Deise Carla Almeida Leite Dellova

**Efeito Genômico e Não-Genômico da
Aldosterona no Trocador Na^+/H^+ e
na H^+ -ATPase no Túbulo Proximal (S3):
Papel do Cálcio Citosólico.**

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Margarida de Mello Aires.

São Paulo
2007

RESUMO

LEITE-DELLOVA, D. C. A. **Efeito Genômico e Não-Genômico da Aldosterona no Trocador Na^+/H^+ e na H^+ -ATPase no Túbulo Proximal (S3): Papel do Cálcio Citosólico.** 2007. 165 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O presente estudo indica que o pH intracelular (pHi) basal do segmento S3 do túbulo proximal é 7.10 ± 0.007 ($n = 444/2117$). Nossos resultados sugerem um papel do cálcio citosólico na regulação do processo de recuperação do pHi após carga ácida, mediada pelo trocador Na^+/H^+ (majoritariamente) e pela H^+ -ATPase. O trocador é estimulado por Aldosterona (10^{-12} , 10^{-10} e 10^{-8} M) e inibido por Aldosterona (10^{-6} M) via uma ação genômica e não-genômica. Esses resultados são compatíveis com a estimulação do trocador por moderado aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (com Aldosterona 10^{-12} M) e sua inibição por pronunciado aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (com Aldosterona 10^{-6} M). A H^+ -ATPase é estimulada por Aldosterona em todas as doses utilizadas via uma ação genômica e não-genômica, sendo esses resultados coincidentes com um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, dose dependente. Esses nossos achados são também compatíveis com a demonstração de uma ação hormonal não-genômica (após 15 min) e genômica (após 1 hora) na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, no trocador e na H^+ -ATPase. Adicionalmente, nossos resultados indicando que os efeitos hormonais genômicos ocorrem via receptor MR são coincidentes com nossos dados demonstrando a expressão desse receptor no segmento S3. Esses efeitos da Aldosterona que acabamos de descrever podem representar uma regulação fisiológica relevante, em condições de depleção e expansão de volume no animal intacto.

Palavras-chave: Aldosterona. Túbulo proximal. Trocador Na^+/H^+ . H^+ -ATPase. Cálcio citosólico.

ABSTRACT

LEITE-DELLOVA, D. C. A. **Genomic and Nongenomic Effects of Aldosterone on Na^+/H^+ Exchanger and H^+ -ATPase in Proximal Tubule (S3): Role of Cytosolic Calcium.** 2007. 165 f. PhD Thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The present study indicate that the basal intracellular pH (pHi) of proximal S3 segment is 7.10 ± 0.007 ($n = 444/2117$). Our results suggest a role for cell calcium in regulating the process of pHi recovery after the acid load induced by NH_4Cl , mediated by a basolateral Na^+/H^+ exchanger (mainly) and the H^+ -ATPase. The exchanger is stimulated by Aldosterone (10^{-12} , 10^{-10} e 10^{-8} M) and impaired by Aldosterone (10^{-6} M) via a genomic and nongenomic action. Our data are compatible with stimulation of the Na^+/H^+ exchanger by increases in cell calcium in the lower range (at Aldosterone 10^{-12} M) and inhibition at high cell calcium levels (at Aldosterone 10^{-6} M). The H^+ -ATPase is stimulated in all the used doses via a genomic and nongenomic action and this effect is coincident with the dose-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These finding are also compatible with the demonstration of a hormonal nongenomic (after 15 min) and genomic (after 1 h) action on $[\text{Ca}^{2+}]_i$, on the Na^+/H^+ exchanger and on H^+ -ATPase. Our results indicating that the genomics effects are via MR receptor are in accordanc with our finding showing expression of this receptor in the proximal S3 segment of rat. These Aldosterone effects may represent physiologically relevant regulation in conditions of volume depletion or expansion in the intact animal.

Key words: Aldosterone. Proximal tubule. Na^+/H^+ exchanger. H^+ -ATPase. Cytosolic calcium.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A manutenção do pH intracelular (pH_i) é essencial para a função e a proliferação celular. Sua regulação é feita por um mecanismo complexo e não uniforme, dependendo do tipo celular analisado, e envolve vários transportadores iônicos localizados na membrana plasmática (Na^+/H^+ , $H^+-ATPase$, $H^+/K^+-ATPase$, Cl^-/HCO_3^- e $Na^+-HCO_3^-$), assim como tampões intracelulares.

Com base em diferenças anatômicas e funcionais, considera-se que o túbulo proximal é formado por três segmentos: S1, S2 e S3. O segmento S1 compreende a parte inicial, próxima ao glomérulo; o segmento S2 inclui a porção convoluta e a inicial da reta; o S3 corresponde ao restante da reta. De um modo geral, podemos dizer que o túbulo proximal apresenta uma heterogeneidade axial no mecanismo de acidificação: o segmento S1 possui uma taxa de secreção de H^+ mais elevada que os demais segmentos.

Dos três segmentos proximais, o menos estudado é o S3, uma vez que sua localização não permite estudos de micropunção “in vivo” (possível de ser realizada apenas nas porções superficiais) e sua dissecação, para análise “in vitro”, é difícil de ser feita. Em coelhos, é mais fácil a dissecação do segmento S3, tendo sido descrito a presença de uma $H^+-ATPase$ do tipo vacuolar nessa porção tubular (MALNIC; GEIBEL, 2000). Entretanto, ultimamente, verificou-se que em ratos jovens a dissecação desse segmento é possível, pois esses animais não apresentam tecido conjuntivo denso.

O hormônio Aldosterona é o principal mineralocorticoide do organismo e tem um papel importante na manutenção da concentração de sódio e potássio e do equilíbrio ácido-base, através de seus efeitos no néfron distal, onde regula a excreção de eletrólitos. Na literatura encontramos informações limitadas a respeito da influência da Aldosterona no túbulo proximal.

Considerava-se até há pouco tempo que os efeitos da Aldosterona em células alvo (inclusive em células renais) fossem mediados exclusivamente por uma via genômica, contudo, evidências mais recentes têm demonstrado efeitos hormonais rápidos que podem envolver mecanismos não-genômicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REGULAÇÃO DO pH INTRACELULAR NO TÚBULO PROXIMAL

Uma representação esquemática dos principais mecanismos de transporte envolvidos com a acidificação do túbulo renal proximal é dada na **Figura 1**.

Nesse segmento tubular, o H^+ é secretado para a luz tubular preferencialmente pelo trocador Na^+/H^+ , portanto por um processo eletroneutro. A energia para este mecanismo provém do gradiente de concentração de sódio, através da membrana luminal, o qual é mantido pela bomba Na^+/K^+ basolateral, sendo, pois, classificado como um mecanismo de transporte ativo secundário.

Cerca de 80% do bicarbonato filtrado é reabsorvido no túbulo proximal, 60 a 70% da secreção de prótons neste segmento origina-se do trocador Na^+/H^+ (BURCKHART; DI SOLE; HELMIE-KOLB, 2002). O túbulo proximal também secreta íons H^+ através de uma H^+ -ATPase localizada na membrana luminal; entretanto, esse processo ativo primário é responsável apenas por cerca de 35% da secreção proximal de H^+ (BURCKHART; DI SOLE; HELMIE-KOLB, 2002; ULATE, FERNANDEZ; MALNIC, 1993).

Estudos funcionais e moleculares indicam que a situação de acidose tubular proximal aumenta a expressão proximal de uma H^+/K^+ -ATPase (trocador pouco expresso no proximal e normalmente encontrado no ramo ascendente grosso e ducto coletor cortical e medular) (SILVER; SOLEIMANI, 1999).

Figural1. Representação esquemática dos principais mecanismos de secreção de hidrogênio e reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal. O íon H^+ é secretado para a luz tubular preferencialmente pelo trocador Na^+/H^+ , a energia para este mecanismo provém do gradiente de concentração de sódio, o qual é mantido pela Na^+/K^+ -ATPase basolateral. A secreção de H^+ também ocorre através da H^+ -ATPase apical e da H^+/K^+ -ATPase. Na luz tubular, o H^+ secretado reage com o HCO_3^- filtrado formando H_2CO_3 , que é transformado em CO_2 e H_2O , pela ação da anidrase carbônica (*ac*). O CO_2 penetra livremente na célula e combina-se com H_2O gerando o H_2CO_3 (também com a participação da *ac*), que se dissocia em H^+ e HCO_3^- . A saída de HCO_3^- pela membrana basolateral se dá principalmente pelo co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, eletrogênico, e pelo trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. O CO_2 também pode ser combinado com OH^- , proveniente da dissociação intracelular da H_2O , gerando HCO_3^- para reabsorção.

2.1.1 Estrutura e Função do Trocador Na^+/H^+

O trocador Na^+/H^+ foi inicialmente demonstrado em 1976, no intestino e vesículas renais da borda em escova (MURER; HOPFER; KINNE, 1976). Entretanto, somente em 1989 o primeiro gene do trocador Na^+/H^+ (NHE1) foi identificado e clonado (SARDET; FRANCHI; POYSSÉGUR, 1989). O trocador Na^+/H^+ está descrito na membrana de uma variedade de células animais, acreditando-se que tenha distribuição celular ubíqua. Ele regula o pH_i e, conseqüentemente, muitos processos biológicos sensíveis a concentração de H^+ . As propriedades básicas do trocador Na^+/H^+ são virtualmente similares na maioria dos sistemas celulares estudados, mas sua regulação depende da especialização do tecido (BIDET et al., 1987).

Até o momento, nove isoformas do trocador Na^+/H^+ foram identificadas em mamíferos (NHE1 a NHE9) (AMMAR et al., 2006). As isoformas compartilham de um perfil hidrofóbico similar, indicando a presença de dois domínios estruturais maiores intracelulares: o terminal N transmembranoso hidrofóbico e o terminal C hidrofílico (BURCKHART; DI SOLE; HELMIE-KOLB, 2002; HARVEY et al., 2002a).

A isoforma NHE1 (**Figura 2**) é preferencialmente expressa na membrana basolateral e exerce um papel fundamental na regulação do pH_i e do volume celular. Em contraste, as isoformas NHE2 a NHE9, apresentam uma distribuição tecidual mais limitada e funções especializadas. A NHE2 (GHISHAN; KNOBEL; SUMMAR, 1995), NHE3 (BRANT et al., 1995) e a NHE4 (ORLOWSKI; KANDASAMY; SHULL, 1992) são abundantes no epitélio de células renais, intestino e estômago. A NHE2 e NHE3 estão localizadas apicalmente e a NHE4 é principalmente basolateral. A NHE5 (KLANKE et al., 1995) é primariamente expressa em cérebro, baço, testículos e músculo esquelético. As isoformas NHE6 (NUMATA et al., 1998) e NHE7 (NUMATA; ORLOWSKI, 2001) são expressas em organelas (mitocôndrias). As mais recentes isoformas identificadas são a NHE8 (GOYAL; HEUVEL; ARONSON, 2003) e a NHE9 (NAKAMURA et al., 2005), que parecem estar envolvidas na regulação do pH em organelas (complexo de Golgi).

A atividade do trocador Na^+/H^+ é essencial para homeostase do pH , regulação do volume celular, transporte transepitelial de íons e água e também na da proliferação e adesão celular (HARVEY et al., 2002a). Em todas as células o trocador Na^+/H^+ proximal é regulado por uma variedade de estímulos, incluindo vários hormônios (BIDET et al., 1987).

Entre os glicocorticóides, foi demonstrado que a aplicação aguda de dexametasona aumenta a atividade do trocador Na^+/H^+ , necessitando da síntese de RNA e proteína (ação

genômica). Esta conclusão foi baseada no fato de que o hormônio, em células acidificadas, aumenta a taxa de efluxo de próton, dependente de Na^+ , e em células com pH normal, aumenta a entrada de Na^+ (BIDET et al., 1987).

Figura 2. Modelo do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE-1). A isoforma NHE1 é composta por um domínio N-terminal transportador (NH_2), 12 domínios transmembranais (TM) e um domínio C-terminal longo regulatório (COOH). Estão descritas 6 alças extracelulares (EL) e 5 alças intracelulares (IL) (AMMAR et al., 2006).

Estudos em células PS120 (fibroblastos) e células OK (provenientes de rim de gambá), incubadas com dexametasona, verificaram que a isoforma NHE3 é ativada independentemente da indução gênica, indicando que a ativação transcricional pode não ser o único fator que determina a ativação desta isoforma. Além disso, a atividade da NHE3, ativada pela dexametasona, ocorre somente na presença da proteína regulatória NHERF2. Também foi encontrado que proteínas quinases no soro (as SGK1), induzidas pelos glicocorticóides, interagem com os domínios PDZ da NHERF2 para regularem a atividade da isoforma NHE3 (YUN; CHEN; LANG, 2002).

Vários estudos demonstraram que a Aldosterona também estimula o trocador Na^+/H^+ , através da ativação e inserção deste trocador na membrana luminal (MALNIC et al., 1997).

Oberleithner e colaboradores (1986) demonstraram que a Aldosterona ativa o trocador

Na^+/H^+ em células renais de anfíbios, cerca de 20 minutos após a adição do hormônio, elevando o pH citoplasmático.

2.1.2 H^+ -ATPase vacuolar

A H^+ -ATPase vacuolar é uma “bomba” secretora de prótons, composta por pelo menos 13 subunidades diferentes. É encontrada em todas as vesículas de células eucarióticas, incluindo fungos, plantas e células animais, onde sua função é a acidificação dos compartimentos intracelulares (JOURET et al., 2005). Após serem formadas, essas vesículas intracelulares dirigem-se, através dos microtúbulos, para a membrana celular.

Na **Figura 3** é dado um modelo de H^+ -ATPase. A H^+ -ATPase membranar compreende um componente ligado à membrana (domínio V0) e um componente catalítico intracelular (domínio V1). O domínio V0 é responsável pela translocação do próton e o V1 pela hidrólise do ATP.

A H^+ -ATPase tem importante papel em muitos processos fisiológicos como: transporte mediado por receptores, endocitose, processamento e degradação de proteínas e tráfego intracelular. Na membrana celular, contribui para a regulação do pH_i , secreção de ácido e geração de gradiente elétrico transmembranar (que serve como “driving force” para o transporte iônico através da membrana). O papel dessa bomba é talvez mais significativo no rim, onde é encontrada em todos os segmentos tubulares (NAKHOUL; HAMM, 2002).

A regulação da secreção renal de H^+ pode ocorrer através de 3 mecanismos diferentes: aumentando a atividade cinética da H^+ -ATPase, sem alterar a quantidade e distribuição da proteína; alterando a distribuição da H^+ -ATPase, através do recrutamento de proteínas do “pool” inativo para a membrana plasmática; ou aumentando a quantidade de H^+ -ATPase (WAGNER et al., 2004; GLUCK et al., 1992).

Uma explicação clássica, proposta por Al-Awqati e colaboradores (1976), baseada nos experimentos em vesícula urinária de tartaruga, assume que a Aldosterona não estimula apenas a reabsorção de Na^+ mas também a acidificação urinária, através da expressão e deslocamento da H^+ -ATPase. Esta estimulação ocorre por inserção na membrana e ativação dos transportadores.

Figura 3. Esquema da estrutura molecular da H^+ -ATPase do tipo vacuolar. É formada por dois domínios principais: um transmembrânico V_0 (240 kDa) e outro citoplasmático V_1 (640 kDa), que juntos formam uma proteína complexa de aproximadamente 900 kDa. O domínio V_0 compreende as subunidades **a-d**, com várias isoformas da subunidade **c** formando o canal transmembrânico transportador de H^+ . O domínio V_1 é composto de 8 subunidades (**A-H**). A subunidade **A** contém o sítio de hidrólise do ATP, e a subunidade **B** parece ter um papel regulador. Os domínios estão conectados através de uma haste que pertence ao domínio V_1 (WAGNER et al., 2004).

2.2 VISÃO DA AÇÃO GERAL DOS ESTERÓIDES NO TRANSPORTE IÔNICO

Há 50 anos, Hans Ussing descreveu o mecanismo pelo qual os íons são transportados ativamente através da pele de rã. Desde então, vários esforços têm sido empregados na determinação de mecanismos de transporte iônicos específicos, celulares e moleculares, e suas vias regulatórias. Atualmente, está bem caracterizado que o transporte de íons em epitélios de alta resistência é regulado por uma variedade de fatores hormonais e não hormonais. Em vertebrados, os hormônios esteróides (mineralocorticóides, glicocorticóides e estrógenos) são os principais reguladores do transporte de íons e água (HARVEY; HIGGINS, 2002; HARVEY, 2000).

