.; DEPAOLI, A.; XIE, Y.; VILLEREAL, M.; RAO, M. C.; CHANG, E. B. A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of kidney is induced by hyperosmolarity. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 29704 - 709, 1994.

BORENSZTEIN, P.; JUVIN, P.; VERNIMMEN C.; POGGIOLI, J.; PAILLARD, M.; BICHARA, M. cAMP- dependent control of Na^+/H^+ antiport by AVP, PTH, and PGE_2 in rat medullary thick ascending limb cells. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 354 - 364, 1993.

BORON, W. F. W. P. Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO_2 , NH_3 and metabolic inhibitors. **J. Gen. Physiol.**, v. 67, p. 91 - 112, 1976.

BURGESS, W. J.; BALMENT, R. J.; BECK, J. S. Effects of luminal vasopressin on intracellular calcium in microperfused rat medullary thick ascending limb. **Renal Physiol. Biochem.**, v. 17, p. 1 - 9, 1994.

CAREY, R. M. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor. The At2 receptor comes of age. **Hypertension**, v. 45, p. 840 - 844, 2005.

CAREY, R. M.; JIN, X. H.; WANG, Z. Q.; SIRAGY, H. M. Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT2) angiotensin receptor. **Acta Physiol. Scand.**, v. 168, p. 65 - 71, 1999.

CASAVOLA, V.; GUERRA, L.; HELMLE-KOLB, C.; RESHKIN, S. J., MURER H. Na^+/H^+ -Exchanger in A6 cells: Polarity and Vasopressin Regulation. **J. Membrane Biology**, v. 130, p. 1105 - 1114, 1992.

CAVET, M. E.; AKHTER, S.; DE MEDINA, F. S.; DONOWITZ, M.; TSE, C. M. Na^+/H^+ exchangers (NHE1-3) have similar turnover numbers but different percentages on the cell surface. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 277, p. 1111 - 1121, 1999.

CEREIJIDO, M; ROBBINS, E.S.; DOLAN W.J.; ROTUNNO, C. A.; SABATINI, D. D. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. **J. Cell Biol.**, v. 77, p. 853 - 880, 1978.

COPPOLA, S.; FROMTER, E. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport and K^+ conductance in renal proximal tubules II: Effect of picomolar concentrations. **Pflügers Arch.**, v. 427, p. 143 -150, 1994.

DEEN, P. M. T.; RIJSS, J. P. L.; MULDER, S. M.; BAAL, E. V.; VAMOS, C. H. Aquaporin-2 transfection of Madin-Darby canine kidney cells reconstitutes

vasopressin-regulated transcellular osmotic water transport. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 8, p. 1493 - 1501, 1997.

DOUGLAS, J. G. Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. 1 - 7, 1987.

DOUGLAS, J. G.; HOPFER, U. Noval aspect of angiotensin receptors and signal transduction in the kidney. Annu. **Rev. Physiol.**, v. 56, p. 649 - 669, 1994.

ERLENBACH, I.; WESS, J. Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 26549 - 26558, 1998.

FERNÁNDEZ, R.; MALNIC, G. H^+ -ATPase and Cl^- Interaction in Regulation of MDCK Cell pH. **J. Membr. Biol.**, v. 163, p. 137 - 145, 1998.

FERNANDEZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G. Na^+ independent próton secretion in MDCK-C11 cells. **Pflügers Arch.**, v. 441, p. 287 - 293, 2000.

GAUSH, C. R.; HARD, W. L.; SMITH, T. F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 122, p. 931 - 935, 1966.

GEKLE, M.; WÜNSCH, S.; OBERLEITHNER, H.; SILBERNAGL, S. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. **Pflügers Arch.**, v. 428. p. 157 - 162, 1994.

GOYAL, S.; VANDER HEUVEL, G.; ARONSON, P. S. Renal expression of novel exchanger isoform NHE8. **Am. J. Renal Physiol.**, v. 284, n. 3, p. 467 - 473, 2003.

HAKAM, A. C.; HUSSAIN, T. Angiotensin II AT2 receptors inhibit proximal tubular Na^+ - K^+ ATPase activity via a NO/cGMP-dependdnt pathway. **Am. J. Physiol. Renal.**, v. 290, p. 1430 - 1436, 2005.

HOLLOWAY, A. C.; QIAN, H.; PIPOLO, L; ZIOGAS, J.; MIURA, S.; KARNIK, S.; SOUTHWELL, B. R.; LEW, M. J.; THOMAS, W. G. Side-chain substitutions with angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 61, p. 768 - 777, 2002.

HOUILLIER, P.; CHAMBEY, R.; ACHARD, M. J.; FROISSART, M.; POGGIOLLI, J.; PAILLARD, M. Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na^+/H^+ antiporter in proximal tubule. **Kidney Int.**, v. 50, p. 1496 - 1505, 1996.

HOUSE, C.; KEMP, B. E. Anti-serum raised against this peptide sequence has now. **Science**, v. 238, p.1726, 1987.

