Celso Braga Sobrinho

**Ação do ANP no Efeito Não Genômico da Aldosterona
sobre o trocador Na^+/H^+ no Segmento S3 do Túbulo
Proximal de Rato –
Estudos em Túbulo Isolado: Função do Cálcio
Citosólico**

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

São Paulo
2008

RESUMO

BRAGA, SOBRINHO, C. **Ação do ANP no efeito Não Genômico da Aldosterona sobre o Trocador Na^+/H^+ no Segmento S3 do Túbulo Proximal de Rato –Estudos em Túbulo Isolado. Função do Cálcio Citosólico.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O objetivo do presente trabalho foi analisar o papel do ANP na ação não genômica da Aldosterona sobre o trocador Na^+/H^+ no segmento S3 do túbulo proximal de rato, isolado, *in vitro*. Os resultados indicam que o pHi basal do segmento S3 proximal de ratos é 7.20 ± 0.009 ($n = 47/209$). O valor médio da velocidade de extrusão celular de H^+ na condição controle é de 0.195 ± 0.012 pHi/min ($n = 16/96$). Os dados confirmam que a aldosterona apresenta um efeito bifásico sobre o NHE1: em baixas doses (10^{-12} M) o estimula, enquanto que em altas doses (10^{-6} M), o inibe. O ANP (10^{-6} M) não possui efeito sobre o NHE1; contudo, o ANP previne ambos os efeitos da Aldosterona sobre esse trocador. O valor médio da concentração do cálcio no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) na condição controle é 100 ± 1 ($n = 5$) ηM . Adicionalmente, nossos estudos mostram que o ANP diminui a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e inibe o efeito estimulatório de ambas as doses de Aldosterona sobre esse parâmetro.

Palavras chave: Aldosterona. ANP. Segmento S3. Trocador Na^+/H^+ . Cálcio citosólico.

ABSTRACT

BRAGA, SOBRINHO, C. Action of ANP on the Nongenomic Effects of Aldosterone on the Na⁺/H⁺ Exchanger in the S3 Segment of Proximal Tubule of Rat – Studies in isolated tubules Role of Cytosolic Calcium. 2007. Master thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, University of São Paulo, São Paulo, 2008.

The effects of aldosterone and ANP(2 min preincubation) on the intracellular pH recovery rate (pH_{irr}) after the acid load induced by NH₄Cl and on the [Ca²⁺]_i were investigated in isolated rat S3 segment. The basal pHi was 7.20±0.009(n=47/209) and the basal pH_{irr} via the Na⁺/H⁺ exchanger was 0.195±0.012 pHi/min(n=16/96). Aldosterone(10⁻¹²M) caused an increase in the pH_{irr}, but aldosterone(10⁻⁶M) decreased it. ANP(10⁻⁶M) alone or plus aldosterone(10⁻¹²or10⁻⁶ M) had no effect on pH_{irr}. The basal [Ca²⁺]_i was 100±1(n=5)ηM. After 1 min of Aldosterone pi there was a transient and dose-dependent increase of the [Ca²⁺]_i and after 6 min pi there was a new increase of [Ca²⁺]_i. ANP alone decreased the [Ca²⁺]_i and prevented the stimulatory effects of aldosterone(10⁻¹²or10⁻⁶M) on this parameter. The data indicate a nongenomic action of aldosterone and ANP on the Na⁺/H⁺ exchanger and on [Ca²⁺]_i and are compatible with stimulation of the this exchanger by increases in [Ca²⁺]_i in the lower range (at10⁻¹²M Aldosterone) and inhibition by increases at high levels (at10⁻⁶M Aldosterone).

Key word: Aldosterone. ANP. Segment S3. Na⁺/H⁺ exchanger . Cytosolic Calcium

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A manutenção do pH intracelular (pHi) é essencial para a fisiologia da célula 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^+ , $\text{H}^+ - \text{ATPase}$, $\text{H}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$), assim como tampões intracelulares.