Desde muito tempo, é constatado que pacientes com deficiência em mineralocorticóides têm tendência à hiponatremia, hipercalemia, acidose e contração do volume corporal, enquanto pacientes com excesso de mineralocorticóides apresentam

anormalidades metabólicas opostas. A Aldosterona é um hormônio mineralocorticoide que regula a reabsorção de solutos em epitélios, como do cólon distal e dos rins (MARVER; KOKKO, 1983; HARVEY, 2000), sendo essencial para a regulação da homeostase eletrolítica, do volume extracelular e da pressão sanguínea (GEKLE; SILBERNAGL; WÜNSCH, 1998).

É também sobejamente conhecido que os esteróides adrenais têm papel central na manutenção do balanço hídrico-eletrolítico. Os glicocorticóides têm sido utilizados como antidiarréicos, nos casos de colite ulcerativa, por apresentarem efeitos diretos na absorção de sal e água (YUN; CHEN; LANG, 2002).

O efeito dos corticosteróides no transporte renal de H^+ foi inicialmente descrito em experimentos no rim intacto (DUBROVSKY et al., 1981) e em bexiga de tartaruga - epitélio de alta resistência que se assemelha ao do néfron distal (AL-AWQATI et al., 1976). Estudos mais recentes verificaram que estes hormônios atuam em vários segmentos do néfron, particularmente no néfron distal, incluindo o ducto coletor (GARG; NARANG, 1988; EIAM-ONG; KURTZMAN; SABATINI, 1993). Nestes locais, assim como na bexiga de tartaruga, atuam na H^+ -ATPase do tipo vacuolar, um transporte eletrogênico efetuado na membrana apical das células intercalares do tipo α (células caracterizadas por transporte de H^+ para o compartimento mucoso, no caso da bexiga, e para a luz tubular no caso dos túbulos renais).

Como dito anteriormente, no túbulo proximal, além do trocador Na^+/H^+ , é também descrito a presença de H^+ -ATPase do tipo vacuolar (WAGNER et al., 1998). Portanto, uma ação de corticosteróides, como a Aldosterona, poderia ser esperada neste segmento. Porém, a maioria dos autores não encontra receptores para Aldosterona em túbulo proximal. Com base na detecção de seu RNA mensageiro, acredita-se que haja poucos receptores para mineralocorticóides no túbulo proximal, sendo sua densidade somente 1/10 da encontrada no túbulo coletor (TODD-TURLA et al., 1993). Entretanto, foi verificado em nosso Laboratório que animais adrenalectomizados apresentam um nítido déficit de reabsorção proximal de bicarbonato, que pode ser revertido pela administração de corticosterona (DAMASCO; MALNIC, 1987). Estes dados sugerem que tanto a H^+ -ATPase como o permutador Na^+/H^+ proximais podem ser dependentes da ação dos corticosteróides.

Vários autores têm descrito que o túbulo proximal apresenta pequeno número de receptores para glicocorticóides, em comparação com segmentos distais. Estes hormônios podem estimular a acidificação proximal, pois ativam o trocador Na^+/H^+ em vesículas da borda em escova de túbulos proximais de ratos adrenalectomizados (que receberam hormônios por 2 dias) ou em animais normais. Entretanto, a administração de Aldosterona

não teve efeito nesse modelo experimental (DAMASCO; MALNIC, 1987). Os dados indicam que esses efeitos hormonais dependem de uma modificação nas propriedades intrínsecas da membrana apical do túbulo proximal. Estudos com túbulo proximal convoluto *in vitro* indicam que a dexametasona (10^{-5} M e 10^{-6} M) estimula a reabsorção de bicarbonato. Este efeito foi inibido pela cicloheximidina e actinomicina D, mostrando que os glicocorticóides estimulam o transporte de bicarbonato nesse segmento e que seus efeitos são dependentes de síntese protéica (BAUM; QUIGLEY, 1993).

Os glicocorticóides também são potentes reguladores da Na^+/K^+ -ATPase no túbulo proximal. Como o túbulo proximal é praticamente desprovido de receptores para mineralocorticóides, este efeito parece ser devido, especificamente, aos glicocorticóides. Contudo, ainda não está estabelecido se estes efeitos são diretos ou mediados pela ação dos glicocorticóides no aumento da taxa de filtração glomerular e, deste modo, aumentando a carga de sódio filtrada (BASTL; HAYSLETT, 1992). Em adição, os glicocorticóides apresentam efeitos sistêmicos e hemodinâmicos que poderiam afetar o transporte iônico no túbulo proximal, independente do efeito hormonal direto nesse epitélio tubular (BAUM; HAYSLETT, 1993). Os glicocorticóides também estimulam o trocador Na^+/H^+ em cultura de células OK e em células do cólon distal de ratos, atuando via estimulação da expressão de diferentes isoformas destes trocadores, em particular NHE1 e NHE3 (MALNIC et al., 1997).

Uma questão importante diz respeito ao tempo necessário para ação destes hormônios. Tradicionalmente, a ação dos hormônios esteróides tem sido descrita como uma modulação da transcrição nuclear, promotora de eventos genômicos, responsáveis pelos efeitos fisiológicos. Assim sendo, os esteróides atuam, via receptores nucleares, no controle da transcrição de genes alvos específicos, como os canais iônicos e as ATPases. Estes efeitos são observados após várias horas ou dias, levando à diferenciação celular que permite um transporte de alta atividade (HARVEY et al., 2002a; FALKENSTEIN et al., 2000).

Atualmente, acredita-se que os esteróides podem apresentar efeitos não-genômicos, incompatíveis com seus mecanismos genômicos, caracterizados principalmente por ação rápida e insensibilidade a actinomicina D e cicloheximida (FALKENSTEIN et al., 2000). Adicionalmente, foram descritos efeitos hormonais mais rápidos, de poucos minutos, sobre o permutador Na^+/H^+ em células tubulares renais (VILELA et al., 1992). Nos últimos 10 anos, evidenciou-se que os hormônios esteróides podem regular o transporte de água e eletrólitos em epitélios, independente da transcrição de canais iônicos e transportadores, através de uma fase não-genômica, modulando várias vias de transdução de sinais. O mecanismo molecular básico, induzido pelos hormônios esteróides, envolve a ativação de vias de transdução de

siniais como a proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA), cálcio intracelular, pH intracelular e proteína quinase ativada pela mitogênese (MAPKs) (HARVEY et al., 2002). No contexto de ação esteróide não-genômica, sítios específicos de ligação foram descritos na membrana celular, com propriedades farmacológicas distintas dos receptores intracelulares clássicos (FALKENSTEIN; NORMAN; WEHLING, 2000).

Em síntese, um sistema de dois passos é sugerido para o efeito dos esteróides: um rápido, não-genômico, com período de latência de poucos minutos, dependente de receptores de membrana e segundos mensageiros, e outro mais lento, com latência de horas ou dias, genômico, dependente de receptores clássicos intracelulares, com ação nuclear e sobre a síntese proteica de transportadores.

2.3 ALDOSTERONA

A Aldosterona é sintetizada na zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal, coração e vasos sanguíneos. Seu papel no rim é estimular a reabsorção de sódio e secreção de potássio e hidrogênio, agindo principalmente no ducto coletor (OBERLEITHNER, 2004).

A regulação da liberação deste mineralocorticóide pela adrenal se faz, principalmente, pelas variações na concentração plasmática de sódio e/ou potássio e dos hormônios adrenocorticotróficos (ACTH) e angiotensina II (ELIAS; CAMPOS; MOREIRA, 2002). Entre outras ações, o peptídeo atrial natriurético liga-se a receptores das células da zona glomerulosa adrenal para inibir a síntese de Aldosterona (SCHIFFRIN, 1990).

A Aldosterona, juntamente com a renina e angiotensina, integram o sistema renina-angiotensina-aldosterona (sistema RAA), cuja principal ação é regular o volume de fluido extracelular e, conseqüentemente, a pressão arterial. Em situações de hipotensão ou hipovolemia o sistema RAA é ativado (KLAR et al., 2005).

A hipovolemia e a hipotensão reduzem o volume filtrado pelo glomérulo e conseqüentemente a quantidade de NaCl que chega ao aparelho justaglomerular. Este, sensibilizado pela baixa quantidade de NaCl, libera a enzima renina, que inicia a cascata que resultará na produção da angiotensina II. Este hormônio promove diretamente a secreção de Aldosterona, completando o eixo renina-angiotensina-aldosterona e estimulando os mecanismos que regulam o volume corporal pela retenção de sódio no néfron distal (ROZANSKY, 2006).

A Aldosterona promove aumento do fluido extracelular e da pressão sanguínea via ativação de canais epiteliais de Na^+ (ENaCs), que têm função importante na reabsorção do Na^+ filtrado presente no néfron distal (PEARCE; KLEYMAN, 2007).

Este hormônio atua em cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais, contribuindo para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, fibrose do miocárdio e disfunção endotelial. Em clínica, existe interesse na possibilidade de utilização de bloqueadores do receptor para Aldosterona, com a intenção de diminuir os efeitos patológicos produzidos por este hormônio (OBERLEITHNER, 2004).

A concentração plasmática de Aldosterona é de 5-15 ng/dl. Cerca de 50% da Aldosterona circulante estão sob a forma livre e 50% encontram-se ligados a uma globulina específica, a transcortina, e à albumina. Esta ligação é mais fraca que a do cortisol, de modo que a meia vida da Aldosterona é menor, sendo rapidamente metabolizada no fígado, onde é reduzida para tetrahydroaldosterona. Esta, sob a forma de glicuronato, é eliminada na urina. Uma menor porção do hormônio é eliminada intacta, também conjugada com glicuronato.

2.3.1 Sítios de ação renal da Aldosterona

É sobejamente conhecido que uma das principais ações da Aldosterona na acidificação urinária ocorre no néfron distal, através da estimulação da H^+ -ATPase vacuolar apical:

- Estudos de microperfusão de ducto coletor de coelhos adrenalectomizados, realizados em nosso laboratório, indicam a importância dos esteróides adrenocorticais na excreção urinária ácida e na reabsorção de bicarbonato (MALNIC et al., 1997).
- Sítios de receptores para corticóides têm sido mapeados em todo o néfron, por métodos bioquímicos e auto-radiográficos; estes sítios têm, predominantemente, distribuição distal, especialmente para os mineralocorticóides, confirmando a ação distal destes hormônios (DAMASCO; MALNIC, 1987).
- Estudos de *clearance* apontam o néfron distal como o mais provável local de atuação da Aldosterona. Estes estudos foram feitos em cães e indicam que a adrenalectomia reduz o gradiente máximo de concentração do sódio, o qual é mantido pelas células tubulares distais, sendo que a aldosterona, e não a cortisona, repara este defeito (VANDER et al., 1958).

- Análises por micropunção tubular também mostraram a inabilidade de ratos adrenalectomizados em desenvolver gradientes de concentração de sódio similares aos controles, o que foi corrigido pela Aldosterona (MARVER; KOKKO, 1983).
- Dados de micropunção tubular sugerem uma resposta tubular proximal a adrenalectomia e a Aldosterona. Porém estes resultados são controversos, pois alterações no volume de fluidos extracelulares e na taxa de filtração glomerular poderiam conduzir a um efeito indireto do hormônio neste segmento (MARVER; KOKKO, 1983).

2.3.2 Ação genômica da Aldosterona

Nas células principais do ducto coletor e em outros epitélios que absorvem Na^+ , a Aldosterona estimula a absorção desse cátion, promovendo a transcrição de genes e subsequente translação de novas proteínas, resposta esta que pode demorar horas ou dias (LÖSEL; WEHLING, 2003).

O modelo inclui a ligação do esteróide a um receptor citoplasmático, translocação do hormônio com o receptor para o núcleo da célula, subsequente ligação do complexo a sítios de cromatina específicos, seguida da síntese de RNA e síntese e/ou ativação de produtos proteicos (MARVER; KOKKO, 1983; GEKLE; SILBERNAGL; WÜNSCH, 1998).

As proteínas induzidas pela Aldosterona levam ao aumento da absorção de Na^+ , pelo aumento da atividade do número de canais apicais de Na^+ (ENaC) e de subunidades da Na^+/K^+ -ATPases na membrana basolateral (GOOD, 2007; HARVEY et al., 2002a; OBERLEITHNER et al., 1987).

A regulação transcricional da absorção de Na^+ e secreção de K^+ e H^+ pela Aldosterona ocorre após um período latente de 45 minutos à 2 horas e é mediada pela ligação do hormônio ao receptor clássico para mineralocorticóides (receptor tipo 1). Este receptor tem igual afinidade por Aldosterona e glicocorticóides. A especificidade da regulação pela aldosterona em tecidos epiteliais alvos é alcançada pela ação da enzima 11-hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (11-H β SD2). Esta enzima metaboliza o cortisol e a corticosterona em análogos inativos que não se ligarão aos receptores para mineralocorticóides (ROZANSKY, 2006; ALZAMORA; MICHEA; MARUSIC, 2006; FUNDER, 2005a).

2.3.3 Ação não-genômica da Aldosterona

A primeira demonstração, *in vivo*, do efeito rápido e não-genômico da Aldosterona foi feita há 44 anos, por Klein e Henk (1963). Estes autores detectaram aumento na resistência vascular periférica e na pressão sanguínea e diminuição do débito cardíaco 5 minutos após a administração de Aldosterona, sugerindo um mecanismo de ação não-genômico, devido à rápida ação hormonal. Spach e Streeten (1964) demonstraram, *in vitro*, efeitos rápidos de concentrações fisiológicas de Aldosterona no trocador de Na^+/H^+ de eritrócitos de cães.

Alguns dos primeiros estudos da resposta rápida dos hormônios esteróides foram realizados na pele de rã, os quais demonstraram rápida ativação (antes de 1 minuto) do transporte basolateral de K^+ e do trocador Na^+/H^+ , após exposição à Aldosterona. Este efeito rápido não-genômico também foi observado no transporte epitelial de Na^+ e Cl^- , no cólon de mamíferos, em resposta a concentrações fisiológicas de Aldosterona e estradiol (HARVEY et al., 2002b).

Em leucócitos mononucleares humanos, a Aldosterona aumenta a concentração de cálcio, potássio e sódio e o volume celular, dentro de 1 hora, tempo no qual a ação genômica não poderia prevalecer (WEHLING et al., 1987). Também nestas células, Wheling, Kasmayr e Theisen (1991) demonstraram a ativação do trocador Na^+/H^+ induzida pela Aldosterona após 2 minutos de incubação. A canrenona, um antagonista do receptor para mineralocorticóide tipo I, a actinomicina D e a cicloheximida não bloquearam este efeito hormonal, sugerindo uma ação não-genômica.

Estudos demonstraram que os mineralocorticóides e estrógenos no cólon distal têm uma ativação rápida (em menos de 1 minuto) e não-genômica sobre: atividade da PKC, MAP quinase, influxo celular de Ca^{2+} dependente da PKC e um efeito dependente da $\text{PKC}\alpha$ no trocador Na^+/H^+ e no transporte de K^+ basolateral (HARVEY et al., 2002b; GOOD; GEORGE; WATTS, 2002).

In Vivo também foram descritas as seguintes evidências da ação rápida da Aldosterona:

- aumento na frequência de descarga dos barorreceptores em cães, que ocorre após 15 minutos da aplicação do esteróide (WANG; MCCHAIN; ZUCKER, 1992),
- diminuição da resistência vascular sistêmica em humanos após 3 minutos da aplicação intravenosa de Aldosterona (WHELING et al., 1988).

Experimentos de Le Moëllic e colaboradores (2004) sugerem uma relação entre as respostas não-genômicas e genômicas da ação da Aldosterona em células renais, uma vez que

a estimulação da síntese protéica e do transporte iônico, depende, em parte, da ativação rápida da PKC α .

Segundo Lösel (2003), as vias rápidas de sinalização modulam a transcrição genética induzida pelo receptor clássico (MR), indicando uma ação conjunta entre as vias genômica e não-genômica.