KARIM, Z.; DEFONTAINE, N.; PAILLARD, M.; POGGIOLI, J. Protein kinase C isoforms in rat kidney proximal tubule: acute effect of angiotensin II. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 269, p. 134 - 140, 1995.

KAMBAYASHI, Y.; BARDHA S.; TAKAHASHI, K.; TSUZUKI, S.; INUI, H.; HAMAKUBO, T.; INAGAMI, T. Molecular cloning of novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 24543 - 24546, 1993.

KLANKKE, C. A.; SU, Y.; CALLEN, D. F.; WANG, Z.; MENETON, P.; BAIRD, N. KANDASAMY, R. A.; ORLOWSKI, J. L. M.; SHULL, G. E.; MENON, A. G. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16p22.1, **Genomics**, v. 25, p. 615 - 622, 1995.

KURTZ, I.; GOLCHINI, K. Na⁺ independent Cl-HCO₃⁻ exchanger in Madin Darby Canine Kidney cells. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 4516 - 4520, 1987.

LEMOS, V. S.; BUCHER, B.; TAKEDA, K. Neuropeptide Y modulates ATP-induced increases in internal calcium via the adenylate cyclase/protein Kinase A system in a human neuroblastoma cell line. **Biochem. J.**, v. 321, p. 439 - 444, 1997.

LEVINE, S. A.; MONTROSE, M. H.; TSÉ, C. M.; AND DONOWITZ, M. Kinetics and regulation of tree cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in fibroblast cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 25527 - 25535, 1993.

LIU, F. Y.; COGAN, M. G. Effects of intracellular calcium on proximal bicarbonate absorption. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 451 - 457, 1990.

LOENNERHOLM, G.; RIDDERSTRALE, Y. Intracellular distribution of carbonic anhydrase in the rat kidney. **Kidney Int.**, v. 17, p. 162 - 174, 1980.

MALNIC, G. H⁺ secretion in renal cortical tubules: Kinetic aspects. **Kidney Int.**, v. 32, p. 136 - 150, 1987.

MIURA, S.; KARNIK, S. S. Constitutive activation of angiotensin II type 1 receptor alters the orientation of transmembrane Helix-2. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 24299 - 24305, 2002.

MOREL, A.; O'CAROLL, A. M. M.; BROWNSTEN, M. J.; LOLAIT, S. J. Molecular cloning and expression of rat V_{1a} arginine vasopressin receptor. **Nature**, v. 356, p. 523 - 526, 1992.

NAKAJIMA, M.; MUKOYAMA, M.; PRATT, R. E.; HORIUCHI, M.; DZAU, V. J. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 197, p. 393 - 399, 1993.

NEWTON, A. C.; JOHNSON, J. E. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. **Biochim. Biophys. Acta**, V. 1376, p. 155, 1998.

NOËL, J.; POUYSSÉGUR, J. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 283 - 296, 1995.

NUMATA M.; ORLOWSKI, J. Molecular cloning characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. **J. Biol. Chem.**, v. 276(20), p. 17387 - 17394, 2001.

OBERLEITHNER, H.; VOGEL, U.; KERSTING, U.; STEIGNER, W. Madin-Darby Canine Kidney cells. II: Aldosterone stimulates Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. **Pflügers Arch.**, v. 416, p. 533 - 539, 1990.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Interaction of Angiotensin II and Atrial Natriuretic Peptide on pHi regulation in MDCK cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, p. 944 - 953, 2000.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Effect of Arginine Vasopressin and ANP on pHi and [Ca²⁺]_i regulation in MDCK cells. **Kidney Int.**, v. 60, p. 1800 - 1808, 2001.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; GERHARD M.; MELLO-AIRES, M. Atrial natriuretic peptide impairs the stimulatory effect of angiotensin II on H⁺-ATPase. **Kidney Int.**, v. 62, p. 1693 - 1699, 2002.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MUSA AZIZ R.; GERHARD M.; MELLO-AIRES, M. Arginine Vasopressin stimulates H⁺-ATPase in MDCK cells via V1 (cell Ca²⁺) and V2 (cAMP) receptors. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 286, p. 402 - 408, 2004.

ORLOWSKI, J.; KANDASAMY, R. A.; SHULL, G. E. Molecular cloning of putative members of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family. CDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9331 - 9339, 1992.

ORLOWSKI, J.; KANDASAMY, R. A. Deletion of transmembrane domains of the Na⁺/H⁺ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 19922 - 19927, 1997.

OHUCHI, N.; HAYASHI, K.; KOIKE, K.; KIZAWA, Y.; KASUMA, T.; OHSAWA, M.; TANIGUCHI, Y.; IWAMOTO, M.; MURAKAMI, H. Pharmacological properties of angiotensin II receptors in culture rabbit gingival fibroblasts. **Comparative Biochem. Physiol.**, v. 137, p. 281 - 289, 2004.