Em vertebrados, os hormônios esteróides (mineralocorticóides, glicocorticóides e estrógenos) são uns dos principais reguladores do transporte de íons e água (HARVEY et al., 2002). A Aldosterona, um mineralocorticóide liberado pelas glândulas adrenais, regula a reabsorção de solutos em epitélios, como o dos rins, sendo essencial para a regulação da homeostase eletrolítica e consequentemente, do: pHi, volume extracelular e pressão sanguínea.

O Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) é um membro da família dos peptídeos que participam da regulação dos sistemas cardiovascular e renal, e especialmente do volume circulante efetivo, estando envolvido em vários graus na resposta do organismo ao aumento de volume circulante efetivo (BERNE, 2004).

O túbulo renal proximal é formado por três regiões distintas, divididas com base em diferenças anatômicas e funcionais: a primeira porção, o segmento S1, compreende a parte inicial da porção convoluta; a segunda, S2, que inclui o final da convoluta e a inicial da reta; e o S3, que compreende o restante da reta. O recente desenvolvimento da técnica de microdissecação em nosso Laboratório possibilitou o presente estudo no segmento S3, região pouco pesquisada do túbulo proximal, pela dificuldade de acesso devido sua localização na parte mais interna do córtex renal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REGULAÇÃO DO pH_i NO TÚBULO PROXIMAL

No túbulo proximal, o H⁺ é secretado para a luz tubular preferencialmente pelo trocador 1Na⁺/1H⁺, 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 Na⁺/K⁺-ATPase basolateral, sendo classificado como um transporte ativo secundário.

Nesse segmento tubular, o H⁺ é secretado para a luz tubular preferencialmente pela isoforma NHE3 do trocador Na⁺/H⁺. Cerca de 80% do bicarbonato filtrado é reabsorvido no túbulo proximal, sendo que 60 a 70% da secreção de prótons neste segmento origina-se do trocador Na⁺/H⁺ (SCHLÖNDORFF et al., 1995).

O túbulo proximal também secreta íons H⁺ através de uma H⁺-ATPase localizada na membrana luminal; entretanto esse processo ativo primário, eletrogênico, é responsável apenas por cerca de 35% da secreção proximal de H⁺ (SCHLÖNDORFF et al., 1995; ULATE et al., 1993)

De 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 (S2 e S3).

2.1.1 Trocador Na⁺/H⁺

O trocador Na⁺/H⁺ está descrito na membrana de uma variedade de células animais, acreditando-se que sua isoforma NHE1 tenha distribuição ubíqua. Ela regula o pH_i e, conseqüentemente, muitos processos biológicos sensíveis à 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 de tecido (BIDET et al., 1987)

Nove isoformas do trocador Na⁺/H⁺ foram identificadas em mamíferos (NHE1 a NHE9) (AMMAR et al., 2006). Todas isoformas atravessam a membrana 12 vezes e compartilham de um perfil hidrofóbico similar, com dois domínios estruturais maiores, intracelulares: o terminal N

hidrofóbico e o terminal C hidrofílico (BURCKHART et al., 2002; HARVEY et al., 2002a) (**Figura 1**).

A atividade do trocador Na^+/H^+ é essencial para: homeostase do pH_i , regulação do volume celular, transporte epitelial de íons e água e também na proliferação e adesão celular (HARVEY et al., 2002a). Em todas as células o trocador Na^+/H^+ é regulado por uma variedade de estímulos, incluindo muitos hormônios (BIDET et al., 1987). A isoforma NHE1 é expressa na membrana basolateral e exerce papel fundamental na regulação do pH_i e do volume celular. As demais isoformas apresentam distribuição tecidual mais limitada e funções especializadas.

2.2 ALDOSTERONA

A aldosterona é um hormônio mineralocorticóide sintetizado na zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal. Regula a reabsorção de solutos em epitélios, como o do cólon distal e o dos rins (MARVER et al., 1983). Seu papel no rim é estimular a reabsorção de sódio e secreção de potássio e hidrogênio, agindo principalmente no ducto coletor (OBERLEITHNER, 2004). Está constatado que pacientes com deficiência em mineralocorticóides têm tendência a hiponatremia, hipercalemia, acidose e contração de volume corporal, enquanto pacientes com excesso de mineralocorticóides apresentam anormalidades metabólicas opostas.