2.3.4 Receptores para Aldosterona

Os receptores para mineralocorticóides são encontrados em tecidos alvos como rins, paratireóide e cólon, mas também podem ser encontrados em outros tecidos, tipo hipocampo e coração (FUNDER et al., 1988).

Os receptores para Aldosterona fazem parte de uma subfamília da superfamília de receptores, que inclui os receptores para glicocorticóides e progesterona. Os membros desta subfamília de receptores exibem marcada homologia estrutural e funcional. Esta subfamília exibe três principais regiões estruturais: região de ligação esteróide C-terminal; domínio de ligação do DNA e o variável domínio N terminal (imunogênico), envolvido na regulação da transcrição (BASTL; HAYSLETT, 1992).

Existem diferenças entre os receptores para mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR), sendo que a maior delas é a especificidade. Os GR têm baixa afinidade pela Aldosterona, mas os MR, quando estudados em citosol isolado, ligam-se naturalmente a glicocorticóides e progesterona, com afinidade similar a da Aldosterona (BASTL; HAYSLETT, 1992).

Pesquisas recentes têm investigado a presença de receptores para glicocorticóides no túbulo proximal. Estudos de autoradiografia com [^3H] dexametasona, em segmentos dissecados de néfron de coelhos, mostraram a marcação nuclear em todos os segmentos do túbulo proximal. Receptores para glicocorticóides foram detectados no néfron distal usando também este método. Embora estes estudos sugiram que no túbulo proximal os glicocorticóides apresentem um receptor diferente ou tenham um efeito não mediado por receptor, o RNAm para receptor de glicocorticóide foi recentemente detectado em vários segmentos do néfron, incluindo túbulo proximal (BAUM; QUIGLEY, 1993).

Receptores de membrana foram propostos para mediar, especificamente, os efeitos não-genômicos da Aldosterona, com base nas seguintes evidências: 1) estudos em membrana plasmática de rim de suíno identificaram sítios de ligação específicos e de alta afinidade a Aldosterona, que exibiram propriedades farmacológicas e cinéticas consistentes com a ação

não-genômica da aldosterona na função celular (CHRIST et al., 1994); 2) foi evidenciada a estimulação rápida do trocador Na^+/H^+ em células MDCK, usando Aldosterona conjugada a albumina, a qual previne a entrada de Aldosterona na célula (GEKLE; SILBERNAGL; WÜNSCH, 1998); 3) receptores de membrana, que mediam efeitos celulares rápidos, foram caracterizados para outros hormônios esteróides, como vitamina D e estrógeno (GOOD; GEORGE; WATTS, 2002); 4) sítios de ligação para Aldosterona foram encontrados em eritrócitos mononucleares humanos (WEHLING; CHRIST; THEISEN, 1992) e fígado de suíno (MEYER; CHRIST; WEHLING, 1995). Estes dados referentes à ação rápida da Aldosterona e seus prováveis sítios de ligação na membrana celular são incompatíveis com o envolvimento dos receptores clássicos para mineralocorticóides tipo I (FALKENSTEIN et al., 2000).

Outros receptores para os esteróides, não clássicos, podem incluir enzimas ou proteínas de sinalização. Mais recentemente, alguns dados sugerem que uma isoforma da PKC possa atuar como receptor específico para Aldosterona (GOOD; GEORGE; WATTS, 2002).

De maneira contraditória, estudos igualmente mais recentes sugerem que alguns efeitos rápidos da Aldosterona podem ser mediados pelo próprio MR, como ocorre com outros hormônios esteróides, onde o receptor intracelular clássico é o responsável pela sinalização rápida:

- Falkenstein e colaboradores (2000) classificam de quatro maneiras o início da resposta não-genômica dos esteróides: 1) o esteróide agiria diretamente na membrana celular sem a participação de receptores, 2) existiria um receptor específico para ligação do esteróide, 3) o esteróide agiria via MR, 4) a ação ocorreria através de segundos mensageiros.
- Uhrenholt e colaboradores (2003) concluíram que a Aldosterona inibe rapidamente a vasoconstrição na arteríola aferente renal, por um mecanismo iniciado pelo MR .
- Torben e colaboradores (2003) estudaram efeitos rápidos da Aldosterona em células endoteliais, dependentes do MR.
- Braun e colaboradores (2004) realizaram experimentos em células renais M-1 (modelo para células de ducto coletor cortical) obtendo alterações significantes na atividade da quinase Src, 2 minutos após a adição de Aldosterona na solução externa. Este efeito

hormonal foi dose-dependente e transitório, com máxima estimulação na concentração de 10^{-9}M e foi bloqueado pela ação da espironolactona.

- Grossmann e colaboradores (2005) propõem três vias de sinalização distintas para a Aldosterona: 1) via genômica dependente do receptor para mineralocorticóides, 2) via não-genômica dependente do receptor para mineralocorticóides, e 3) via não-genômica independente do receptor para mineralocorticóides.

Outros estudos, porém, descartaram a participação do MR em alguns efeitos rápidos atribuídos à Aldosterona, uma vez que a espironolactona (inibidor do MR) não bloqueou estes efeitos:

- Sheader e colaboradores (2002), fazendo experimentos em ductos coletores medulares internos, demonstraram que a Aldosterona (10^{-6}M) pode estimular a geração de AMPc rapidamente, sendo este efeito não inibido pela espironolactona.
- Köppel e colaboradores (2003) demonstraram que a Aldosterona promove um aumento rápido (em 1 minuto) de cálcio intracelular em células mesangiais humanas (MC) e células epiteliais de túbulo proximal (Ptec) e distal (Dtec). A pré-incubação destas células com espironolactona não bloqueia este efeito.
- Rossol-Haseroth e outros autores (2004) mostraram que a Aldosterona promove ativação rápida da ERK1/2 em células M-1 e este efeito foi iniciado por um receptor diferente do MR.

Em conclusão, há muitas controvérsias sobre a identificação do receptor para a resposta não-genômica da Aldosterona, a identificação deste receptor facilitaria o entendimento destes mecanismos e das respostas fisiológicas que estão sendo relatadas por vários autores. Contudo, a identidade molecular deste receptor ainda não é conhecida, existindo evidências a favor e contra a participação do MR ou de proteínas relacionadas a ele, bem como, sobre o envolvimento de receptores de membrana para esteróides (RAD; BALMENT; ASHTON, 2004).

2.3.5 Efeitos rápidos da Aldosterona nas vias de sinalização celular.

Alguns autores admitem que a ação não-genômica da Aldosterona, via receptores da membrana plasmática, estimula a geração de inositol-trifosfato (IP3) e diacilglicerol, com

conseqüente aumento de cálcio citosólico (a partir dos estoques intracelulares, seguido pelo influxo de cálcio extracelular) e proteína quinase C (HARVEY et al., 2002a; FALKENSTEIN et al., 2000; GEKLE; SILBERNAGL; WÜNSCH, 1998).

2.3.5.1 Proteína quinase C (PKC)

A PKC pertence a uma grande família de proteínas, com múltiplas isoformas, divididas em três subgrupos, com base nos diferentes ativadores e cofatores: isoformas clássicas (α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ), isoformas modernas (δ , ϵ , η , θ , μ) e isoformas atípicas (λ , ζ). As várias isoformas da PKC exibem diferenças cinéticas discretas, padrões específicos de distribuição tecidual e localização intracelular, diferentes modos de ativação e comportamentos distintos durante a resposta celular (HARVEY et al., 2002a).

Vários estudos foram realizados para identificar os papéis específicos de cada isoforma de PKC. Foi proposto que algumas isoformas participam da regulação da função de membranas (como um receptor de regulação negativa), por modulação de canais e bombas iônicas e por hidrólise de fosfolípedes de membrana (gerando mediadores lipídicos) (HARVEY et al., 2002a).

A estimulação não-genômica da atividade da PKC foi demonstrada para vários hormônios esteróides, em vários tipos celulares. Similarmente, muitos efeitos rápidos dos hormônios esteróides são mediados pela PKC (DOOLAN; HARVEY, 1996).

2.3.5.2 Efeitos não-genômicos da Aldosterona na atividade da PKC

Muitos efeitos rápidos não-genômicos da Aldosterona são mediados pela PKC:

- a estimulação do canal de K^+ dependente de ATP e do trocador Na^+/H^+ em cólon humano (MAGUIRE et al., 1999);
- a ativação do trocador Na^+/H^+ em células vasculares da musculatura lisa (VSMCs) (EBATA et al., 1994);
- estimulação da condutância de prótons em células MDCK-C11 (GEKLE; SILBERNAGL; OBERLEITHNER, 1997) e
- aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular em células T84 (do epitélio do cólon distal de humanos) e células M-1 (do ducto coletor cortical) (HARVEY et al., 2002b).

Estas respostas parecem ser específicas aos mineralocorticóides, uma vez que os glicocorticóides (hidrocortisona e dexametasona) falharam em produzir uma resposta, ou exibiram uma pequena resposta em doses acima da fisiológica (HARVEY et al., 2002a).

Vários estudos indicam que a Aldosterona ativa a isoforma de PKC sensível a Ca^{2+} (PKC α), seletivamente e não-genomicamente. Em VSMCs, a Aldosterona induz ativação rápida da translocação da PKC α do citosol para as frações de membrana (WEHLING et al., 1994). Doolan e Harvey (1996), demonstraram ativação direta e específica da PKC α por concentrações fisiológicas de Aldosterona. Contudo, nenhum efeito estimulatório de outras isoformas da PKC foram observados em epitélio de cólon distal, na presença de Aldosterona. Os resultados destes estudos apontam a isoforma PKC α como uma candidata a receptor não-genômico para a resposta rápida da aldosterona (HARVEY, CONDLIFFE; DOOLAN, 2001).

Tanto a Aldosterona sozinha quanto a Aldosterona ligada a albumina (Aldosterona-BSA, incapaz de atravessar a membrana celular e se ligar ao receptor citoplasmático), induzem rápida fosforilação do MR dependente de PKC em células de ducto coletor renal, indicando que uma via de sinalização membranal pode estar envolvida no efeito não-genômico da Aldosterona (MOËLLIC et al., 2004).

O uso de inibidores da PKC α bloqueia a resposta não-genômica e genômica da Aldosterona no rim, apontando para uma possível via de integração fisiológica dos efeitos genômicos e não-genômicos (FUNDER, 2005b).

2.3.5.3 Cálcio intracelular

O íon cálcio é um segundo mensageiro crucial para a resposta rápida da Aldosterona (PETZEL et al., 1991). Em adição a via genômica, a Aldosterona promove uma resposta pré genômica rápida que envolve o aumento de cálcio intracelular. Existem fortes evidências que a resposta pré genômica pode influenciar o processo genômico (MOËLLIC et al., 2004).

Resultados obtidos por Doolan e Harvey (1996) indicam que a sinalização intracelular para Aldosterona envolve alterações na concentração de cálcio, através da ativação da atividade da PKC. Eles observaram aumento na concentração de cálcio no epitélio do cólon distal após 5 e 15 minutos de incubação com Aldosterona.

Schäfer e colaboradores (2003), através de experimentos em núcleos de oócitos de *Xenopus laevis*, concluíram que a presença de cálcio citosólico é um pré-requisito para a ação genômica da Aldosterona, além desse íon atuar na cascata de sinalização como um agonista

da interação com o receptor, ou facilitando o transporte do receptor através do poro nuclear. A célula responde adequadamente ao esteróide somente na presença de concentração apropriada de cálcio ionizado no citosol.

Gekle e colaboradores (2001 e 1996) observaram que a Aldosterona, após 1 minuto e em doses fisiológicas, triplica a concentração do cálcio intracelular em células MDCK, um pré-requisito para a ativação do trocador Na^+/H^+ neste tipo celular.

Em células embriogênicas humanas (HEK) a Aldosterona (10 nmol/litro) promoveu aumento rápido e reversível na concentração de cálcio citosólico e a espironolactona (1 $\mu\text{mol/litro}$) não inibiu esta resposta (GROSSMANN et al., 2005).

2.3.5.4 Proteínas *Heat Shock* (HSP) e Calcineurina

Os receptores para hormônios esteróides são formados por um complexo de proteínas, que inclui proteínas de ligação ao esteróide e proteínas HSP. A ligação do hormônio ao receptor estimula a liberação da proteína HSP para o citosol, em seguida o hormônio ligado ao receptor migra para o núcleo e se liga ao DNA. Contudo, a função da proteína HSP após ser liberada do receptor é desconhecida, acredita-se que esta proteína poderia modificar a atividade de uma ou mais fosfatases (PRATT, 1993).

Calcineurina é uma fosfatase serina-treonina, dependente de calmodulina, que regula as proteínas transportadoras de sódio no néfron distal (LEA et al., 1994). E, segundo Wakabayashi e colaboradores (2000), o complexo cálcio-calmodulina participa da regulação da atividade do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE1). Tumlin e outros autores (1997) demonstraram que a Aldosterona aumenta a atividade da calcineurina em túbulo coletor cortical de rato via MR e liberação de HSP, independente de transcrição gênica.

Vários autores têm demonstrado que ações não-genômicas da Aldosterona via MR envolvem a liberação da proteína HSP:

- Uhrenholt e colaboradores (2003) concluíram que a Aldosterona rapidamente inibe a vasoconstrição da arteríola rena aferente via MR e envolvendo HSP.
- Braun e colaboradores (2004) verificaram que a rápida ação da Aldosterona envolveu liberação de HSP e subsequente associação da HSP com Src quinase.

Considerando a literatura atual, na **Figura 4** há uma visão geral dos receptores e mecanismos de sinalização envolvidos na ação da Aldosterona na regulação do transporte iônico em células renais.

Figura 4. Visão geral dos receptores e mecanismos de sinalização envolvidos na regulação das células renais pela Aldosterona. A via não-genômica pode ser iniciada: 1) pela interação da Aldosterona com o receptor MR, promovendo liberação da proteína HSP e posterior estimulação da atividade da calcineurina e da Src quinase, 2) por outro receptor localizado no citosol (não identificado), que via ERK 1/2 e AMPc, estimula a atividade da PKC e promove aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ou, 3) com receptor presente na superfície da membrana celular (também não identificado), responsável pela modificação da atividade de transcrição do MR, via PKC e fosforilação. A via genômica é iniciada pela ligação da Aldosterona com o receptor MR, promovendo regulação do transporte iônico dependente de transcrição e via proteína SGK1. As linhas tracejadas indicam possível mecanismo de integração entre as duas vias, onde ERK 1/2 e AMPc regulariam a atividade da SGK1. Adaptado de GOOD, 2007.

2.3.6 Ativação do trocador Na^+/H^+ pela Aldosterona

A Aldosterona ativa o trocador Na^+/H^+ em uma variedade de tecidos, incluindo epitélio, musculatura lisa vascular e linfócitos. A estimulação do trocador Na^+/H^+ , por sua vez, pode influenciar a atividade de outros transportes iônicos, alterando o volume e o pH celular (DOOLAN; HARVEY, 1996).

Vários experimentos já demonstraram que a Aldosterona possui um efeito significativo na diferença de potencial transepitelial em segmentos distais do néfron, refletindo em uma estimulação do transporte de sódio (sensível a amiloride) pelas membranas apicais (LECLERC; BRUNETTE; COUCHOUREL, 2004).

É bem conhecido que o hiperaldosteronismo estimula a reabsorção de Na^+ , assim como a secreção de K^+ , particularmente em segmentos distais dos túbulos renais e intestino. Estas ações da Aldosterona são mediadas pelas vias genômica e não-genômica, afetando as vias de transporte eletrogênico para absorção de Na^+ e secreção de K^+ (HARVEY et al., 2002).

Turnamian e Binder (1989 e 1990) evidenciaram aumento na absorção de NaCl , em cólon proximal e distal de rato, 1 dia após a administração de Aldosterona. Usando inibidores específicos das diferentes isoformas do trocador Na^+/H^+ , estes autores mostraram que a Aldosterona estimula o trocador aumentando especificamente a expressão da isoforma NHE3 e regulando o movimento transepitelial de Na^+ .