PERLAN S.; SCHAMBYE H. T.; RIVERO R. A.; GREENLEE W. J.; HJORTH S. A.; SCHWARTZ, T. W. Non-peptide angiotensin agonist. Functional and molecular interaction with the AT1 receptor. **J. Biol. Chem.**, p. 1493 - 1496, 1995.

POUYSSÉGUR, J. Molecular biology and hormonal regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. **Ren. Physiol. Biochem.**, v. 17, n. 3-4, p. 190 - 193, 1994.

RECTOR, F. C. J. R. Sodium, bicarbonate and chloride absorption by proximal tubule. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 461 - 471, 1983.

REILLY, A. M.; HARRIS, P. J.; WILLIAMS, D. A. Biphasic effect of angiotensin II on intracellular sodium concentration in rat proximal tubules. **Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.**, v. 269, p. 374 – 380, 1995.

RINK, T. J.; TREIN, R. Y.; POZZAN, T. Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 95, p. 189 - 196, 1982.

SALAMANCA, D.A.; KHALIL, R. A. Protein Kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function um hypertension. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, n. 11, p. 1537 – 1547, 2005.

SARDET, C.; FRANCHI, A.; POUYSSÉGUR, J. Molecular cloning, primary structure and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. **Cell**, V. 56, p. 271 - 280, 1989.

SARDET, C.; COUNILLON, L.; FRANCHI, A.; POUYSSÉGUR, J. Growth factors induce phosphorylation of the Na^+/H^+ antiporter a glycoprotein of 110 kD. **Science**, V. 247, p. 723 -726, 1990.

SCHRIER, R. W.; FASSETT, R. G.; OHARA, M.; PIERRE-YVES, M. Pathophysiology of renal fluid retention. **Kidney Int.**, v. 54, p. 127 - 132, 1998.

SCHUSTER, V. L.; FEJER-TOTH, G.; NARAY-FEJER-TOTH, A.; GLUCK, S. Colocalization of H^+ -ATPase and band 3 anion exchanger in rabbit collecting duct intercalated cells. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. 506 - 517, 1991.

SECHI, L. A.; GRADY, E. F.; GRIFFIN, C. A.; KALINYAK, J. E.; SCHAMBELAN, M. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. 240 - 263, 2002.

SLIVKA, S. R.; INSEL, P.A. Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in Madin-Darby canine kidney cells. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 14640 - 14647, 1988.

THIEME, K.; EGUTI, D. M. N.; MELLO-AIRES, M.; OLIVEIRA-SOUZA, M. The effect of angiotensin II on intracellular pH is mediated by AT1 receptor translocation. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, (C 00518-7, 1a revisão).

TSE, C. M.; BRANT, S. R.; WALKER, M. S.; POUYSSÉGUR, J.; DONOWITZ, M. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding a intestinal and kidney-specific Na^+/H^+ axchanger isoform (NHE-3). **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9340 - 9346, 1992.

TSE, C. M.; YANG V. W.; WATSON A. J.; LEVINE S.; MONTROSE M. H.; POTTER J., SARDET C.; POUYSSÉGUR J.; DONOWITZ M. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the rabbit ileal villus cell basolateral membrane Na^+/H^+ exchanger. **Embo J.**, v. 10, n. 8, p. 1957 - 1967, 1991.

VILELLA, S.; GUERRA, L.; HELMLE-KOLB, C.; MURER, H. Characterization of basolateral Na^+/H^+ exchange ($\text{Na}^+/\text{H}-1$) in MDCK cells. **Pflügers Arch.**, v. 420, p. 275 - 281, 1992.

WAKABAYASHI, S.; FAFOURNOUX, C.; SARDET, C.; POUYSSÉGUR, J. The Na^+/H^+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 2424 - 2428, 1992.

WAKABAYASHI, S.; BERTRAND, B.; IKEDA, T.; POUSSÉGUR, J.; SHIGEKAWA, M. Mutation of Calmodulin-binding Site Renders the Na^+/H^+ Exchanger (NHE_1) Highly H^+ -sensitive and Ca^{++} Regulation-defective. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13710 - 13715, 1994.

WEIGMANN, T. B.; WELLING, L. W.; BEATTY, D. M.; HOWARD, D. E.; VAMOS, S.; MORRIS, S. J. Simultaneous imaging of intracellular (Ca^{++}) and pH in single MDCK and glomerular epithelial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. 1184 - 1190, 1993.

WHITE, S.; BOULPAEP, E.; GIEBISCH, G. Differentiated transport properties of primary cultured distal nephron. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 2, p. 323 - 335, 1992.

YOSHITOME, K.; NARUSE, M.; HANAOKA, K.; YAMAMURA, Y.; IMAI, M.; KUROKAWA, K. Functional characterization of vasopressin V_1 and V_2 receptors in the rabbit renal cortical collecting duct. **Kidney Int.**, v. 49, suppl. 55, p. 177 - 82, 1996.