Vários estudos demonstraram que a aldosterona estimula o trocador Na^+/H^+ , através da ativação e inserção deste trocador na membrana luminal (MALNIC et al., 1997). É bem estabelecido que uma das principais ações da aldosterona na acidificação urinária ocorre no néfron distal, através da estimulação da H^+ -ATPase vacuolar apical (MALNIC et al., 2000; DAMASCO et al., 1987; MARVER et al., 1983).

A regulação da liberação de aldosterona pela adrenal se faz, principalmente, pelas variações na concentração plasmática de sódio e/ou potássio e dos hormônios adenocorticotróficos (ACTH) e angiotensina II (ANG II) (ELIAS et al., 2002). O peptídeo atrial natriurético (ANP) é um potente inibidor, *in vivo* e *in vitro*, da secreção de aldosterona, via um efeito direto na adrenal e indiretamente através da inibição da secreção de renina pelos rins (VESELY, 2003).

Figura 1. Trocador Na^+/H^+ . A parte superior da membrana (indicada em preto) é o meio extracelular e a inferior, o intracelular. Os domínios terminais intracelulares – NH_2 hidrofóbico e COOH hidrofílico - estão respectivamente à esquerda e à direita.

Fonte: Oliveira-Souza, 2008. In: Fisiologia, Capítulo: Transportadores de Membrana - ed. M Mello-Aires, 3ª.edição, 2008.

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 ligado a uma globulina específica, a transcortina, e à albumina. Esta ligação é mais fraca que a do cortisol, de forma 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.

Uma questão importante diz respeito ao tempo necessário para a ação desse hormônio. 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 ciclohexamina (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)

Experimentos de Moëllic et al. (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 $\text{PKC}\alpha$. As vias rápidas da sinalização modulam a transcrição gênica induzida pelo receptor clássico (MR), indicando uma ação conjunta entre as vias genômicas e não-genômicas (LÖSEL, 2003).

Trabalho recentemente publicado de nosso Laboratório (LEITE-DELLOVA et al., 2008) mostra que, no segmento S3 do túbulo proximal, a aldosterona tem um efeito estimulador dose dependente sobre a H^+ -ATPase, e tem também um efeito bifásico sobre o trocador Na^+/H^+ (em dose baixa o estimula, e em dose alta o inibe). Esse trabalho também evidencia que o efeito da aldosterona em ambos transportadores (H^+ -ATPase e trocador Na^+/H^+) é genômico (na vigência do hormônio, aparece após uma hora) e não genômico (aparece após 1 ou 15 minutos), indicando a presença, no segmento S3, do receptor clássico para mineralocorticóide (MR, responsável pelo

efeito genômico) e do receptor para glicocorticóide (GR, que parece ser responsável pelo efeito não genômico).

2.2.1 Ação Genômica da Aldosterona

Nas células principais do ducto coletor e em outros epitélios que absorvem Na^+ , a aldosterona estimula a absorção desse íon promovendo a transcrição de genes e subsequente translocação de novas proteínas (LÖSEL; WEHLING, 2003). O modelo inclui a ligação do esteróide a um receptor citoplasmático, translocação de hormônio com o receptor para o núcleo da célula e subsequente ligação do complexo a sítios de cromatina específicos, seguida da síntese de RNA e síntese e/ou ativação de produtos protéicos (MARVER et al., 1983; GEKLE et al., 1998)

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

A regulação transcripcional da absorção de Na^+ e da secreção de K^+ e de H^+ pela aldosterona ocorre após um período latente de 45 minutos à 2 horas sendo mediada pela ligação do hormônio ao receptor clássico de mineralocorticóide (tipo 1 ou MR). É discutível se esse receptor tem igual afinidade por aldosterona e glicocorticóides. A especificidade da regulação pela aldosterona em tecidos epiteliais alvos é alcançada através da ação da enzima 11-hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (11- β SD2). Esta enzima metaboliza o cortisol e a corticosterona em análogos inativos, que não se ligam aos receptores para mineralocorticóides (GOOD et al., 2002).