Em VSMCs, a ativação genômica do trocador Na^+/H^+ foi precedida por rápida ativação não-genômica. Esta rápida ativação não foi bloqueada pelos inibidores de síntese proteica, contudo os efeitos genômicos foram suprimidos. Estes estudos sugerem um modelo de ação para a Aldosterona em duas fases (EBATA et al., 1999). Também em células VSMCs, Miyata, Muto e Kusano (2005), observaram que a Aldosterona estimula a isoforma NHE1, pelo aumento do número de transportadores, pelo tráfico de proteínas NHE (previamente estocadas no citoplasma) e por alterações na sensibilidade do trocador ao pHi .

Um importante alvo da Aldosterona durante a resposta rápida é o trocador Na^+/H^+ . Recentemente, foi demonstrado que a elevação do cálcio citosólico serve como um segundo mensageiro no sinal de transdução iniciado pela Aldosterona, para rápida ativação do trocador Na^+/H^+ . A rápida ativação do trocador estimula a entrada de sódio na célula; conseqüentemente, aumenta o volume celular, servindo este como um segundo mensageiro para ação não-genômica da Aldosterona (GEKLE; SILBERNAGL, WÜNSCH, 1998).

A espironolactona, um antagonista de receptores para mineralocorticóides, pode inibir a ativação genômica do trocador Na^+/H^+ , induzida pela Aldosterona. Estudos evidenciaram que a ativação rápida não-genômica do trocador Na^+/H^+ , em cólon distal de humanos e ratos (WINTER et al., 1999) e em glândulas sudoríparas (HEGARTY; HARVEY, 1999), não é afetada pela espironolactona.

Efeitos rápidos da Aldosterona em células de néfrons distais de rim de cão (MDCK) foram caracterizados por Gekle, Silbernagl e Oberleithner (1997), demonstrando que a Aldosterona inicialmente ativa a condutância de prótons na membrana plasmática e posteriormente o trocador Na^+/H^+ . Estes autores advogam que a condutância ao H^+ estimula o trocador Na^+/H^+ por promover um ambiente intracelular ácido.

A Aldosterona necessita da $\text{PKC}\alpha$ para ativar o trocador Na^+/H^+ , pois a pré-incubação com um inibidor da $\text{PKC}\alpha$ (HBDDE) bloqueia a ativação deste trocador, induzida pelo hormônio (GOOD; GEORGE; WATTS, 2002).

Gekle e colaboradores (2001) observaram que a ativação não-genômica do trocador Na^+/H^+ pela Aldosterona envolve a via da MAPK, em células MDCK. A estimulação do trocador nestas células foi inibida por dois inibidores específicos da ativação da Erk1/2 (PD98059 e U0126). Entretanto, os mecanismos que relacionam a ativação da ERK1/2 com o trocador Na^+/H^+ não estão bem estabelecidos.

Recentemente, foi demonstrado que a Aldosterona causa aumento não-genômico na atividade da isoforma NHE1 do trocador Na^+/H^+ , em células M-1 (células de ducto coletor cortical), via $\text{PKC}\alpha$ /MAPK, independente do receptor clássico para mineralocorticóides (MARKOS; HEALY; HARVEY, 2005).

2.3.7 Ativação da H^+ -ATPase pela Aldosterona

A Aldosterona atua direta e indiretamente na secreção de prótons via H^+ -ATPase. Esse hormônio estimula indiretamente a H^+ -ATPase vacuolar no ducto coletor cortical, por aumento da reabsorção de Na^+ pelas células principais, o que promove um lúmen tubular mais negativo e conseqüentemente uma difusão facilitada de prótons para o lúmen. No ducto coletor medular externo, a Aldosterona também estimula a secreção de prótons, independente da reabsorção de Na^+ , sugerindo ativação direta da H^+ -ATPase (WINTER et al., 2004; AL-AWQATU et al., 1976).

Em células intercalares isoladas de ductos coletores de camundongos, foi demonstrada a existência de uma via não-genômica para ativação da H^+ -ATPase. As células intercalares foram expostas a Aldosterona, *in vitro*, por 15 minutos, ocorrendo aumento na atividade da H^+ -ATPase, de 2 a 3 vezes. Os inibidores dos receptores para mineralocorticóides, de transcrição e de síntese protéica, não preveniram esta estimulação. Quando as células intercalares foram incubadas com colchicina, o efeito estimulatório da Aldosterona foi abolido, sugerindo um papel importante da rede de microtúbulos na ativação da H^+ -ATPase. Inibidores específicos da PKC, como a cloridrato de chelerritrine, também aboliram o efeito estimulatório da Aldosterona na atividade da H^+ -ATPase (WINTER et al., 2004).

2.3.8 Efeitos não-genômicos da Aldosterona em epitélios

Em epitélios como o do trato intestinal, rins e glândulas sudoríparas, a alcalinização intracelular, conseqüente da ativação do trocador Na^+/H^+ , afeta o transporte transepitelial de íons e água. A Aldosterona tem sido identificada como um dos principais reguladores do fluido corporal, de eletrólitos e da homeostase do pH. Classicamente, é admitido que a Aldosterona exerce esta ação em epitélios de alta resistência, aumentando a densidade de canais de Na^+ (ENaC) e de K^+ e de Na^+/K^+ -ATPases (HARVEY et al., 2002a).

2.3.8.1 Rins

A Aldosterona exerce papel relevante na regulação de Na^+ e de K^+ e do equilíbrio ácido-base, devido seus efeitos na excreção renal de eletrólitos. Este hormônio influencia o transporte de íons em múltiplos segmentos do néfron, incluindo o ducto coletor, ramo ascendente da alça de Henle e túbulo distal convoluto. Nestes segmentos, atua diretamente na estimulação da reabsorção de Na^+ e da secreção de K^+ e H^+ (GOOD; GEORGE, WATTS, 2002; MARVER; KOKKO, 1983). O efeito estimulatório da Aldosterona e corticosterona na reabsorção proximal de sódio e água foi descrito por Stolte, Wiederholt e Hierholzer (1968). Contudo, estes dados foram questionados por outros autores, que atribuíram o aparente efeito destes hormônios no transporte de sódio a uma alteração no balanço glomerulotubular devido à redução na taxa de filtração glomerular (DAMASCO; MALNIC, 1987).

A regulação da reabsorção do sódio nos rins ocorre principalmente no néfron distal, seguindo duas etapas. O sódio entra na célula renal, vindo do compartimento luminal, através do ENaC na membrana apical; depois, é ativamente transportado para fora da célula pela

Na^+/K^+ -ATPase basolateral (BASTL; HAYSLETT, 1992; HARVEY et al., 2002a). Os ENaC, usualmente, são a etapa limitante para o transporte de Na^+ e o ponto chave da ação da Aldosterona. Classicamente, é aceito que a Aldosterona requer a transcrição do RNAm e a síntese proteica para aumentar o transporte de Na^+ ; portanto, deve promover a síntese de ENaC e sua inserção na membrana apical. O aumento do número de ENaC na membrana apical ocorre de 2 a 4 horas após o tratamento com Aldosterona. Zhen-Hong e Bubien (2001) observaram a ativação rápida (em menos de 2 minutos) do ENaC pela Aldosterona, em células principais de ducto coletor renal; este efeito é sensível a inibidores da metil esterificação, sugerindo a metilação de uma das subunidades do ENaC por metilases (a Aldosterona pode promover a metilação de proteínas de membrana).

A ativação do ENaC não é a única evidência de que a Aldosterona aumenta a reabsorção de sódio. O transporte ativo de sódio na membrana basolateral não requer somente a atividade da Na^+/K^+ -ATPases, mas também o transporte de K^+ através dos canais basolaterais de K^+ . A Aldosterona induz a ativação rápida (<2 minutos) dos canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}), em células de pele de rã. Este efeito é dependente da prévia ativação da isoforma NHE1 e alcalinização do pH intracelular, uma vez que o K_{ATP} é altamente sensível a variações no pH intracelular. O papel da Aldosterona na ativação do K_{ATP} é preservar o gradiente transcelular de K^+ para absorção de Na^+ (HARVEY et al., 2002a).

A Aldosterona estimula o trocador Na^+/H^+ no início do túbulo distal de anfíbios e em cultura de células MDCK, especificamente na superfície basolateral. Estas células são derivadas de rim canino e têm muitas propriedades em comum com as células intercalares α do néfron distal (GEKLE et al., 2001).

Adicionalmente, foi demonstrado que a Aldosterona estimula o trocador Cl/HCO_3^- , em células cardíacas e MDCK, assim como a H^+/K^+ -ATPase da membrana apical de células MDCK (MALNIC et al., 1997).

2.3.8.2 Ramo ascendente medular da alça de Henle (MTAL)

Receptores para mineralocorticóides são expressos no ramo ascendente da alça de Henle, sendo que alterações crônicas nos níveis plasmáticos de Aldosterona alteram a reabsorção de NaCl e NaHCO_3 nesse segmento.

A Aldosterona atua diretamente no transporte iônico no MTAL, induzindo rápida inibição (menos que 3.5 minutos) da reabsorção de HCO_3^- , através da via de sinalização da ERK (quinase regulada por sinal extracelular), independente da transcrição e da translação

gênicas, e não mediada pelos receptores clássicos para mineralocorticóides. Estes resultados indicam uma via não-genômica no papel inibitório da Aldosterona sobre a secreção de H^+ , o que pode representar uma habilidade renal para regular o balanço de Na^+ e volume do fluido extracelular (GOOD, 2007; WATTS; GEORGE; GOOD, 2006).

2.3.8.3 Cólon distal

O cólon dos mamíferos é o principal alvo para a ação da Aldosterona, sendo que os níveis de expressão do gene para receptor de mineralocorticóides são mais elevados no cólon distal que em outros tecidos alvos, incluindo os rins. No cólon distal, a Aldosterona leva à absorção de Na^+ , induzindo a expressão apical de ENaC e basolateral de Na^+/K^+ -ATPase. Em paralelo, a absorção de K^+ é convertida em secreção de K^+ , pela indução de canais apicais de K^+ (KUNZELMANN; MALL, 2002).

Adicionalmente, em cólon distal de ratos, a Aldosterona promove ativação rápida da isoforma NHE1, levando à alcalinização do pH_i. Esta mudança no pH_i tem um impacto significativo na condutância basolateral de K^+ , ativando canais K_{ATP} e inibindo canais de K^+ dependentes de cálcio (KCa). Estudos prévios mostram que nesse segmento os canais K_{ATP} estão envolvidos na reabsorção eletrogênica de Na^+ . Estes resultados sugerem que a ação não-genômica da Aldosterona pode levar a um rápido aumento da absorção de Na^+ . Aparentemente, a ativação dos canais K_{ATP} não aumenta diretamente a absorção de Na^+ , mas age contra a despolarização da membrana produzida pela entrada de Na^+ na célula, durante a fase genômica da ação da Aldosterona (HARVEY et al., 2002b).

Segundo experimentos de Epplé e colaboradores (2000), a Aldosterona promove aumento na expressão de EnaC em cólon distal, 1 hora após sua adição ao meio.

2.4 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS ADRENALECTOMIZADOS (ADX)

Alguns autores, com o intuito de detectar melhor a ação dos mineralocorticóides, costumam administrá-los em animais depletados desses hormônios, por adrenalectomia. Descreveremos, a seguir, os experimentos mais significativos.

Experimentos de microperfusão *in vivo* no túbulo proximal cortical convoluto (segmento S2) de ratos, indicam que a reabsorção de bicarbonato diminui significativamente em ratos adrenalectomizados, sendo esta parcialmente recuperada com a suplementação de Aldosterona, corticosterona ou 18-OH-corticosterona. A acidificação proximal é reduzida em

73% nos ratos ADX, não podendo ser explicada somente através da inibição da H^+ -ATPase, desde que este transportador é responsável por cerca de 30% da reabsorção proximal de bicarbonato. Estes dados sugerem que estes hormônios têm um papel na estimulação da inserção luminal de moléculas do trocador Na^+/H^+ (MALNIC et al., 1997).

Em ratos normais, o pH urinário foi elevado moderadamente quando suplementados com corticosterona ou 18-OH-corticosterona, mas não variou quando receberam Aldosterona. Em ratos ADX, a concentração urinária de Na^+ e K^+ aumentou de forma marcante, sendo revertida pelo tratamento com Aldosterona. Também o pH urinário e os níveis de bicarbonato aumentaram nos ratos ADX, retornando ao valor próximo do normal com a administração desses hormônios. Estes dados confirmam o papel dos esteróides adrenais na acidificação urinária (DAMASCO; MALNIC, 1987).

Os efeitos de infusões constantes de pequenas doses de esteróides adrenais no metabolismo de sódio, potássio e água, foram estudados em ratas adrenalectomizadas. A infusão de 1µg de Aldosterona/dia foi suficiente para corrigir a maioria das conseqüências da adrenalectomia, aumentando o ganho de peso, apetite e balanço de água, sódio e potássio (KENYON; SACCOCCIO; MORRIS, 1984).

Em ratos adrenalectomizados, a Aldosterona estimulou a atividade do trocador Na^+/H^+ , aumentando a inserção da isoforma NHE2, enquanto a corticosterona promoveu aumento da inserção da isoforma NHE3 (ZALLOCHI et al., 2003).

2.5 HEXAMETILENO AMILORIDE (HMA)

As drogas derivadas do amiloride são utilizadas para o estudo dos diversos sistemas de transporte dependentes de sódio ou das vias de permeabilidade ao sódio. De um modo geral, é observado que altas concentrações destes derivados são necessárias para máxima inibição do trocador Na^+/H^+ ; entretanto eles também podem bloquear a síntese protéica e inibir os canais de Na^+ , o trocador Na^+/Ca^{2+} e a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e de outras proteínas quinase. Entre os 70 tipos de derivados amiloride, o HMA é um dos mais potentes (SIMCHOWITZ; WOLTERSDORF; CRAGOE, 1987).

2.6 CONCANAMICINA A

A Concanamicina A é um antibiótico macrolídeo, isolado do meio de cultura de *Streptomyces diastatochromogenes*, utilizado para estudo da ação fisiológica das ATPases do

tipo vacuolar (V-ATPase), em diversos tipos celulares. Este antibiótico inibe a atividade das V-ATPase, através de reação enzimática e não por um mecanismo competitivo (DRÖSES; ALTENDORF, 1997).

2.7 ESPIRONOLACTONA

A Espironolactona é um esteróide sintético que atua, principalmente, como antagonista do efeito da Aldosterona em células alvo, inibindo competitivamente a ligação do hormônio com o seu receptor intracelular (receptor citoplasmático para mineralocorticóides – MR) (COUETTE et al., 1992). É utilizada em experimentos que procuram comprovar que as ações não-genômicas da Aldosterona não são mediadas via receptores clássicos para mineralocorticóides (GOOD; GEORGE, WATTS, 2002).

Como a inibição da ativação do MR é benéfica para um grande número de doenças, várias drogas antagonistas deste receptor têm sido sintetizadas e estudadas, sendo a espironolactona a mais comum (LÖSEL; WEHLING, 2003). O anel de lactona, presente na espironolactona e canrenona, é o pré-requisito para a alta afinidade de ligação com o receptor (PETERFALVI et al., 1980).

2.8 ACTINOMICINA D E CICLOHEXIMIDA

O antibiótico do grupo das actinomicinas exibe alta atividade antibacteriana e antitumoral, por promover inibição da transcrição, que resulta na não formação do RNA mensageiro (HARLEY; REES, 1969).

A Cicloheximida também é um antibiótico que inibe o processo de translação e conseqüentemente a síntese proteica (KÖPPEL et al., 2003).

Ambos inibidores são amplamente utilizados em experimentos que procuram investigar o mecanismo de ação de muitos hormônios esteróides, inclusive da Aldosterona (FUNDER, 2005b; WINTER et al., 2004). Os efeitos genômicos dos hormônios esteróides são caracterizados por um período de latência de 2 a 8 horas e pela sensibilidade aos inibidores da transcrição e translação, como a Actinomicina D e a Cicloheximida (HARVEY; CONDLIFFE, DOOLAN, 2001).

Inibidores de síntese de RNA e de síntese proteica bloqueiam o aumento de transporte de sódio induzido pela Aldosterona (MARVER, KOKKO, 1983).

