

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP**

JOSÉ BENEDITO OLIVEIRA AMORIM

**EFEITO LUMINAL DA ANGIOTENSINA SOBRE A
SECREÇÃO DE POTÁSSIO EM TÚBULOS DISTAIS
DE RIM DE RATOS**

São José dos Campos-SP

2010

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP**

JOSÉ BENEDITO OLIVEIRA AMORIM

**EFEITO LUMINAL DA ANGIOTENSINA SOBRE A
SECREÇÃO DE POTÁSSIO EM TÚBULOS DISTAIS
DE RIM DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - FOSJC, como parte dos requisitos à obtenção do título de LIVRE DOCENTE na Disciplina de Fisiologia, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

**São José dos Campos
2010**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Amorim, José Benedito Oliveira
Efeito Luminal da Angiotensina sobre a secreção de Potássio em Túbulos Distais de Rim de Ratos/
José Benedito Oliveira Amorim. — São José dos Campos : [s.n.]; 2010
91f. : il.
Tese de Livre-Docência (Fisiologia) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP; 2010.

1. Microperfusão 2. Túbulo Distal 3. Angiotensina 4. Canal para Potássio 5. Rim I. Amorim, José Benedito Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.
São José dos Campos, 20 de Novembro de 2010.

Assinatura :

E-mail:amorim@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Candidato: Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim

Título da Tese: Efeito Luminal da Angiotensina sobre a secreção de Potássio em Túbulos Distais de Rim de Ratos

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Livre-Docência, em sessão pública realizada a...../...../....., considerou:

() Aprovado

() Reprovado

Examinador (a) Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a) Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a) Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a) Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a) Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Dedico este trabalho:

*aos meus filhos Guilherme e Rodrigo
e a minha esposa Rosana*

AGRADECIMENTOS

A *DEUS*, por ter me sustentado, abençoado e iluminado em todos os momentos da minha vida.

Ao Professor *Gerhard Malnic*, por todo o conhecimento que transmite, por toda competência e seriedade com que conduz a sua vida acadêmica e científica, por toda a paciência no trato com aqueles que o cercam, meus eternos agradecimentos. Somente aqueles que tiveram a raríssima oportunidade de acompanhar um *átimo* de sua presença são capazes de entender o prazer e alegria de trabalhar contigo.

Ao Professor *Divo Leonardo Sanioto*, pela amizade, confiança, incentivo e principalmente, por despertar nas pessoas o desejo infinito do saber.

A Professora *Wilma Pereira Bastos Ramos*, pelo carinho, amizade, orientação desde o princípio minha jornada na Faculdade de odontologia de São José dos Campos.

A todos os **Professores** com que tive a oportunidade de apreender e enriquecer meus conhecimentos, permitindo meu crescimento tanto profissional quanto pessoal.

Aos meus **amigos e colegas** da UNESP e da USP, por todos os momentos alegres e engrandecedores compartilhados.

A meus pais (*in memoriam*), pela vida, amor e retidão de caráter sem os quais minha existência não teria real significado.

Aos meus familiares, especialmente **Ronildo de Menezes e Zilda Pezzo de Menezes**, pela presença constante, dedicação, conselhos e auxílios em todos os momentos de minha vida e que me fizeram melhor do que sou.

A Faculdade de Odontologia de São José dos Campos UNESP pela oportunidade profissional e de crescimento contínuo, não só na graduação como na pós-graduação.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) por concretizar o ideal de realização de pós-graduação de alto nível, sempre mantendo as portas abertas para a continuidade do aprendizado, do conhecimento e do desenvolvimento científico, daqueles que o procuram.

Aos funcionários que me ajudaram em todos os momentos de minha carreira profissional. Em especial a *Ivoneide Leandro de Almeida* pela dedicação, honestidade e lealdade durante o tempo que compartilhamos nossas existências.

A *Silvia Scarpel*, pela dedicação, competência e auxílio da elaboração das documentações necessárias para realização do presente concurso.

A FAPESP, FUNDUNESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

"A vida é curta, mas a arte é longa e para dominar a arte e acrescentar ao patrimônio humano alguma coisa, é necessário antes de tudo que a brevidade da vida se multiplique no trabalho, se enriqueça no amor, se ilumine no ideal e se retempere na luta".