2.2.2 Ação Não Genômica da Aldosterona

Ao lado do efeito genômico clássico dos esteróides, atualmente acredita-se que esses hormônios podem apresentar efeitos não genômicos, caracterizados principalmente por ação rápida e insensibilidade a actinomicina D e ciclohexamida (FALKENSTEIN et al., 2000). Nos últimos 10 anos, evidenciou-se que os hormônios esteróides podem regular o transporte de água e

eletrólitos em epitélios, independentemente da transcrição de canais iônicos e transportadores, através de uma fase não-genômica, modulando várias vias de transdução de sinais, como a proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA), $[Ca^{2+}]_i$, pHi e proteína quinase induzida pela mitogênese (MAPKs) (HARVEY et al., 2002)

Alguns dos primeiros estudos da resposta rápida dos hormônios esteróides foram realizados na pele de rã, demonstrando rápida ativação (em menos 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 em transportes epiteliais de Na^+ e Cl^- em cólon de mamíferos, em resposta a concentrações fisiológicas de aldosterona e estradiol (HARVEY et al., 2002b).

Outros estudos, no cólon distal, demonstraram que os mineralocorticóides e estrógenos tem uma ativação rápida (antes de 1 minuto) e não-genômica via atividade da PKC, quinase MAP, influxo celular de Ca^{2+} dependente de PKC; esse efeito é dependente da $PKC\alpha$ e se dá tanto sobre o trocador Na^+/H^+ como no transporte de K^+ basolateral (HARVEY et al., 2002; GOOD et al., 2002).

O íon cálcio é um segundo mensageiro crucial para a resposta rápida da aldosterona (HARVEY et al., 2002). Em adição à via genômica, a aldosterona promove uma resposta pré-genômica rápida, que envolve o aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Existem fortes evidências que a resposta pré-genômica pode influenciar o processo genômico (MOËLLIC et al., 2004).

Foi demonstrado que a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ serve como um segundo mensageiro no sinal de transdução iniciada pela aldosterona, para rápida ativação do trocador Na^+/H^+ ; a rápida ativação do trocador estimularia a entrada de sódio na célula, com conseqüente aumento do volume celular, que serviria de segundo mensageiro para ação não-genômica da aldosterona (GEKLE et al., 1998)

Em síntese, um sistema de dois passos é sugerido para o efeito da aldosterona: um rápido, direto, não-genômico, com período de latência de 1 a 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 de transportadores proteicos.

2.3 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL (ANP)

O ANP é um hormônio peptídeo formado por 28 aminoácidos, inicialmente descrito como produzido pelos cardiomiócitos atriais. Atualmente, sabe-se que pode ser produzido em vários tecidos, inclusive nos túbulos renais (CARUSO-NEVES et al., 2004). Possui potente efeito natriurético, diurético e vasodilatador que contribui para a manutenção da pressão sanguínea e homeostase de volume (WANG et al., 2006).

O ANP age também como fator autócrino/parácrino em diferentes órgãos, como pulmão, timo e cérebro. Aparentemente, pode estar envolvido também no controle do volume do fluido cerebrospinal, do humor aquoso e da bile, bem como do volume celular (ABDULLA, 2001)

2.3.1 Receptores de ANP

Está bem estabelecido que o ANP possui um receptor de membrana acoplado a guanilato ciclase e funções celulares moduladas pelo segundo mensageiro intracelular GMPC (WANG, et al 2006). Os receptores para o ANP, possuem, *per si*, atividade de guanilil-ciclase.

Os receptores do ANP têm um domínio extracelular (que se liga ao ANP), uma hélice transmembrana única e um domínio intracelular guanilil-ciclase. A ligação do ANP ao receptor estimula a atividade da guanilil-ciclase e eleva os níveis intracelulares do segundo mensageiro, GMPc, sem intermediação de proteína G ou de qualquer outra proteína transdutora de sinais. Com a elevação da concentração de GMPc, as cinases protéicas dependentes de GMPc são estimuladas, fosforilando proteínas celulares para evocar as respostas celulares (BERNE et al., 2004).