Em síntese, os mecanismos responsáveis pela extrusão celular de H^+ no segmento S3 do túbulo proximal ainda não estão totalmente esclarecidos. Vários trabalhos da literatura demonstram um efeito importante dos hormônios corticosteróides no transporte de íons, não somente Na^+ e K^+ , mas também H^+ , tanto pelo permutador Na^+/H^+ como pela H^+ -ATPase do tipo vacuolar. Este efeito é verificado no néfron distal e provavelmente no túbulo proximal. Uma questão importante permanece em aberto, o papel das duas fases do mecanismo de ação destes hormônios, tanto no túbulo proximal como no néfron distal. Alguns autores relatam que a Aldosterona estimula a secreção de H^+ e poucos advogam que esse hormônio inibe essa secreção. Adicionalmente, vários trabalhos da literatura, inclusive de nosso Laboratório, vêm demonstrando o papel do cálcio citosólico na regulação do trocador Na^+/H^+ e da H^+ -ATPase. Assim, outra questão relevante não está esclarecida, o tipo de ação da Aldosterona no trocador Na^+/H^+ e na H^+ -ATPase e qual o papel do cálcio nesses processos.

7 CONCLUSÕES

Estudamos o efeito da Aldosterona sobre os mecanismos que regulam o pHi do segmento S3 proximal de ratos. Os dados analisados nos permitem concluir que:

- Estabelecemos em nosso Laboratório a técnica de microdissecação e superfusão do segmento S3, possibilitando a medida do pHi utilizando a sonda fluorescente intracelular – BCECF/AM e análise por câmera de vídeo.
- O pHi basal do segmento S3 proximal é 7.10 ± 0.007 ($n = 444/2117$).
- Evidenciamos a existência de dois tipos de transportadores iônicos, um dependente de Na^+ (o trocador Na^+/H^+) e outro independente de Na^+ (a H^+ -ATPase) no segmento S3.
- Após acidificação do pHi, por pulso de NH_4Cl , a velocidade de recuperação do pHi devida ao trocador Na^+/H^+ é 0.175 ± 0.007 ($n = 18/88$) unidades pH/min e a devida à H^+ -ATPase é 0.064 ± 0.003 ($n = 15/68$) unidades pH/min.
- Não encontramos evidências da existência da H^+/K^+ -ATPase nesta porção do túbulo proximal.
- Aldosterona em doses baixas (10^{-12} , 10^{-10} e 10^{-8} M) estimula o trocador Na^+/H^+ e em dose alta (10^{-6} M) o inibe, indicando um efeito hormonal bifásico.
- Aldosterona (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) estimula a H^+ -ATPase, indicando um efeito hormonal estimulatório.
- Aldosterona (10^{-12} e 10^{-6} M) após 1 min pi eleva de maneira dose dependente e transitória a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e após cerca de 6 min causa nova elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que perdura após 15 min e 1h.
- Os efeitos hormonais na extrusão celular de H^+ e na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evidenciados após 1 h da adição da Aldosterona ocorrem por via genômica, uma vez que foram abolidos pelos inibidores do efeito genômico (Espirinolactona, Actinomicina e Cicloheximida)
- Os efeitos hormonais na extrusão celular de H^+ e na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evidenciados após 15 min da adição da Aldosterona ocorrem por via não-genômica, uma vez que não foram abolidos pelos inibidores do efeito genômico.
- Comprovamos nossos dados funcionais através da detecção da expressão dos receptores MR e GR no segmento S3 de rato.

Pretendemos realizar novos protocolos para aprofundar o conhecimento da natureza do mecanismo de ação da Aldosterona neste segmento tubular e da participação do cálcio intracelular em todo o processo.

Também pretendemos estudar, em um projeto futuro, as vias de sinalização ativadas pela Aldosterona no segmento S3.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL-AWQATI, Q.; NORBY, L.H.; MUELLER, A.; STEINMETZ, P. R. Characteristics of stimulation of H⁺ transport by aldosterone in turtle urinary bladder. **J. Clin. Invest.**, v. 58, p. 351-358, 1976.

ALZAMORA, R.; MICHEA, L.; MARUSIC, E. T. Role of 11 β -hidroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. **Hypertension**, v. 35, p. 1099-1104, 2006.

AMMAR, Y. B.; TAKEDA, S.; HISAMITSU, T.; MORI, H.; WAKABAYASHI, S. Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH regulation. **EMBO J.**, v. 7, n. 11, p. 2315-2325, 2006.

BANKS, W. J. Sistema Urinário. In: BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2 ed. São Paulo: Editora Manole; 1992. p. 481-498.

BASTL, C. P.; HAYSLETT, J. P. The cellular action of aldosterone in target epithelia. **Kidney Int.**, v. 42, p. 250-264, 1992.

BAUM, M.; QUIGLEY, R. Glucocorticoid Stimulate Rabbit Proximal Convolute Tubule Acidification. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 110-114, 1993.

BORON, W F AND DE WEER, P. Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. **J. Gen. Physiol.**, v. 67, p. 91-112, 1976.

BIDET, M.; MEROT, J.; TAUC, M.; POUJEOL, P. Na⁺/H⁺ exchanger in proximal cells isolated from kidney. II. Short-term regulation by glucocorticoids. **Am. Physiol. Soc.**, v. 253, p. F945-F951, 1987.

BRANT, S. R.; YUN, C. H. C.; DONOWITZ, M.; TSE, C. M. Cloning tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform, NHE3. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C198-206, 1995.

*** De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração.

Rio de Janeiro, 2002.

BRAUN, S.; LÖSEL, R.; WEHLING, M.; BOLDYREFF, B. Aldosterone rapidly activates Src kinase in M-1 cells involving the mineralocorticoid receptor and HSP84. **Fed. Euro. Biochem. Soc.**, v. 570, p. 69-72, 2004.

BURCKHARDT, G.; DI SOLE, F.; KOLB-HELMLE, C. The Na⁺/H⁺ exchanger gene family. **J. Nephrol.**, v.15, p. S3-S21, 2002. Suppl. 5.

BURG, M.; GRANTHAMN, J.; ABRAMOW, M.; ORLOFF, J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. **Am. J. Physiol.**, v. 210, p.1293-1298, 1966.

COUETTE, B.; LOMBES, M.; BAULIEU, E. E.; OBLIN-RAFESTIN, M. E. Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticoid receptor. **Biochem. J.**, v. 282, p. 697-702, 1992.

CHRIST, M.; SIPPEL, K.; EISEN, C.; WEHLING, M. Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidney. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.99, p. R31-R34, 1994.

DAMASCO, M. C; MALNIC, G. Effect of Corticosteroids on Proximal Tubular acidification in the rat. **Mineral Electrolyte Metab.**,v. 13, p. 26-32, 1987.

DOOLAN, C.; HARVEY, B. J. Modulation of cytosolic protein kinase and calcium ion activity by steroid hormones in rat distal colon. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 8763-8767, 1996.

DRÖSES, A.; ALTENDORF, K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 1-8, 1997.

DUBROVSKY, A. H.E.; NAIR, R.C.; BYERS, M.K.; LEVINE, D.Z. Renal net acid excretion in the adrenalectomized rat. **Kidney Int.**, v.19, p. 516-528, 1981.

DRUMM, K.; KRESS, T. R.; GASSNER, B.; KRUG, A. W.; GEKLE, M. Aldosterone stimulated activity and surface expression of NHE3 in human primary renal proximal tubule epithelial cells (RPTEC). **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 17, p. 021-028, 2006.

ELIAS, L. L. K.; CAMPOS, A. D.; MOREIRA, A. C. Salt Loading and the Pituitary Adrenal Axis. **Horm. Metab. Res.**, v. 34, p. 207-211, 2002.

EBATA, S.; MUTO, S.; OKADA, K.; NEMOTO, J.; AMEMIYA, M.; SAITO, T.; ASANO, Y. Aldosterone activates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. **Kidney Int.**, v. 56, n.4, p. 1400-1412, 1999.

EIAM-ONG, S.; DAFNIS, E.; SPOHN, M.; KURTZMAN, N. A.; SABATINI, S. H⁺/K⁺-ATPase in distal renal tubular acidosis: urinary tract obstruction, lithium, and amiloride. **Am. J. Physiol. Renal, Fluid Eletrolyte Physiol.**, v. 265, p. F875-F880, 1993.

EIAM-ONG; S.; KURTZMAN, N. A.; SABATINI, S. Regulation of collecting tubule adenosine triohosphatase by aldosterona and potassium. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2385-2392, 1993.

EPPLE, H. J.; AMASHIEH, S.; MANKERTZ, J.; GOLTZ, M.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M. Early aldosterone effect in distal colon by transcripcional regulation of EnaC subunits. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 278, p. G718-G724, 2000.

FALKENSTEIN, E.; CHRIST, M.; FEURING, M. WEHLING, M. Specific nongenomic actions of aldosterone. **Int. Soc. Nephrol.**, v. 57, n. 4, p. 1390-1394, 2000.

FALKENSTEIN E.; NORMAN A. W ; WEHLING, M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 2072–2075, 2000.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. In: FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. **Manual para Técnicos em Bioterismo**. 2 ed. São Paulo: Cobeia, 1996, p. 157-164.

FLECKNELL, P. A. In: FLECKNELL, P. A. Anaesthesia of common laboratory species. **Laboratory animal anesthesia**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1996, p. 161-167.

FUNDER, J. W. Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. **Heart Failure Rev.**, v. 10, p. 15-22, 2005a.

FUNDER, J. W. The nongeniomic actions of aldosterone. **Endocrine Rev.**, v. 26, n. 3, 313-321, 2005b.

FUNDER, J. W.; PEARCE, P. T.; SMITH, R. SMITH, A. I. Mineralocorticoid Action: Target Tissue Specificity Is Enzyme, Not Receptor. **Mediated. Sci.**, v. 42, p. 583-585, 1998.

GAEGGLER, H. P.; GONZALES-RODRIGUES, E.; JAEGER, N. F.; LOFFING-CUENI, D.; NORREGAARD, R.; LOFFING, J.; HORISBERGER, J. D.; ROSSIER, B. Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line. **Am. Soc. Nephrol.**, v. 16, p. 878-891, 2005.

GARG, L.C.; NARANG, N. Effects of aldosterone on NEM-sensitive ATPase in rabbit nephron segments. **Kidney Int.** v. 34, p. 13-17, 1988.

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. **Pflügers Arch.**, v. 441, p. 781–786, 2001.

GEKLE, M.; GOLENHOFEN, N.; OBERLEITHNER, H.; SILBERNAGL, S. Rapid activation of Na^+/H^+ -exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca^{2+} and stimulation of a plasma membrane proton conductance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 10500-10504, 1996.

GEKLE, M.; SILBERNAGL, S.; OBERLEITHNER, H. The mineralocorticoid aldosterone activates a proton conductance in cultured kidney cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v.273, p.C1673-C1678, 1997.

GEKLE, M.; SILBERNAGL, S.; WÜNSCH, S. Non-genomic action of the mineralocorticoid aldosterone on cytosolic sodium in culture kidney cells. **J. Physiol.**, v. 511.1, p. 255-263, 1998.

GLUCK, S. L.; NELSON, R. D.; LEE, B. S.; WANG, Z. Q.; GUO, X. L.; FU, J. Y.; ZHANG, K. Biochemistry of the renal V-ATPase. **J. Exp. Biol.**, v. 172, p. 219-229, 1992.

GOOD, D. W. Nongenomic actions of aldosterone on renal tubule. **Hypertension**, v. 49, p. 1-12, 2007.

GOOD, D. W.; GEORGE, T.; WATTS III, B.A. Aldosterone inhibits HCO_3^- absorption via a nongenomic pathway in medullary thick ascending limb. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 283, p. F699-F706, 2002.

GOYAL, S.; VANDEN HEUVEL, G.; ARONSON, P. S. Renal expression of novel Na^+/H^+ -exchanger isoform NHE8. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 284, n. 3, p. F467-473, 2003.

GRISHAN, F. K.; KNOBEL, S. M.; SUMMAR, M. Molecular cloning sequencing, chromosomal localization, and tissue distribution of human Na^+/H^+ exchanger (SLC9A2). **Genomics**, v. 30, p. 25-30, 1995.

GROSSMANN, C.; BENESIC, A.; KRUG, A. W.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; GASSNER, B.; GEKLE, M. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. **Mol. Endocrinol.**, v. 19, n. 7, p. 1697-1710, 2005.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem.**, n. 260, p. 3440-3450, 1985.

HARLEY, E. H.; REES, K. R. A comparative study of the effect of aflatoxin B and actinomycin D on Hela cells. **Biochem. J.**, v. 114, n. 2, p. 289-298, 1969.

HARVEY, B. J. The physiological meaning of rapid responses to steroid hormones in epithelia. **J. Korean Med. Sci.**, v. 15, p. S57-58, 2000.

HARVEY, B.J.; ALZAMORA, R.; HEALY, V.; RENARD, C.; DOOLAN, C.M. Rapid responses to steroid hormones: from frog skin human colon. A homage to Hans Ussing. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1566, p. 116-128, 2002a.

HARVEY, B. J.; CONDLIFFE, S.; DOOLAN, C. M. Sex and Salt hormones: rapid effects in epithelia. **News Physiol. Sci.**, v. 16, p. 174-177, 2001.

HARVEY, B. J.; DOOLAN, C. M.; CONDLIFFE, S. B.; RENARD, C.; ALZAMORA, R.; URBACH, V. Non-genomic convergent and divergent signalling of rapid responses to aldosterone and estradiol in mammalian colon. **Steroids**, v. 67, p. 483-491, 2002b.

HARVEY, B. J.; HIGGINS, M. Nongenomic effects of aldosterone on Ca^{2+} in M-1 cortical collecting duct cells. **Kidney Int.**, v. 57, p. 1395-1403, 2000.

HEGARTY, J. M.; HARVEY, B. J. Aldosterone accelerates a Na^+/H^+ -exchange dependent pH recovery after acid loading in cultured human eccrine sweat gland epithelial cells. **J. Physiol.**, p. 517- 520, 1999.

JOURET, F.; AUZANNEAU, C.; DEBAIX, H.; WADA, G. H.; PRETTO, C.; MARBAIX, E.; KARET, F. E.; COURTOY, P. J. Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H^+ -ATPase are differentially expressed during nephrogenesis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 16, n. 11, p. 3235-3246, 2005.

KENYON, C.J.; SACCOCCIO, N. A.; MORRIS, D.J: Aldosterone effects on water and electrolyte metabolism. **J. Endocrinol.**, v. 100, p. 93-100, 1984.

KLANK, C. A.; SU, Y. R.; CALLEN, D. F.; WANG, Z.; MENETON, P.; BAIRD, N.; KANDASAMY, R. A.; ORLOWSKY, J.; OTTERUD, B. E.; LEPPERT, 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 16q22. **Genomics**, v. 25, p. 615-622, 1995.

KLAR, J.; SIGL, M.; OBERMAYER, B.; SCHWEDA, F.; KRÄMER, B. K.; KURTZ, A. Calcium inhibits renin gene expression by transcriptional and posttranscriptional mechanism. **Hypertension.**, v. 46, p. 1340-1346, 2005.

KLEIN, K.; HENK, W. Clinical experimental studies on the influence of aldosterone on hemodynamics and blood coagulation. **Z. Kreislaufforsch.**, v. 52, p. 40-53, 1963.

KÖPPEL, H.; CHRIST, M.; YARD, B. A.; BÄR, P. C.; WOUDE, F. J.; WEHLING, M. Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. **J. Clin. Endocrinol. Met.**, v. 88, n. 3, p. 1297-1302, 2003.

KUNZELMANN, K.; MALL, M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 245-289, 2002.

KRUG, A. W.; PAPAVALASSIOU, F.; HOPFER, U.; ULLRICH, K. J.; GEKLE, M. Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. **Pflügers Arch.** v. 446, p. 492-496, 2003.

LEA, J. P.; SANDS, J. M.; MCMAHON, S. J.; TUMLIN, J. A. Evidence that the inhibition of Na^+/K^+ -ATPase activity by FK506 involves calcineurin. **Kidney Int.**, v. 46, n. 3, p. 647-652, 1994.

LECLERC, M.; BRUNETTE, M. G.; COUCHOUREL, D. Aldosterone enhance renal calcium reabsorption by two types of channel. **Kidney Int.**, v. 66, p. 242-250, 2004.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 4, p. 46–56, 2003.