Hipócrates

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ilustração do transporte de potássio pelas células epiteliais tubulares, durante ingestão normal deste cátion. Duto Coletor Cortical (CCD); Córtex Renal (C); Medula Externa (OM); Medula Interna (IM); célula principal (PC); célula intercalada (IC) – Adaptado de Wang e Giebisch, 2009.....	19
Figura 2-	Ilustração do transporte de potássio ao longo dos túbulos renais. Túbulo Proximal (PCT), Segmento Espesso da Alça de Henle (TAL); Túbulo Distal (DCT), Túbulo Coletor Cortical (CCT); Duto Coletor Medular (MCD); Reabsorvido (R); Secretado (S); Túbulo Conector Inicial (ICT) – Adaptado de Giebisch, 1998	24
Figura 3-	Esquema representativo dos mecanismos de transporte de K ⁺ envolvidos na atividade dos canais ROMK e BK, pelas células tubulares do CCD- Adaptado de Giebisch e Wang, 2000.....	26
Figura 4-	Esquema global da gênese de Angiotensina no organismo.....	29
Figura 5-	Esquema mostrando diferentes vias de sinalização celular que modulam a secreção de K ⁺ pelos canais ROMK e BK no DCC. Adaptado de Wang e Giebisch, 2009.....	35
Figura 6-	Desenho esquemático do sistema experimental. A esquerda, micropipeta dupla com solução perfusora controle (P) e óleo mineral corado (C). A direita, micropipeta dupla com resina de troca iônica (IE) e solução de referência (Ref). Uma terceira micropipeta simples (S) também foi utilizada no túbulo proximal ou distal final durante a microperfusão com solução experimental.....	47

Figura 7-	Registro seqüencial de uma série de microperfusões realizados em túbulo distal, utilizando solução controle (C) contendo 0.5mM de potássio.....	49
Figura 8a -	Gráfico mostrando a variação da concentração de K+ ($\Delta[K]$), em função do tempo (t), durante perfusão controle na alça distal final cortical.....	50
Figura 8b -	Gráfico mostrando a variação da concentração de K+ ($\Delta[K]$), em função do tempo (t), durante perfusão experimental na alça distal final cortical.....	50
Figura 9 -	Ilustração do efeito da Perfusão luminal de Angiotensina II sobre a concentração estacionária de potássio, K+s, em função do tempo de aquisição (segundos). Amarelo e Azul continham Angiotensina II $10^{-9}M$ e $10^{-11}M$, respectivamente; Verde, perfusão controle.....	52
Figura 10-	Fluxo secretório de potássio obtido durante a perfusão luminal de diferentes concentrações de Angiotensina II. Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos; * $p < 0.05$ comparado ao controle.....	53
Figura 11-	Efeito dos bloqueadores de receptor AT1 (Losartan e Candesartan) sobre o fluxo secretório de potássio (JK+). Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos.	54
Figura 12-	Efeito da perfusão luminal com 8-Br-AMPC e do H89 sobre a secreção de K+ (JK+). Em amarelo (N), número de túbulos perfundidos, * $p < 0.001$	56
Figura 13-	Efeito da perfusão luminal com PGE2 (10^{-6} e $10^{-9}M$) e do inibidor da Ciclo-oxigenase (Indometacina – $10^{-6}M$), sobre o fluxo secretório de potássio (JK+). Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos, * $p < 0.001$	57
Figura 14-	Efeito do PD 123319 (bloqueador específico do receptor AT2) sobre o fluxo secretório de Potássio (JK+). Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos.....	58
Figura 15-	Ilustração da via de sinalização celular envolvida no acoplamento da Arginina Vasopressina (à esquerda) e da Angiotensina II (à direita) através do receptor AT1.....	67