São conhecidos três tipos de receptores: NPR-A, B e C (ou GC-A, B e C). O receptor NPR-A é biologicamente ativo, sendo ativado primordialmente pelo ANP e, menos extensamente, pelo Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP). Já o receptor NPR-B, não é ativado pelo ANP nem pelo BNP, sendo estimulado pelo Peptídeo Natriurético tipo-C. O receptor NPR-C (ou GC-C) possui um domínio extracelular homólogo ao NPR-A e B, mas tem também um pequeno domínio citoplasmático sem atividade guanilato-ciclase (INOUE et al., 2001), sendo seus efeitos biológicos ligados à diminuição dos níveis celulares de AMPc (BALDINI et al., 2005).

O receptor NPR-A está localizado em todo néfron, do glomérulo ao ducto coletor medular interno, sendo observado acúmulo de GMPc induzido por ANP ao longo de todos os segmentos tubulares. Contudo, as regiões de maior concentração de GMPc são o glomérulo e o ducto coletor medular interno. Estudos recentes mostram que camundongos com deficiência em NPR-A não apresentam diurese em resposta a infusão de solução salina isotônica, sugerindo que este receptor é essencial para a natriurese (INOUE et al., 2001).

2.3.2 Transporte Tubular de Na^+ e Água

O rim é o principal local de ação do ANP. Este hormônio age na vasculatura renal e nas células epiteliais tubulares, demonstrando efeitos hemodinâmicos e tubulares que diminuem a reabsorção tubular de Na^+ e água; o ANP aumenta a filtração glomerular, mas provavelmente, seus efeitos tubulares predominam sobre os efeitos nos glomerulos (WANG et al., 2005).

Segundo Wang et al. (2006), após infusão de ANP, o débito do fluido tubular proximal e a excreção fracional de lítio não foram alterados, indicando pouco ou nenhum efeito direto do ANP na reabsorção proximal de sódio e água. Em contraste ao pequeno efeito do ANP no túbulo proximal e alça ascendente espessa, grande efeito no ducto coletor foi relatado: baixas doses de ANP (10^{-10} M) inibem 50% da reabsorção de fluido, provavelmente por inibir o transportador $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ sensível aos tiazídicos (INOUE et al., 2001).

O mecanismo de reabsorção transcelular de Na^+ no túbulo proximal envolve, primeiramente, a entrada passiva de Na^+ através da membrana apical, devido a $[\text{Na}^+]_i$ ser menor que a luminal, estabelecida pela extrusão de sódio pela bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ basolateral, utilizando para tal uma variedade de co-transportadores apicais incluindo o trocador Na^+/H^+ . Assim, o ANP modula o influxo celular de sódio, embora não se saiba se este efeito no túbulo proximal, seja devido a uma modulação direta primária da atividade dos transportadores de sódio ou não (BELTOWSKI, 2002). Segundo Hammond e colaboradores (1994), o ANP aumenta a fração de excreção de Na^+ e P (fósforo), por afetar o cotransportador $\text{Na}^+\text{-Pi}$, bem como a fração de excreção do HCO_3^- , em vesículas de membrana da borda-em-escova luminal do túbulo proximal. Porém, vários estudos demonstram que o ANP sozinho possui pouco ou nenhum efeito na reabsorção proximal de sódio e água (WANG, 2005; EITLE, 1998; APERIA et al., 1994).

A atividade da Na^+/K^+ -ATPase basolateral, em túbulo proximal, constitui um importante passo durante a reabsorção proximal de sódio. O ANP sozinho não inibe a atividade dessa enzima (CARUSO-NEVES, et al., 2003; APERIA, et al., 1994), porém impede a estimulação induzida pela Angiotensina II e norepinefrina (APERIA, 1994).

O ANP impede a estimulação da reabsorção proximal de HCO_3^- promovida pela ANG II, porém sozinho não interfere nesse mecanismo (GOMES e MELLO-AIRES, 1992).

Em contraste ao pequeno efeito do ANP no túbulo proximal, no duto coletor medular interno, este hormônio inibe a reabsorção eletrogênica de Na^+ , via canal de cátion sensível ao amiloride (LIGHT, 1989).

Em conclusão: no túbulo proximal, o ANP tem efeito indireto inibidor da reabsorção de sódio, por inibir o efeito estimulador direto da Angiotensina II sobre esse processo. Visto a intensa relação hormonal do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, será que o ANP também inibe o efeito estimulador, genômico e não genômico, da Aldosterona sobre a reabsorção proximal de sódio (efeito esse que nosso Laboratório acaba de demonstrar)? Este é o objetivo de nosso presente estudo.