LÖSEL, R. M.; FALKENSTEIN, E.; FEURING, M.; SCHULTZ, A; TILLMANN, H. C.; ROSSOL-HASEROTH, K.; WEHLING, M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. **Physiol Rev.**, v. 83, n. 3, p. 965-1016, 2003.

MAGUIRE, D.; MACNAMARA, B.; CUFFE, J. E.; WINTWR, D.; DOOLAN, C. M.; URBACH, V. O`SULLIVAN, G. C.; HARVEY, B. J. rapid response to aldosterona in human distal colon. **Steroids**, v. 64, p. 61-63, 1999.

MALNIC, G.; ANSALDO, M.; LANTOS, C.P.; DAMASCO, M.C: Regulation of nephron acidification by corticosteroids. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 4, p.479-486, 1997.

MALNIC, G.; GEIBEL, J.P. Secretion by S3 Segment of Mammalian Kidney: Role of H⁺-ATPase and Cl⁻. **J. Membr. Biol.**, v. 178, p. 115-125, 2000.

MARKOS, F.; HEALY, V.; HARVEY, B. J. Aldosterone rapidly activates Na⁺/H⁺ exchange in M-1 cortical collecting duct cells via PKC-MAPK pathway. **Nephron Physiology**, v. 99, n. 1, p.1-9, 2005.

MARVER, D.; KOKKO, J. P: Renal Target Sites and the Mechanism of Action of Aldosterone. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 9, p. 1-18, 1983.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 252p.

MEYER, C.; CHRIST, M.; WEHLING, M. Characterization and solubilization of novel aldosterone binding proteins in porcine liver microsomes. **Eur. J. Biochem.**, v. 229, p. 736-740, 1995.

MURER, G.; HOPFER, U.; KINNE, R. Sodium proton antiport in brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. **Biochem. J.**, v. 154, p. 597-604, 1976.

MIYATA, Y.; MUTO, S.; KUSANO, E. mechanism for nongenomic and genomic effects of aldosterona on Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells. **J. Hypertens.**, v. 23, p. 2237-2250, 2005.

MOËLLIC, C. L.; PASCAUD-OUVRARD, A.; CAPURRO, C.; CLUZEAUD, F.; FAY, M.; JAISSE, N. F.; CHAUBAUD-BLOT, M. Early nongenomic events aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with genomic response. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, p.1145-1160, 2004.

MULLER, O. G.; PARNOVA, R. G.; CENTENO, G.; ROSIER, B. C.; FIRSOV, D.; HORISBERGER, J. D. Mineralocorticoid effects in the kidney: Correlation between EnaC,

GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. **J. Am. Nephrol.**, v. 14, p. 1107-1115, 2003.

MUSA-AZIZ, R.; MELLO-AIRES, M. Action of ANG II and ANP on colon epithelial cells. **Pflugers Arch.**, v. 450, n. 6, p. 405-414, 2005.

NAKAMURA, N.; TANAKA, S.; MITSUI, K.; KANAZAWA, H. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. **J. Biol Chem.**, v. 280, n. 2, p. 156-172, 2004.

NAKHOUL, N. L.; HAMM, L. L. Vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. **J. Nephrol.**, v. 15, p. S22-S31, 2002. Suppl. 5.

NUMATA, M.; ORLOWSKI, J. Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺, K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 20, p. 1787-1794, 2001.

NUMATA, M.; PETRACCA, K.; LAKE, N.; ORLOWSKI, J. Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 6951-6959, 1998.

OBERLEITHNER, H. Unorthodox sites and modes of aldosterone action. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 51-54, 2004.

OBERLEITHNER, H.; WEIGT, M.; WESTPHALE, H. J.; WANG, W. Aldosterone activates Na⁺/H⁺ exchange and raise cytoplasmic pH in target cells of amphibian kidney. **Physiol. Sci.**, v. 84, p. 1464-1468, 1987.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Interaction of angiotensina II and atrial peptide on pH_i regulation in MDCK cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, p. F944-F953, 2000.

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

OLIVEIRA-SOUZA, M., MUSA-AZIZ, R., MALNIC, M AND DE MELLO-AIRES, M. Arginine vasopressin stimulated 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. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9331-9339, 1992.

PEARCE, D.; KLEYMAN, T. R. Salt, sodium channels, and SGK1. **The J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 592-595, 2007.

PETERFALVI, M.; TORELLI, V.; FOURNEX, R.; ROUSSEAU, G.; CLAIRE, M.; MICHAUD, A.; CORVOL, P. Importance of the lactonic ring in the activity of steroidal antialdosterones. **Biochem. Pharmacol.**, v. 29, p. 353-357, 1980.

PETZEL, D, GANZ, M B, NESTLER, E J< LEWIS, J J, GOLDENRING, J, AKCICEK, F, HAYSLETT, J P. Correlates of aldosterone-induced increased in Ca^{2+} and Isc suggest that Ca^{2+} is the second messenger for stimulation of apical membrane conductance. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 150-156, 1991.

PRATT, W. B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 29, p. 21455-21458, 1993.

RAD, A. K.; BALMENT, R. J.; ASHTON, N. Rapid natriuretic action of aldosterona in the rat. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p. 423-428, 2004.

RINK, T. J.; TSIEN, R. Y.; POZZAN, T. Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes. **J. Cell. Biol.**, v. 95, n.1, p. 189-196, 1982.

ROSSOL-HASEROTH, K.; ZHOU, Q.; BRAUN, S.; BOLDYREFF, B.; FALKEINSTEIN, E.; WHELING, M.; LÖSEL, R. M. Mineralocorticoid receptor antagonists do not block rapid ERK activation by aldosterone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 318, n. 1, p. 281-288, 2004.

ROZANSKY, D. J. The role of aldosterona in renal sodium transport. **Sem. Nephrol.**, v. 26, p. 173-181, 2006.

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

SCHÄFER, C.; SHAHIN, V.; ALBERMANN, L.; SCHILLERS, H.; HUG, M. J.; OBERLEITHNER, H. Intracellular calcium: A prerequisite for aldosterone action. **J. Membr. Biol.**, v. 196, p. 157-162, 2003.

SCHAFER, J. A.; WATKINS, M. L.; LI, L.; HERTER, P.; HAXELMANS, S.; SCHLATTER, E. A simplified method for isolation of large numbers of defined nephrons segments. **Am. J. Physiol.**, p. F650-F657, 1997.

SCHIFFRIN, E. L. vascular receptor for atrial peptide in hypertension. **Int. J. Radiat. Appl. Instrum. B.**, v. 17, n. 7, p. 673-676.

SHEADER, E. A.; WARGENT, E. T.; ASHTON, N.; BALMENT, R. J. Rapid stimulation of cyclic AMP production by aldosterone in rat inner medullary collection ducts. **J. Endocrinol.**, v. 175, p. 343-347, 2002.

SILVER, B. R.; SOLEIMANI, M. H^+/K^+ -ATPase: regulation and role in pathophysiological states. **Am. Physiol. Soc. Renal Physiol.**, v. 276, 45, p. F799-F811, 1999.

SIMCHOWITZ, L.; WOLTERSDORF, O. W.; CRAGOE, E. J. Intracellular accumulation of potent amiloride analogues by human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 33, p. 15875-15885, 1987.

SPACH, C.; STREETEN, D. H. Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 43, p. 217-227, 1964.

STOLE, H.; BRECHT, J. P.; WIEDERHOLT, M.; HIERHOLZER, K. Influence of adrenalectomy and glucocorticoid hormones on water permeability of superficial nephron segment in rat kidney. **Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere**, v. 299, n. 2, p. 99-127, 1968.

THOMAS, J. A.; BUCHSBAUN, R. N.; ZIMNIAK, A.; RACKER, E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. **Biochemistry**, v. 18, n.11, p. 2210-2218, 1979.

TODD-TURLA, K. M.; SCHERMANN, J.; FEJES-TÓTH, G.; NARAY-FEJES-TÓTH, SMART, A.; KILLEN, P. D.; BRIGGS, J.P. Distribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. F781-F791, 1993.

TORBEN, R.; UHRENHOLT, T. R.; JENSEN, B. L.; G. L.; SKOTT. Rapid nongenomic effect of aldosterone on vasoconstriction. **Hypertension**, v. 42, n. 2, p.156-160, 2003.

TUMLIN, J. A.; LEA, J. P.; SWANSON, C. E.; SMITH, C. L.; EDGE, S. S.; SOMEREN, J. S. Aldosterone and dexamethasone stimulate calcineurin activity through a transcription-

independent mechanism involving steroid receptor-associated heat shock proteins. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 1217-1223, 1997.

TURNAMIAN, S. G.; BINDER, H. J. Aldosterone and glucocorticoid receptor-specific agonists regulate ion transport in rat proximal colon. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Physiol.**, v. 258, p. G492-G498, 1990.

TURNAMIAN, S. G.; BINDER, H. J. Regulation of active sodium and potassium transport in the distal colon of the rat. Role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. **J. Clin. Invest.**, v. 84, n. 6, p. 1924-1929, 1989.

ULATE, G.; FERNANDEZ, R. MALNIC, G. Effect of bafilomicin on proximal bicarbonate absorption in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 26, p. 773-777, 1993.

UHRENHOLT, T. R.; SCHJERMING, J. HANSEN, P. B.; NORREGAARD, R.; JENSEN, B. L.; SORENSEN, G. L.; SKOTT, O. Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. **Circ. Res.**, v. 93, p. 1258-1266, 2003.

VANDER, A. J.; MALVIN, R. L.; WILDE, W. S.; LAPIDES, J.; SULLIVAN, L. P.; MCMURRAY, V. M. Effects of adrenalectomy and aldosterone on proximal and distal tubular sodium reabsorption. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 99, n. 2, p. 323-325, 1958.

VILELLA, S.; GUERRA, L.; HELMLE-KOLB, C.; MURER, H. aldosterone actions on basolateral Na^+/H^+ exchanger in Madin-Darby canine kidney cells. **Pfugers Arch.**, v. 422, p. 9-15, 1992.

WAGNER, A. C.; GIEBISCH, G.; LANG, F.; GEIBEL, J. P. Angiotensin II stimulates vesicular H^+ -ATPase in rat proximal tubular cells. **Proc. Natl. Sci. USA Physiol.**, v. 95, p. 9665-9669, 1998.

WAGNER, C. A.; FINBERG, K. E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; GEIBEL, J. P. Renal vacuolar H^+ -ATPase. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 1263-1314, 2004.

WAKABAYASHI, S.; PANG T; SU X; SHIGEWAKA, M. A novel topology model of the human Na^+/H^+ exchanger isoform 1. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 7942-9; 2000.

WANG, W.; MCCHAIN, J.; ZUCKER, I. Aldosterone reduces baroreceptor discharge in the dog. **Hypertension**, v. 19, p. 270-277, 1992.

WATTS, B. A.; GEORGE, T.; GOOD, D. W. Aldosterone inhibits apical NHE3 and HCO_3^- absorption via a nongenomic ERK-dependent pathway in medullary thick ascending limb. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 291, p. 1005-1013, 2006.

WEHLING, M.; ARMANINI, D.; STRASSER, T.; WEBER, P. C. Effects of aldosterone on sodium and potassium concentrations in human mononuclear leukocytes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 252, p. E505-E508, 1987.

WEHLING, M.; CHRIST, M.; THEISEN, K. Membrane receptors for aldosterone: A novel pathway for mineralocorticoid action. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. E974-E979, 1992.

WEHLING, M.; KASMAYAR, J.; THEISEN, K. rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. E719-E726, 1991.

WEHLING, M.; SPES, C. H.; WIN, N.; JANSON, C., SCHIMIDT, B. M. W., THEISEN, K.; CHRIST, M. Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 3517-3522, 1998.

WEHLING, M.; ULSENHEIMER, A.; SCHNEIDER, M.; NEYLON, C.; CHRIST, M. Rapid effects of aldosterone on free muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 204, n. 2, p. 475-481, 1994.

WINTER, D. C.; SCHNEIDER, M. F.; O'SULLIVAN, B. J.; HARVEY, J. P.; GEIBEL, J. rapid effects of aldosterone on sodium-hydrogen exchange in isolated colonic crypts. **J. Membr. Biol.**, v. 170, p. 17-26, 1999.

WINTER, C.; SCHULZ, N.; GIEBISCH, G.; GEIBEL, J. P.; WAGNER, C. A. Nongenomic stimulation of vacuolar H^+ -ATPase in intercalated renal tubule cells by aldosterone. **PNAS**, v. 101, n. 8, 2636-2641, 2004.

YUN, C. C.; CHEN, Y.; LANG, F. Glucocorticoid activation of Na^+/H^+ exchanger isoform 3 revisited. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n.10, p. 7676-7683, 2002.

ZALLOCHI, M.; IGARRETA, P.; CALVO, J. C.; REBOUÇAS, N. A.; DAMASCO, M. C. The mechanisms of brush border Na^+/H^+ exchanger activation by corticosteroids. **Med. Sci. Monit.**, v. 9, n. 2, p. 85-90, 2003.

ZHEN-HONG, Z.; BUBIEN, J.K. Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. **Am. J. Physiol Cell Physiol.**, v. 281, p. C1118-C1130, 2001.

TRABALHO PARA PUBLICAÇÃO:

**GENOMIC AND NONGENOMIC DOSE DEPENDENT BIFASIC EFFECTS OF
ALDOSTERONE ON Na⁺/H⁺ EXCHANGER IN PROXIMAL S3 SEGMENT:
ROLE OF CYTOSOLIC CALCIUM.**

Leite-Dellova, D C A; Oliveira-Souza, M; Malnic, G; Mello-Aires, M.

Department of Physiology and Biophysics, Instituto de Ciências Biomédicas, University of
Sao Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil.

Abstract

The purpose of this work was to investigate the genomic and nongenomic effects of Aldosterone on intracellular pH (pHi) and cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in proximal S3 segment of rat (Wistar, 80 g) *in vitro* by using the fluorescent probe BCECF-AM AND FLUO-4-AM respectively. Our data show that the mean baseline pHi was 7.10 ± 0.008 (215/1080). pHi recovery rate was examined in the first 2 min after cellular acidification with a NH_4Cl pulse; in the control situation it was 0.175 ± 0.007 (18/88) pH units/min and in the absence of external Na^+ or in presence of HMA (a Na^+/H^+ exchanger inhibitor) it significantly decreased, indicating that in S3 segment pHi recovery is mostly dependent on Na^+/H^+ exchanger. Aldosterone [10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} M, 1 h or 15 min preincubation (pi)] caused an increase in the pHi recovery rate, but Aldosterone (10^{-6} M, 1 h or 15 min pi) decreased it. The mean baseline $[Ca^{2+}]_i$ was 100 ± 3 nM ($n = 65$). After 1 min pi Aldosterone (10^{-12} or 10^{-6} M) caused a transient and dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$ to ~ 56 and 133%, respectively; after 15 min pi Aldosterone increased the $[Ca^{2+}]_i$ to ~ 127 and 227% and after 1 h pi Aldosterone these values did not change. Spironolactone (10 μ M), Actinomycin D (10 μ M) or Cycloheximide (40 mM) inhibited the effects of Aldosterone 1 h pi on pHi recovery rate and $[Ca^{2+}]_i$ but did not affect the effects of Aldosterone 15 min pi on these parameters. Our results indicate that in the proximal S3 segment Aldosterone has a dose-dependent biphasic (stimulatory/inhibitory) effect on the Na^+/H^+ exchanger via a nongenomic (15 min) and a genomic (1 h) pathway. They are compatible with stimulation of the Na^+/H^+ exchanger by increases in cell calcium in the lower range (at 10^{-12} M Aldosterone) and inhibition at high cell calcium levels (at 10^{-6} M Aldosterone). This finding is also compatible with the demonstration of a hormonal nongenomic (15 min) and genomic (1 h) action on $[Ca^{2+}]_i$. The present results indicating that Aldosterone genomic effects are via MR receptor are in accordance with our findings showing expression of this receptor in the proximal S3 segment.

Keywords: Aldosterone, Na^+/H^+ exchanger, S3 segment, intracellular pH, intracellular calcium.