- Figura 16- Ilustração da via de sinalização celular envolvida no acoplamento da Angiotensina II (à direita) no receptor AT2..... 68
- Figura 17- Ilustração da via de sinalização celular envolvida no acoplamento da Angiotensina II e posterior estímulo de síntese de PGE2..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros ácido-base sanguíneos, e concentrações de Na ⁺ e K ⁺ plasmáticos, obtidos durante os experimentos de microperfusão renal.....	51
Tabela 2 -	Valores de fluxo secretório de K ⁺ (J _{K+}), nos grupos controle e experimental (Angiotensina), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais.....	52
Tabela 3 -	Valores de fluxo secretório de K ⁺ (JK ⁺), nos grupos controle e experimental (Antagonistas de receptores de Angiotensina), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais.....	54
Tabela 4 -	Valores de fluxo secretório de K ⁺ (JK ⁺), nos grupos controle e experimental (Agonista e Antagonista da via AMPc/PKA), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais.....	55
Tabela 5 -	Valores de fluxo secretório de K ⁺ (J _{K+}), nos grupos controle e experimental (PGE2), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais.....	57

DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Solução perfusora luminal Controle (em mM)- 100 NaCl, 1 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1NH₄Cl, 10 HEPES, 0.5 KCl. A osmolalidade desta solução foi ajustada com rafinose (PM 395), para 300 mOsmol/Kg de H₂O.
- Soluções padrões (em mM) – 100 NaCl, 1 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1NH₄Cl, 10 HEPES, KCl 3 , 10, 30.
- Angiotensina II (Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, Brasil)
- Arginina Vasopressina (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)
- Prostaglandina E₂ – (Sigma Chemical, CO, St Louis, USA)
- Losartan (DUP 753; Du Pont Merck, Wilmington, DE) – inibidor do receptor AT₁
- Candesartan – Inibidor específico de AT₁R (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)
- PD123319 - (Sigma Chemical Company, St Louis, USA) – inibidor do receptor AT₂ – Departamento de Morfologia da Universidade de São Paulo – USP
- Indometacina – Inibidor da ciclo-oxigenase - Cox(Sigma Chemical Company, St Louis, USA)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ang II = Angiotensina II

ATP = Trifosfato de Adenosina

AVP = Arginina-Vasopressina

AMPC = Monofosfato cíclico de adenosina

EPM = Erro padrão da amostra

GMPc = Guanilato ciclase C

MDCK = Mardin-Darby Canine Kidney Cells

PDE = Fosfodiesterase

pH = Concentração hidrogênio iônica

PGE2 = Prostaglandina

EP = Receptor prostanóide

PKA = Proteína cinase ativada por AMPC

PKC = Proteína cinase ativada por Cálcio e DAG

DAG = Diacil glicerol

PTK = Proteína cinase ativada por fosforilação da tirosina

ROMK = Renal Outer Medulla K⁺ channels

SK = Small conductance K⁺ Channels

BK = Big conductance K⁺ channels

DCC = Ducto Coletor Cortical

CNT = Connecting tubule

TAL = Thick Ascending Limb of Loop of Henle

AT1R = Receptor de Ang II - AT1

AT2R = Receptor de Ang II – AT2

ECA = Enzima de Conversão de Angiotensina

SRA = Sistema Renina Angiotensina

DNA = Ácido Desoxirribonuclêico

Min = Minuto

Ang IV = Angiotensina IV (3, 8)

mM = milimolar ($10^{-3}M$)

μM = micromolar ($10^{-6}M$)

pM = picomolar ($10^{-12} M$)

RNA = Ácido Ribonucléico

ml = mililitro

AA = Ácido Araquidônico

PLA2 = Fosfolipase A2

PIP2 = 4,5-bifosfato –fosfatidilinositol

MAPK = Mitogen-activated protein kinase

IP3 = Inositol trifosfato

K^+ = Potássio

K_s = Potássio estacionário

DP = Diferença de Potencial

Aldo = Aldosterona

IBTX = Iberiotoxina

TEA = Tetraetilamônio

SCC = Sistema Cinina-Caliceína

NEP = Endopeptidase Neutra

Amorim JBO. Efeito luminal da angiotensina sobre a secreção de potássio em túbulos distais de rim de ratos [tese]. São José dos Campos: Concurso de Livre-Docência, Disciplina de Fisiologia, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista-UNESP; 2010.