2.3.3 Regulação do pHi

O ANP pode estimular ou inibir o trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE1), dependendo do tipo celular. Em células do tecido nervoso (sinaptossomas) o ANP, após um aumento de carga intracelular de H^+ , causa diminuição da entrada de Na^+ para a vesícula, via inibição do trocador Na^+/H^+ (KANDA, 1992). Enquanto que em cultura de células da musculatura lisa da aorta, o ANP (10^{-7} M) aumenta a velocidade de recuperação do pHi, via estimulação do trocador Na^+/H^+ (RICCI, 1996).

É interessante comentar que, em células MDCK (linhagem de células com similaridades morfo-fisiológicas do néfron distal de mamíferos), após pulso ácido com NH_4Cl : 1) a ANG II e a AVP (arginina vasopressina) em baixa dose (10^{-12} M) estimulam o trocador Na^+/H^+ , aumentando a velocidade de recuperação do pHi dependente de Na^+ e 2) enquanto em dose elevada [ANG II (10^{-7}) e AVP (10^{-6})] diminuem a velocidade de recuperação de pHi dependente de Na^+ , demonstrando um efeito bifásico de ambos os hormônios no trocador Na^+/H^+ . Tais efeitos são

inibidos pelo ANP, que sozinho não mostra efeito sobre o trocador Na^+/H^+ , (OLIVEIRA-SOUZA e MELLO-AIRES, 2000; OLIVEIRA-SOUZA e MELLO-AIRES, 2001).

A extrusão de íons hidrogênio através da H^+ -ATPase, em células MDCK, também é estimulada por ANG II e AVP (dose dependentemente), com o ANP impedindo esse efeito. Contudo o ANP sozinho não produz efeito algum na H^+ -ATPase (OLIVEIRA-SOUZA et al., 2002).

2.3.4 Concentração de Cálcio Citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

A elevação na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é um importante mecanismo de sinalização em muitos tipos celulares. Em células de músculo liso vascular, a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é o gatilho para a contração muscular (TAKEUCHI et al., 1989). Esta concentração iônica também modula mecanismos de controle do pH*i* estimulados por diferentes hormônios

O ANP, em hepatócitos, estimula a produção de cGMP, atenua as oscilações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, estimula o efluxo de cálcio e inibi parcialmente o influxo basal de Ca^{2+} ; sendo que esses efeitos sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ preveniriam a injúria celular (ANNE, 2002)

Em células MDCK, o aumento e diminuição da velocidade de recuperação do pH*i* via trocador Na^+/H^+ , causadas pela ANG II e pelo AVP, são em parte devidos ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por ambos hormônios. Em contra partida, o ANP sozinho ou na vigência de ANG II ou AVP, não permite o aumento da velocidade de recuperação do pH*i*, uma vez que, sozinho ou na vigência de ANG II ou AVP, impede a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (OLIVEIRA -SOUZA e MELLO-AIRES, 2000; OLIVEIRA-SOUZA e MELLO-AIRES, 2001).

A elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ também está relacionada à extrusão de H^+ através da H^+ -ATPase, enzima estimulada pela ANG II e AVP (dose dependentemente), e da mesma forma que no caso do Na^+/H^+ , o ANP inibe tal efeito, por impedir o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (OLIVEIRA-SOUZA et al., 2002).

Estudos recentes do nosso Laboratório comprovam que a Aldosterona, por mecanismos genômicos e não genômicos, aumenta a velocidade de recuperação de pH*i*, em túbulo proximal de ratos, através da estimulação do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE1) e da H^+ -ATPase, causada por aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (LEITE-DELLOVA et al., 2008). Entretanto, não se sabe se o ANP inibe esses efeitos da Aldosterona, não sendo conhecido o papel do ANP nas ações genômicas e não

genômicas da Aldosterona sobre a $[Ca^{2+}]_i$. Estas questões justificam o interesse no desenvolvimento do presente estudo.