Introduction

The proximal tubule participates of intracellular pH (pHi) regulation through H^+ extrusion and bicarbonate reabsorption. Approximately 75% of filtered HCO_3^- is reclaimed by the proximal tubule. The mechanism is indirect, involving H^+ secretion across the apical membrane coupled with basolateral reabsorption of HCO_3^- (34, 38). The major fraction of apical H^+ secretion is mediated by Na^+/H^+ exchanger, although H^+ -ATPase also contributes (34, 9). Based in anatomical and functional differences, the proximal tubule is divided in three segments: S1, S2 and S3. The proximal S3 segment is the least studied, because it is located in the outer stripe of the outer medulla, a region that difficult the access to this segment.

Aldosterone is the chief mineralocorticoid of the body and has an important role in the maintenance of Na^+ , K^+ and acid-base balance, through its effects on renal electrolyte excretion (11, 19, 22, 35). The effects of Aldosterone on its target cells have long time been considered to be mediated exclusively through the genomic pathway and were characterized by approximately 45-min lag period; however, evidence has been provided for rapid effects of the hormone that may involve nongenomic mechanisms (20 - 22, 30, 35, 37). On the other hand, in a series of *in vitro* studies, Aldosterone showed to have a half maximal effect on both rapid (15 min) and delayed (120 min) Na^+ flux (35, 36).

Recently, the Na^+/H^+ exchanger has been identified as a target for nongenomic regulation by this mineralocorticoid. Aldosterone rapidly increases Na^+/H^+ exchanger activity in a variety of cells, including distal colon and renal epithelial cell line (19, 25), but Aldosterone rapidly inhibits apical NHE3 and HCO_3^- reabsorption in medullary thick ascending limb (42). So, the activation/inhibition of Na^+/H^+ exchanger by aldosterone remains to be defined, since it is possibly that similar to Angiotensin II (5, 24), aldosterone has a dose dependent bifasic effect on the Na^+/H^+ exchanger (low doses stimulate and high doses inhibit it).

On the other side, an elevation in cytosolic Ca^{2+} serves as a second messenger in the nongenomic Na^+/H^+ exchanger activation initiated by Aldosterone (20) and is a pre-requisite for the genomic action of aldosterona, having strong evidence that the pregenomic hormone response can influence the genomic processes (27).

Therefore, considering that the physiological doses of Aldosterone in the blood is 10^{-10} M - 10^{-9} M and that it can increase or decrease in conditions of extracellular volume expansion or contraction, the purpose of this work was to investigate the genomic and

nongenomic effects of Aldosterone (10^{-12} M, 10^{-10} M, 10^{-8} M and 10^{-6} M) on the Na^+/H^+ exchanger and the role of intracellular calcium in these processes. The experiments were done in proximal S3 segment of rat, a tubular portion that is less studied. The activity of the Na^+/H^+ exchanger was evaluated by the cellular pH recovery after the acidification of the pHi by the NH_4Cl pulse.

Materials and Methods

This study was approved by the Biomedical Sciences Institute/USP – Ethical Committee for Animal Research (CEEAA).

Tubule Preparation. Male Wistar rats (80g) were anesthetized by Tiletamine/Zolazepam (Zoletil® - Virbac®). Their kidneys were removed and slices 2mm in thickness were prepared and transferred to ice-cold normal Ringer solution. In continuation, proximal tubule S3 segments were isolated by microdissection from the outer stripe of the outer medulla, using a modification of the method originally described by Burg et al. (1). Later, S3 segments were transferred to a glass coverslips prepared with the poly-d-lysine (responsible for tubule adhesion). Glass coverslips were mounted on an inverted microscope (Olympus IX70) into thermostatically regulated perfusion chamber whose solutions were changed by means of pneumatic valves. After the experiments, the isolated tubules were removed of glass coverslips and submit to histological analysis.

Measurement of pHi by fluorescence microscopy. pHi was monitored using the fluorescent probe 2', 7'-bicarboxyethyl-5, 6-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) The S3 segments were loaded for 10 min with 10 μM BCECF-AM in the solution 1. After the loading period, the perfusion chamber was rinsed with the solution 1 to remove the BCECF-containing solution. During the experiments, the images were acquired with an intensified ICCD-350F camera. The dye-loaded tubule cells were alternately excited at 440 and 490 nm, and the emission was monitored by the camera at 530 nm every 5 sec. The fluorescence excitation ratio, I_{490}/I_{440} , was displayed in pseudo-color on the monitor, and a maximum of 6 areas per tubule were defined for measurement. The pHi was standardized by the high K^+ /nigericin (solution 2) technique (3).

Cell pH recovery. The S3 segments were first superfused with 140 mM Na^+ control solution (solution 1), exhibiting the basal pHi. Cell pH recovery was examined after the acidification of pHi with the NH_4Cl pulse technique (4) after 1,5 min exposure to 20 mM NH_4Cl (solution 3), in the following situations: control (Na^+_e , in the presence of external 140

mM Na⁺, solution 1), in the absence of external Na⁺ (0 Na⁺_e, solution 4), in presence of *N,N*-hexamethylene amiloride (HMA; 10⁻⁴ M - an Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor), in presence of 15 min or 1 h of preincubation (pi) with Aldosterone (10⁻¹² M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M or 10⁻⁶ M) alone or plus Spironolactone (10 µM – an mineralocorticoid receptor antagonist), Actinomycin D (10⁻⁶ M – an inhibitor of genic transcription) or Cycloheximide (40 mM – an inhibitor of protein synthesis, added 15 min before the application of Aldosterone) and in presence of ethanol (167 µM, the concentration of hormonal solvent we used). In all the experiments, we calculated the rate of pHi recovery (dpHi/dt, pH units/min) from the first 2 min after the start of the pHi recovery curve, by linear regression analysis. Calculations and drawings were performed by Excel program after import of the results by a data acquisition program.

Measurement of [Ca²⁺]_i by fluorescence microscopy. Changes in [Ca²⁺]_i were monitored fluorometrically by using the calcium-sensitive probe FLUO-4-AM (5) in the presence of external Na⁺_e. The proximal tubule S3 segments were loaded for 15 min with 10 µM FLUO-4-AM at 37°C and rinsed in Tyrode's solution (solution 5). FLUO-4 intensity emitted above 505 nm was imaged by using ultraviolet laser excitation at 488 nm on a Zeiss LSM 510 confocal microscope. The images were continuously acquired (at time intervals of 4 s) before and after substitution of experimental solutions. Transformation of the fluorescence signal to [Ca²⁺]_i was performed by calibration with ionomycin (5 µM; maximum Ca²⁺ concentration) followed by EGTA (2.5 mM; minimum Ca²⁺ concentration) according to the Grynkiewicz equation (6) originally used for FURA-2 fluorescence, since in previous studies we have results indicating that the basal, as low and high levels of [Ca²⁺]_i measured from single-wavelength FLUO-4 were similar to those measured from dual- wavelength FURA-2 (7, 8).

Expression of MR and GR receptors in proximal S3 segment. For reverse transcription-PCR, the isolated S3 segment were lysed and homogenized and total RNA was extracted. A total of 250 ng of reverse-transcribed total RNA at 37°C for 1 h using the Superscript II (Invitrogen) was amplified by PCR. β-actin, GR and MR were amplified for 30 cycles in 25 µl of total volume that contained 2.5 U of TaqDNA Polymerase (Invitrogen) and 10 pmol of specific primers. Annealing temperature was 55°C. The primers used were β-actin 5`GTC CAT CGT GGG CCG CCC GC 3` (sense) and 5` CTC TTG CTT GCT AAT CCA CAT 3` (antisense) (Database gi: 46411161), MR 5` AGA AGA TGC ATC AGT CTG CC 3` (sense) and 5` GTG ATG ATC TCC ACC AGC AT 3` (antisense) (Database gi: 205340), GR

5` TGC AGC AGT GAA ATG GGC AA 3` (sense) and 5` GGG AAT TCA ATA CTC ATG GTC 3` (antisense) (Database gi: 66528676).

Solutions and reagents. The solutions utilized are described in Table 1. These solutions had an osmolality of about 300 mOsmol/kg H₂O and pH 7.4. The reagents were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), BCECF-AM and FLUO-4-AM from Molecular Probes (Eugene, OR, USA) and from Invitrogen.

Statistic. The results are presented as means $\pm$ SEM; (n) is the number of experiments and each experiment is the mean of several areas of one tubule. Data were analyzed statistically by analysis of variance followed by the Bonferroni's contrast test. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

Results

Figure 1 shows the proximal S3 segment isolated by microdissection from the outer stripe of the outer medulla. Figure 2 exhibits the histological structures of this segment.

Acid extrusion in S3 segment of rat proximal tubule:

Figure 3A shows a representative experiment in which S3 segments were first bathed with 140mM Na⁺ solution, exhibiting the basal pHi. After 2-min exposure to NH₄Cl, during which cell pHi increased transiently, the removal of NH₄Cl caused a rapid acidification of pHi as a result of NH₃ efflux. In the presence of external 140mM Na⁺, the initial fall in pHi was followed by a recovery toward the basal value. Figure 3B shows that in the absence of external Na⁺, the pHi recovery rate was markedly decreased (and the final pHi was different from the basal value). This effect is reversed with the return of Na⁺ to the bathing solution (and the final pHi was not significantly different from the basal value). Figure 3C indicates that in the presence of external 140mM Na⁺ plus HMA (10⁻⁴ M, a Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor) the pHi recovery rate also was decreased (and the final pHi was different from the basal value).

Tables 2 and 3 summarize the main values of basal pHi found in all the experimental groups. The results indicate that S3 proximal segment of rat in pH 7.4 HCO₃⁻-free solution have a mean baseline pHi of 7.10 ± 0.008 (n = 215/1080).

Figure 4 and table 2 indicate that in the control situation (140mM Na⁺) the main of pHi recovery rate was 0.175 ± 0.011 pH units/min (n = 18/88), and in the absence of external

Na^+ or in presence of HMA it significantly decreased to 0.064 ± 0.003 pH units/min ($n = 15/68$) and 0.056 ± 0.003 pH units/min ($n = 7/24$), respectively. These behaviors indicate that in S3 segment pHi recovery is mostly dependent on the Na^+/H^+ exchanger. However, even in the absence of Na^+ or in presence of HMA a significant small rate of pHi recovery is still observed, due to Na^+ -independent H^+ extrusion mechanism, like the H^+ -ATPase and/or H^+/K^+ -ATPase.

Effect of Aldosterone on Na^+/H^+ exchanger of proximal S3 segment:

1 h of hormonal preincubation:

The main values of pHi responses found in all these experimental groups are in table 2.

Figure 5 indicates that Aldosterone (10^{-12} M, 10^{-10} M and 10^{-8} M, 1 h pi) caused a significant increase in the velocity of pHi recovery (of $\sim 75\%$, 56% , and 37% of the control value, respectively) and Aldosterone (10^{-6} M, 1 h pi) significantly decreased it (of $\sim 39\%$ of the control value). Figure 5 also indicates that in presence of ethanol ($167 \mu\text{M}$) alone the pHi recovery rate was not different from the control value.

Figure 6A shows that in presence of 1 h preincubation with Spironolactone ($10\mu\text{M}$), Actinomycin D (10^{-6}M) or Cycloheximide (40 mM) alone the pHi recovery rate was not different from the control value. However, these agents prevented the stimulatory effect of Aldosterone (10^{-12} M) and the inhibitory effect of Aldosterone (10^{-6} M) on the Na^+/H^+ exchanger. These results confirm that the lag bifasic effect of Aldosterone on the Na^+/H^+ exchanger is genomic.

15 min of hormonal preincubation:

The main data of pHi responses found in all these experimental groups are in table 3.

Figure 7 indicates that Aldosterone (10^{-12} M and 10^{-10} M, 15 min pi) caused an increase in the velocity of pHi recovery (of $\sim 31\%$ and 24% of the control value, respectively), Aldosterone (10^{-8} M, 15 min pi) did not change it and Aldosterone (10^{-6} M, 15 min pi) decreased it (of 39% of the control value).

Figure 8A shows that in presence of 15 min preincubation with Spironolactone ($10\mu\text{M}$), Actinomycin D (10^{-6}M) or Cycloheximide (40 mM) alone the pHi recovery rate was not different from the control value. However, these drugs did not prevent the stimulatory effect of Aldosterone (10^{-12} M, 15 min pi) and the inhibitory effect of Aldosterone (10^{-6} M, 15

min pi) on the Na^+/H^+ exchanger. These data confirm that the rapid bifasic effect of Aldosterone on the Na^+/H^+ exchanger is nongenomic.

Effect of Aldosterone on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of proximal S3 segment:

Figure 9 indicates that after ~ 1 min of the addition of Aldosterone (10^{-12} M or 10^{-6} M) to the bath there was a transient ($\sim 1,5$ min) and dose-dependent increase of cell calcium fluorescent signal, followed by a recovery toward the basal value. After ~ 6 min it begins to increase and after 15 min of hormonal addition the fluorescent signal was significantly higher, mainly for Aldosterone 10^{-6} M. After 1 h of hormonal addition the fluorescent signal remained high and not different from the values found with hormonal preincubation for 15 min.

Table 4 shows that proximal S3 segment exhibited a mean baseline $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of 100 ± 3 nM ($n = 65$). This value did not change after 1 or 15 min or 1h of pi with Tyrode's solution. Table 4 also indicates that after 1 min of addition of Aldosterone (10^{-12} or 10^{-6} M) there was a dose-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (of $\sim 56\%$ and 133% of the control value, respectively). After 15 min of pi with Aldosterone (10^{-12} or 10^{-6} M) the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased to ~ 127 and 227% of the control value, respectively, and after 1h of hormonal pi these values did not significantly changed. Table 6 also shows that in presence of Spironolactone, Actinomycin D or Cycloheximide alone the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not different from the control value. Also the stimulatory effect of Aldosterone (after 15 min of pi) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not modified by these drugs. However, after 1h of hormonal pi the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was significantly reduced by these inhibitors of the genomic effects.

Figure 10 indicates the expression of MR and GR receptors in proximal S3 segment.

Discussion

Our present study was done in proximal S3 segment of rat kidney a region of the nephron that could not be accessed directly by micropuncture. The S3 segment was isolated by microdissection from the outer stripe of the outer medulla and was identified as the proximal straight tubule contiguous to the thin descending limb of the loop of Henle (Figure 1). The integrity of the isolated S3 segment was verified since the tubule maintained their normal architecture (Figure 1). The histological analysis of this segment evidenced tubular structures with complete cubical cells and brush border membrane typical of proximal tubule (Figure 2).

Our data demonstrate that S3 segment cells in pH 7.4 HCO_3^- -free solution maintain a mean baseline pHi of 7.10 ± 0.008 (215/1080), a value compatible with the data found in S3 segment of rabbit kidney (9). Our results indicating that in S3 segment cells in the control situation (140mM Na^+) the pHi recovery rate after the NH_4Cl prepulse is 0.175 ± 0.007 pH units/min ($n = 18/88$) are in accordance with the values found in renal (5) and colon (24) epithelial cells.

The present data show that removal of extracellular Na^+ resulted in a significant inhibition of the pHi recovery that is subsequently reversed with the return of Na^+ to the bathing solution, indicating that the pHi recovery in the rat kidney proximal S3 segment is mostly dependent on Na^+/H^+ exchanger (Figures 3 and 4). However, even in the absence of Na^+ or in presence of HNA (an Na^+/H^+ exchanger inhibitor) a significant rate of pHi recovery was still observed (Figure 4). Preliminary study from our Laboratory indicates that the vacuolar H^+ -ATPase is the responsible by this Na^+ -independent H^+ extrusion mechanism (data do not show), as observed in rabbit kidney proximal S3 segment (9)

Have long time it is know that the mineralocorticoids, including Aldosterone, act in acid excretion on distal nephron segments as the cortical and medullary collecting ducts (10, 11). In addition, some authors finding evidences that Aldosterone acts in proximal tubule cells: Drumm *et al.* (12) postulated a direct mechanism of Aldosterone action on NHE3 in RPTEC cells and Krug *et al.* (13) and Zallocchi *et al.* (14) demonstrated that Aldosterone induces expression of Na^+/H^+ -exchanger isoforms in brush border membrane. However, our results indicate, for the first time in isolated proximal S3 segment, that Aldosterone modulates the mechanism of pHi regulation.