RESUMO

Estudamos o efeito da Angiotensina II sobre a secreção de potássio em túbulo distal final (segmento conector e duto coletor cortical) através da técnica de microperfusão estacionária in vivo e mensuração da atividade catiônica por meio de microeletrodos contendo resina de troca iônica sensível a K⁺. A perfusão luminal com ANG II reduziu o fluxo secretório de potássio (JK⁺) observado no grupo controle de 0.90 ± 0.19 nmol/cm².s, n=12, para 0.51 ± 0.05 , n=9, (ANG II 10-12M), 0.70 ± 0.22 , n=27 (ANG II 10-11M) e 0.63 ± 0.08 nmol/cm².s, n=12 (ANG II 10-9M); (p<0.05 teste t pareado). Entretanto, na presença de dose elevada de ANG II (10-6M) não observamos efeito significativo sobre o JK⁺. A presença de Losartan (10-6M), um bloqueador não peptídico do receptor AT1 reverteu o efeito inibitório da ANG II. No intuito de se avaliar a possibilidade da via PLA2/ácido araquidônico/PGE2 participar deste processo de regulação celular, uma vez que tais agentes participam da inibição de outros mecanismos de transporte que envolve a ativação da sinalização celular mediada por Angiotensina II, perfundimos luminalmente PGE2 o qual inibiu o fluxo secretório de K⁺ em ambas doses utilizadas no presente trabalho; Jk⁺ controle = 0.93 ± 0.08 nmol/cm².s, n=12 para 0.55 ± 0.05 nmol/cm².s, n=12 (PGE2 10-9M) e 0.47 ± 0.04 nmol/cm².s, (PGE2 10-6M), n=12, (p<0.01). A perfusão com Indometacina (10-5M), bloqueador inespecífico da via PLA2/Ácido Araquidônico/PGE2 associado a Angiotensina II (10-9M) aumentou o JK⁺ (0.95 ± 0.12 nmol.cm⁻².s⁻¹, n = 13) quando comparado a perfusão isolada de ANG II (10-9M) (Jk⁺ = 0.63 ± 0.05 nmol/cm².s, n = 10); (p<0.05). Concluímos que a ANG II inibiu luminalmente a secreção distal de K⁺ provavelmente acoplado ao receptor AT1 e este efeito pode ser mediado pela via PLA2/Ácido Araquidônico/ /PGE2.

PALAVRAS CHAVES: Microperfusão, Angiotensina, Túbulo Distal, Canal para Potássio, Rim.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO	16
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Mecanismos de transporte do potássio ao longo do néfron.....	22
1.2 Importância do sistema Renina Angiotensina no organismo....	28
1.3 Papel da Angiotensina no transporte de potássio pelo epitélio renal	32
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAL E MÉTODO	38
3.1 Fase cirúrgica	39
3.1 Preparo das micropipetas duplas e microeletrodos	40
3.2 Metodologia de Microperfusão	42
3.3 Medidas de Potenciais elétricos e Análise das Curvas de Atividade de K ⁺	44
4 RESULTADOS	48
4.1 Efeito da Angiotensina	51
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS	71
ANEXO	90
ABSTRACT	91

1 INTRODUÇÃO

O íon potássio (K^+) constitui um dos elementos químicos mais abundantes do líquido intracelular, participando como ator principal de inúmeras funções celulares, tais como: crescimento celular, divisão celular, síntese de DNA e proteínas, regulação do volume celular, balanço ácido-base, atividade dos miócitos cardíacos e das células musculares lisas e estriadas esqueléticas, transporte em membranas biológicas, entre outras.

A constância da sua concentração plasmática no meio interno é mantida principalmente pela atividade do Sistema Renal, uma vez que dos 100mEq de K^+ ingeridos diariamente, pela dieta (em média), 90% são excretados pelos rins, sendo o restante final excretados pelo trato gastrointestinal, saliva e suor, respectivamente. Para tamanha importância, os rins atuam filtrando livremente este cátion, nos glomérulos renais, reabsorvendo-o extensivamente ao longo do túbulo proximal e segmento espesso da alça de Henle. Posteriormente, decorre secreção do potássio no segmento conector (CNT) e ducto coletor cortical (CCD) e finalmente este íon é reabsorvido no ducto coletor medular externo (OMCD) de acordo com as necessidades do ajuste fino do potássio no organismo (Wang e Giebisch, 2008).