2.4 TÚBULO PROXIMAL – SEGMENTO S3

O túbulo renal proximal é formado por dois segmentos superficiais (S1 e S2) e por um segmento não superficial (S3). Assim, a grande maioria dos estudos de transporte iônico e de fluido foram feitos nos segmentos S1 e S2, pouco se sabendo a respeito da fisiologia do segmento S3. Isso se deve ao fato que é impossível fazer micropunção do segmento S3, pois essa técnica só permite a visão sob microscópio de segmentos superficiais. Também a microdissecção do S3 é muito difícil em virtude dele estar aderido fortemente, por tecido conjuntivo, às alças de Henle e aos ductos coletores (segmentos tubulares não superficiais).

Entretanto, atualmente em nosso Laboratório foi montada a técnica de microdissecção do segmento S3 em ratos jovens, que tem pouco tecido conjuntivo ao redor dos túbulos. É uma técnica relativamente difícil, pois requer grande habilidade manual, mas abre um novo campo de estudo da fisiologia tubular renal do Segmento S3.

Recentes estudos desenvolvidos no nosso Laboratório, demonstraram que no segmento S3 a Aldosterona possui um efeito bifásico (altas doses inibi o NHE1 e baixas doses o estimula) genômico e não-genômico, e que tais efeitos ocorrem devido ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$. O mesmo acontece em relação á H^+ -ATPase, em que a aldosterona tem um efeito estimulador, dose dependente (LEITE-DELLOVA et al., 2008).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os nossos resultados permitem concluir que no Segmento S3 de rim de rato:

- A aldosterona possui um efeito não genômico na regulação do pH_i via trocador Na^+/H^+ , com tempo de latência de 2 minutos.
- Esse efeito não genômico da aldosterona é bifásico: em baixa dose (10^{-12} M) o hormônio estimula o trocador, enquanto que em alta dose (10^{-6} M) o inibe.
- O ANP (10^{-6} M) sozinho não possui efeito sobre o trocador .
- O ANP inibe o efeito bifásico da aldosterona sobre o trocador.
- O efeito bifásico de ambas doses de aldosterona sobre o trocador é mediado pelo aumento, dose dependente, da $[Ca^{2+}]_i$.
- O ANP diminui a $[Ca^{2+}]_i$.
- O ANP impede o efeito estimulador, dose dependente, da aldosterona sobre a $[Ca^{2+}]_i$.

REFERÊNCIAS

AMMAR, Y.B.; TAKEDA, S.; HISAMITSU, T.; MORI, H.; WAKABAYASHI, S. Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and its implication for pH regulation. **EMBO J.**, v. 7, n. 22, p. 2315-2325, 2006.

GREEN, A.K.; ZOLLE, O.; SIMPSON, A. W. M. Atrial Natriuretic Peptide Attenuates Ca^{2+} Oscillations and Modulates Plasma Membrane Ca^{2+} Fluxes in Rat Hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1291-1303, 2002

BALDINI, P.M.; DE VITO, P.; VISMARA, D.; BAGNI, C.; ZALFA, F.; MINIERI, M.; DI NARDO, P. Atrial natriuretic peptide effects on intracellular pH changes and ROS production in HEPG2 cells: Role of p38 MAPK and Phospholipase D. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 15, p. 77-88, 2005

BERNE, R. M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Receptores de membrana, segundos mensageiros e vias de transdução de sinais. In: BERNE, R. M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 65-82

BERNE, R. M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Controle da Osmolaridade e do volume do Fluidos Corporais. In: BERNE, R. M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2004. p. 701-727

BIDET, M.; MEROT, J.; TAUC, M.; POUJEL, P. Na/H exchanger in proximal cells isolated from kidney. II. Short-term regulation by glucocorticoids. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. F945-951, 1987.

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

CARAMELO, C.; LÓPEZ-FARRÉ, A.; RIESCO, A.; OLIVEIRA, A.; OKADA, K.; CRAGOE Jr, E. J.; TSAI, P.; BRINER, V. A.; SCHRIER, R. W. Atrial natriuretic peptide and cGMP inhibit Na^+/H^+ antiporter in vascular smooth muscle cells in culture. **Kidney Int.**, v. 45, p. 666-675, 1994.