Our results show that Aldosterone at low concentrations (10^{-12} M, 10^{-10} M and 10^{-8} M - 1 h or 15 min pi) causes a significant increase in the velocity of pHi recovery, however at high concentration (10^{-6} M - 1 h or 15 min pi) decreases it. Braun *et al.* (39) observed a rapid dose-dependent stimulatory effect of Aldosterone on Src kinase in the kidney cell line M-1. So, the present study indicates, for the first time in proximal S3 segment, that Aldosterone has a dose-dependent biphasic (stimulatory/inhibitory) effect on the Na^+/H^+ exchanger. A similar dose-dependent biphasic effect of Angiotensin II on the Na^+/H^+ exchanger has been demonstrated in renal (5) and colon (24) epithelial cells. Considering that the physiological doses of Aldosterone in the blood is 10^{-10} M - 10^{-9} M and that it can increase or decrease in conditions of extracellular volume modification, it is possible that similar to Angiotensin II, the dose-dependent biphasic effect of Aldosterone on the Na^+/H^+ exchanger have an action on the regulation of extracellular volume.

Our results show that the dose-dependent biphasic effect we observed on the Na^+/H^+ exchanger is only due to Aldosterone since in presence of ethanol (the hormonal solvent we used) alone the pHi recovery rate was not different from the control value (Figure 5).

Several studies identify the Na^+/H^+ exchanger as a target for genomic and nongenomic regulation by Aldosterone and show that this mineralocorticoid can control the absorptive function of epithelial tissues through regulation of this exchanger (17-23). The present results indicate that Spironolactone (a mineralocorticoid receptor antagonist), Actinomycin D (an inhibitor of genic transcription) or Cycloheximide (an inhibitor of protein synthesis) prevent the effects of Aldosterone (10^{-12} and 10^{-6} – 1 h pi), but failed to prevent the effects of Aldosterone (10^{-12} and 10^{-6} – 15 min pi). So, our study indicates that Aldosterone has a dose-dependent biphasic effect on the Na^+/H^+ exchanger via a genomic (1 h pi) and nongenomic (15 min pi) pathway. This genomic Aldosterone-induced regulation on the Na^+/H^+ exchanger seems to be a mineralocorticoid specific effect, because the Aldosterone receptor antagonist Spironolactone significantly inhibited the activity of exchanger (Figure 6), like observed in human primary renal proximal tubule epithelial cells (RPTEC) (12). These our results are in accordance with our data showing expression of MR receptors in the proximal S3 segment (Figure 10). The present data are consistent with the studies of Krug *et al.* (15) and Todd-Turla *et al.* (16) that had reported mRNA and protein expression of the mineralocorticoid receptor (MR) in the proximal tubule.

The nongenomic Aldosterone-induced effects, many in second messengers, may or not occur via the classical receptor for mineralocorticoid (MR). The possible involvement of MR in mediating some rapid responses has been suggested for steroid hormones (25). Grossmann *et al.* (26) demonstrated that MR contributes to rapid Aldosterone activation of the ERK 1/2 pathway in chinese hamster ovary cells (CHO). However, the receptor for nongenomic-Aldosterone induced mechanism still is unknown (26). Our observed increase in nongenomic activity of Na^+/H^+ exchanger seems to not occur by MR, because Spironolactone failed to prevent this increase (Figure 8). In addition, our present data also demonstrate expression of GR receptors in S3 segment (Figure 10) and, according to Gaeggler *et al.* (2005) and Muller *et al.* (2003) is possible that the nongenomic Aldosterone-induced effects may occur via GR receptors. However, it will be necessary to identify the receptor for this mechanism in S3 segment.

The present data indicate that 1 min after addition of Aldosterone (10^{-12} M or 10^{-6} M) to the bath there was a transient and dose-dependent increase of cell calcium fluorescent signal. After 15 min of hormonal addition the fluorescent signal was significantly higher,

mainly for Aldosterone 10^{-6} M. After 1 h of hormonal addition the fluorescent signal remained high and not different from the values found with hormonal preincubation for 15 min (Figure 9, Table 4). These results are in accordance with several authors who found an Aldosterone-induced increase in intracellular calcium (20, 26, 28 – 31), indicating that intracellular calcium is a prerequisite for Aldosterone action. Nongenomic and pre-genomic actions usually involve second messengers, such as inorganic ions, cyclic AMP or various protein kinases. Calcium is one of the second messengers and its increase is the first intracellular signal in response to Aldosterone (27).

Our results show that the dose-dependent biphasic effect of Aldosterone on Na^+/H^+ exchanger is associated with an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, similar to that observed with Angiotensin II (5 and 24). It has been shown that NHE1 exchanger (the major basolateral isoform of the Na^+/H^+ exchanger in polarized epithelial cells as in the present situation) has calmodulin binding sites at the cytoplasmatic regulatory domain, which modulate its activity. A high-affinity site, which is tonically inhibitory, binds to low Ca^{2+} /calmodulin, thus suppressing the inhibition, that is, stimulating the exchanger at low Ca^{2+} /calmodulin levels. A low affinity site, however, binds with calcium and calmodulin only at high concentrations, and under these conditions inhibits the exchanger activity (5, 24, 32). This behavior is compatible with our present findings indicating stimulation of Na^+/H^+ exchanger by increases of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the lower range (at 10^{-12} M Aldosterone - after 15 min or 1 h pi) and inhibition of Na^+/H^+ exchanger at high $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels (at 10^{-6} M Aldosterone - after 15 min or 1 h pi) (Figures 6 and 8). This behavior is also compatible with our results showing that Spironolactone, Actinomycin or Cycloheximide did not affect the effects of Aldosterone (10^{-12} M or 10^{-6} M - after 15 min pi) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and on the bifasic action on the Na^+/H^+ exchanger, but these agents impair the effects of Aldosterone (10^{-12} M or 10^{-6} M - after 1h pi) on these parameters (Figures 6 and 8).

On the other hand our present data showing a nongenomic effect of aldosterone on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in proximal S3 segment are in agreement with results found in M-1 cortical collecting duct cells (30). Additionally, our findings indicating a genomic effect of Aldosterone (10^{-6} M - after 1h pi) in increasing the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to ~ 254% of the control value in proximal S3 segment are similar to data showing that exposure of A₆D₂ cells to Aldosterone (10^{-6} M) promotes a increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of ~ 230% of the control value, 60-70 min after addition of the hormone, and this rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was inhibited in magnitude by Actinomycin and Cycloheximide, suggesting that Aldosterone induces an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via a process dependent on mRNA and protein synthesis (28). However, the effect of a long-term in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase is still not

adequately explained. Numerous reports suggest that chronic increase in $[Ca^{2+}]_i$ down-regulate apical sodium channels and reduced transepithelial movement of sodium in epithelial cells (33).

In summary, the present study in proximal S3 segment suggest a role for cell calcium in regulating the process of pHi recovery after the acid load induced by NH_4Cl , mostly mediated by basolateral Na^+/H^+ exchanger, and stimulated by Aldosterone (10^{-12} M, 10^{-10} M and 10^{-8} M) and impaired by Aldosterone (10^{-6} M) via a genomic and nongenomic action. They are compatible with stimulation of the Na^+/H^+ exchanger by increases in cell calcium in the lower range (at 10^{-12} M Aldosterone) and inhibition at high cell calcium levels (at 10^{-6} M Aldosterone). This finding is also compatible with the demonstration of a hormonal nongenomic (after 15 min pi) and genomic (after 1 h pi) action on $[Ca^{2+}]_i$ and on the Na^+/H^+ exchanger. The present results indicating that Aldosterone genomics effects are via MR receptor are in accordance with our findings showing expression of this receptor in the proximal S3 segment. These Aldosterone effects may represent physiologically relevant regulation in conditions of volume depletion or expansion in the intact animal.

References

1. **Burg, M, J, Grantham, M, Abramow, and J Orloff.** Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol* 210: 1293-1298, 1966.
2. **Schafer, J A, Watkins, M L, Li, L, Herter, P.** A simplified method for isolation of large numbers of defined nephrons segments. *Am Physio. Soc* F650-F657, 1997.
3. **Thomas, J A, Buchsbaun, R N, Zimniak, A, Racker, E.** Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18 (11): 2210-2218, 1979.
4. **Boron, W F and De Weer, P.** Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* 67: 91-112, 1976.
5. **Oliveira-Souza, M. and De Mello-Aires M.** Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptid on pHi regulation in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F944-F953, 2000.
6. **Grynkiewicz, G, Poenie, M and Tsien, R Y.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.
7. **Oliveira-Souza, M, Malnic, M and De Mello-Aires, M.** Atrial natriuretic peptide impairs the stimulatory effect of angiotensin II on H⁺-ATPase. *Kidney Int* 60: 1693-1699, 2002.
8. **Oliveira-Souza, M, Musa-Aziz, R, Malnic, M and De Mello-Aires, M.** Arginine vasopressin stimulated H⁺-ATPase in MDCK cells via V1 (cell Ca²⁺) and V2 (camp) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 402-408, 2004.
9. **Malnic, G, Geibel, J P.** Cell pH and H⁺ secretion by S3 segment of mammalian kidney: Role of H⁺-ATPase and Cl⁻. *J Membrane Biol* 178: 115-125, 2000.
10. **Winter, C, Schulz, N, Giebisch, G, Geibel, J P, Wagner, C A.** Nongenomic stimulation of vacuolar H⁺-ATPase in intercalated renal tubule cells by aldosterone. *PNAS*, vol 101, no 8, 2636-2641, 2004.
11. **Rozansky, D J.** The role of aldosterone in renal sodium transport. *J Sem Nephrol* 26:173-181, 2006.
12. **Drumm, K, Kress, T R, Gassner, B, Krug, A W, Gekle, M.** Aldosterone stimulated activity and surface expression of NHE3 in human primary renal proximal tubule epithelial cells (RPTEC). *Cell physiol Biochem* 17:021-028, 2006.
13. **Krug, A W, Papavassiliou, F, Hopfer, U, Ullrich, K, J, Gekle, M.** Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. *Pflugers Arch* 446:492-496, 2003.

14. **Zallocchi, M, Igarreta, P, Calvo, J C, Reboucas, N A, Damasco, M C.** The mechanisms of brush border Na^+/H^+ exchanger activation by corticosteroids. *Med Sci Monit* 9(2): BR85-90, 2003.
15. **Krug, A W, Grossmann, C, Schuster, C, Freudinger, R, Mildenerger, S, Govidam, M V, Gekle, M.** Aldosterone stimulated epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem* 278:43060-43066, 2003.
16. **Todd-Turla, K M, Schnermann, J, Fejes-Toth, G, Naray-Fejes-Toth A, Smart, A, Killen, P D, Briggs, J P.** Distribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. *Am J Physiol* 264:F781-F791, 1993.
17. **Ebata, s, Muto, S, Okada, k, Nemoto, J, Amemiya, M, saito, T, Asano, Y.** Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int* 56:1400-1412, 1999.
18. **Miyata, Y, Muto, S, Kusano, E.** Mechanisms for nongenomic and genomic effects of aldosterone on Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells. *Journal of Hypertension* 23:2237-2250, 2005.
19. **Oberleithner, H, Weigt, M, Westphale, H J, Wang, W.** Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange and raise cytoplasmatic pH in target cells of the amphibian kidney. *Physiol Sciences* 84:1464-1468, 1987.
20. **Gekle, M, Golenhofen, N, Oberleithner, H, Silbernagl, S.** Rapid activation of Na^+/H^+ exchanger by aldosterone in renal epithelial cells require Ca^{2+} and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 93: 10500-10504, 1996.
21. **Gekle, M, Freudinger, R, Mildenerger, S, Schenk, K, Marschitz, I, Schramek, H.** Rapid activation of Na^+/H^+ exchanger in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinases ERK 1/2. *Eur J Physiol* 441:781-786, 2001.
22. **Good, D W, George, T, Bruns, A W III.** Nongenomic regulation by aldosterone of the epithelial NHE3 Na^+/H^+ exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:757-763, 2005.
23. **Markos, F, Healy, V, Harvey, B J.** Aldosterone rapidly activates Na^+/H^+ exchanger in M-1 cortical collecting duct cells via a PKC-MAPK pathway. *Nephron Physiology* 99:p1-p9, 2005.
24. **Musa-Aziz, R, Oliveira-Souza, M, Mello-Aires, M.** Signalling pathways in the biphasic effect of ANGII on Na^+/H^+ exchanger in epithelial colon cells. *J Membr Biol* 205 (2):49-60, 2005.
25. **Falkenstein, E, Normam, A W, Wehling, M.** Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action (s). *J Clin Endocrinol Metab* 85:2072-2075, 2000.

26. **Grossmann, C, benesic, A, Krug, A W, Freudinger, R, Mildenberg, S, gassner, B, Gekle, M.** Human Mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Molec Endocrinol* 19 (7): 1697-1710, 2006.
27. **Schafer, C, Shahin, V, Albermann, L, Schillers, H, Hug, M, J, Oberleithner, H.** Intracellular calcium: a prerequisite for aldosterone action. *J Memb Biol* 196:157-162, 2003.
28. **Petzel, D, Ganz, M B, Nestler, E J, Lewis, J J, Goldenring, J, Akcicek, F, hayslett, J P.** Correlates of aldosterone-induced increased in Ca^{2+} and Isc suggest that Ca^{2+} is the second messenger for stimulation of apical membrane conductance. *J Clin Invest* 89:150-156, 1991.
29. **Wehling, M, Ulsenheimer, A, Schneider, M, neylon, C, Christ, M.** rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 204:475-481, 1994.
30. **Harvey, B J, Higgins, M.** Nongenomic effects of aldosterone on Ca^{2+} in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int* 57(4):1395-1403, 2000.
31. **Koppel, H, Christ, M, Yard, B A, Bar, P C, Woude, F J V D, Wehling, M.** Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88(3):1297-1302, 2005.
32. **Wakabayashi, S, Bertrand, B, Ikeda, T, Poysegur, J, Shiekawa, M.** Mutation of calmodulin-binding site renders the Na^+/H^+ exchanger (NHE1) highly H^+ -sensitive and Ca^{2+} regulation-defective. *J Biol Chem* 269:13710-13715, 1994.
33. **Windhager, E E.** Regulatory role of intracellular calcium ions in epithelial Na transport. *Annu Rev Physiol* 45:519-532, 1993.
34. **Hamm, L L.** Renal Acidification mechanisms. In: *The Kidney*, edited by Brenner B M. Philadelphia, P A: Saunders, 497-534, 2004.
35. **Moellic, C L, Ouvrad-Pascaud, A, Capurro, C, Cluzeaud, F, Fay, M, Jaisser, F, Farman, N, Blot-Chabaud, M.** Early nongenomic events aldosterone action in renal collecting duct cells: $\text{PKC}\alpha$ activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with genomic response. *J Am Soc Nephrol* 15:1145-1160, 2004.
36. **Funder, J W.** The nongenomic actions of aldosterone. *Endocrine Reviews* 26(3):313-321, 2004.
37. **Zhou, Z-H, Bubien, J K.** Nongenomic regulation of EnaC by aldosterone. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1118-C1130, 2001.
38. **Bailey, M A.** Inhibition of bicarbonate reabsorption in the rat proximal tubule by activation of luminal P2Y1 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F789-796, 2004.

39. **Braun, S, Losel, R, Wehling, M, Boldyreff, B.** Aldosterone rapidly activates Src kinase in M-1 cells involving the mineralocorticoid receptor and HSP84. *FEBS Letters* 570:69-72, 2004.
40. **Gekle, M, Silbernagl, S, Wunsch, S.** Non-genomic actions of the mineralocorticoid aldosterone on cytosolic sodium in culture kidney cells. *J Physiol* 511(1):255-263, 1998.
41. **Falkenstein, E, Tillman, H-C, Christ, M, Feuring, M, Wehling, M.** Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513-555, 2000.
42. **Gaeggler, H P, Rodriguez-Gonzalez, E, Jaeger, N F, Loffing-Cueni, D, Norregaard, R, Loffing, j, Horisberger, J D, Rossier, B C.** Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line. *J Am Soc Nephrol* 16:878-891, 2005.
43. **Muller, O G, Parnova, R G, Centeno, G, Rossier, B C, Firsov, D, Horisberger, J D.** Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between α ENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na^+ and K^+ .