CARUSO-NEVES, C.; VIVES, D.; DANTAS, C.; ALBINO, C.M.; FONSECA, L.M.; LARA, L.S.; ISSO, I.; LOPES, A.G. Oubain-insensitive Na^+ -ATPase of proximal tubules is an effector for urodilatin and atrial natriuretic peptide. **Biochim. biophys Acta**, v. 1660, p. 93-98, 2004

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

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

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

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

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

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Técnicas anestésicas em animais de laboratório. Manual para técnicos em bioterismo**. 2^o Ed São Paulo: Cobeia, 1996, p. 157-164.

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.; WÜNSCH, S. Non-genomic action of the mineralocorticoid aldosterone on cytosolic sodium in culture kidney cells. **J. Physiol.**, v. 511, n. 1, p. 255-263, 1998.

GOMES, G. N.; Mello-Aires, M. Interaction of atrial natriuretic factor and angiotensin II in proximal HCO_3^- reabsorption. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 262, p. F214-222, 1992.

GOOD, D. W.; GEORGE, T.; WATTS III, B. A. Aldosterone inhibits HCO_3^- absorption via a non-genomic pathway in medullary thick ascending limb. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 283, p. 699-706, 2002

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. 3440-3445, 1985.

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

INOUE, T.; NONOGUCHI, H.; TOMITA, K. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. **Cardiovasc. Res.**, v. 51, p. 470-480, 2001.

KANDA, F.; SARNACKI, P.; ARIEFF, A.I. Atrial natriuretic peptide inhibits amiloride sensitive sodium uptake in rat brain. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. 279-283, 1992

LEITE-DELLOVA, DCA; OLIVEIRA-SOUZA, M; MALNIC, G; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic dose dependent bifasic effects of aldosterone on Na^+/H^+ exchanger in proximal S3 segment: role of cytosolic calcium. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, 2008. In press

LIGHT, D.B.; SCHWIERBERT, E.M.; KARLSON K.H.; STANTON, B.A. Atrial natriuretic peptide inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells. **Science**. v. 243, p. 383-385, 1989

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

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

MARVER, D.; KOKKO, J.P. Renal target sites and the mechanism of action of aldosterone. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 9, p. 1-18, 1983.

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.

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.**, v. 205, n. 2, p. 49-60, 2005.

NAKHOUL, N.L.; HAMM,L. L. Vacuolar H^+ -ATPase in the kidney. **J. Nephrol.**, v. 15, p. S22-31, 2002. Suppl.5

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Interaction of angiotensin II and atrial peptide on pH regulation in MDCK cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, p. 944-953, 2000

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Effect of arginine vasopressin and ANP on intracellular pH and cytosolic free $[\text{Ca}^{2+}]$ regulation in MDCK cells. **Kidney Int.**, v. 60, p. 1800-1808, 2001.

OLIVEIRA-SOUZA, M; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Atrial natriuretic peptide impairs the stimulatory effect of angiotensin II on H^+ -ATPase. **Kidney Int.**, v.63, p. 1693-1699; 2002

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MUSA-AZIZ, R.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Arginine vasopressin stimulated H^+ -ATPase in MDCK cells via V1 (cell Ca^{2+}) and V2 (cAMP) receptors. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 286, p. 402-408, 2004

RICCI,R.; BALDINI P.; BOGGETTO, L.; DE VITO, P.; LULY, P.; ZANNETTI, A.; INCERPI, S. Dual modulation of Na/H antiport by atrial natriuretic factor in rat aortic smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. 643-652, 1997

SCHLÖNDORFF, D.; BONVENTRE, J. V. **Molecular Nephrology**: kidney function in health and disease. New York: Marcell Dekker, 1995.

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.

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

VESELY, D.L. Natriuretic peptides and acute renal failure. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 285, p. 167-177, 2003

VILELA, 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.

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.; LI, C.; NEJSUM, L.N.; LI, H.; KIM, S.W.; KWON, T.; JONASSEN, T.E.N.; KNEPPER, M.A.; THOMSEN, K.; FROKIAER, J.; NIELSEN, S. Biphasic effects of infusion in conscious, euvoletic rats: roles of AQP2 and EnaC trafficking. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 290, p. F530-541, 2006