Estudos de micropunção e microperfusão mostraram que o ducto conector e coletor inicial e cortical (DCC) é o principal sítio de regulação fina da secreção de K^+ . Neste segmento existem dois tipos celulares: a célula principal, responsável pela secreção de K^+ e reabsorção de Na^+ ; e a célula intercalar; envolvida principalmente na

reabsorção de K^+ e secreção de próton (H^+), via trocador K^+/H^+ e H^+ -ATPase do tipo vacuolar (Figura 1).

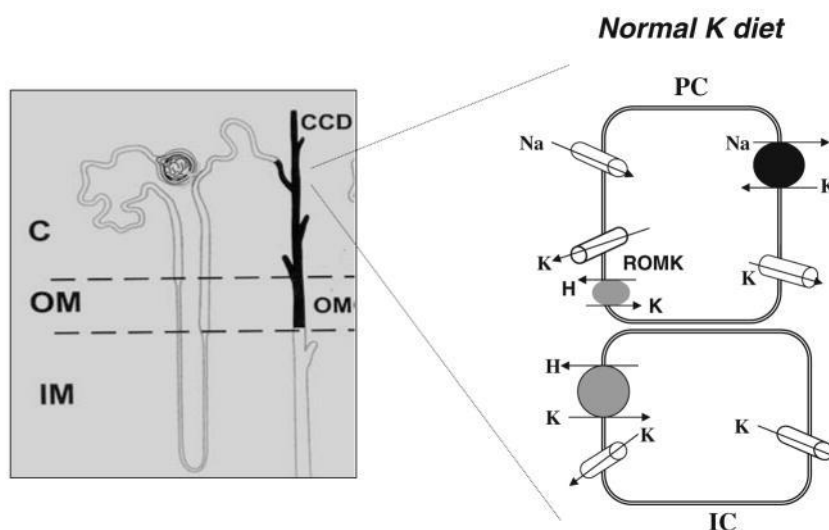


FIGURA 1- Ilustração do transporte de potássio pelas células epiteliais tubulares, durante ingestão normal deste cátion. Duto Coletor Cortical (CCD); Córtex Renal (C); Medula Externa (OM); Medula Interna (IM); célula principal (PC); célula intercalada (IC) – Adaptado de Wang e Giebisch, 2009.

Há vários agentes hormonais que participam ou interferem na regulação do transporte do potássio em diversos tecidos no organismo (Insulina, Noradrenalina, tiroxina, entre outros). No sistema renal são conhecidos alguns fatores que afetam o transporte de K^+ , tais como: elevação do ritmo (fluxo) de perfusão, presença de ânions impermeantes, meio alcalino, entre outros. Já, entre os hormônios conhecidos que modulam a secreção de potássio por sua ação predominantemente renal, destacam-se os mineralocorticóides e a vasopressina (Amorim e Malnic, 2000).

Inúmeros trabalhos demonstraram o efeito dos mineralocorticóides, especialmente da aldosterona, na reabsorção de Na^+ , e no aumento da secreção de K^+ e H^+ , em ducto coletor cortical (Field et al., 1984). Este hormônio penetra na membrana basolateral (MBL) por difusão, devido a sua lipossolubilidade, aumentando diretamente e de

forma aguda a permeabilidade da membrana luminal (ML) ao Na^+ (efeito não genômico) (Field et al., 1984; Giebisch, 1998; Wang et al., 1992) . No citoplasma, a aldosterona combina-se também com um receptor, formando um complexo ativo, receptor-esteróide, que por sua vez, penetra no núcleo e induz a transcrição de RNAmensageiro e RNAribossômico (efeito genômico) (Staton e Giebisch 1982/1992; Giebisch, 1998), levando ao aumento da síntese de proteínas. Entre tais proteínas, estudos direcionados ao entendimento dos efeitos agudos e crônicos de mineralocorticóides mostraram que existe um aumento na taxa de “*turnover*” da Na^+/K^+ -ATPase, com inserção de novas unidades desta ATPase na MBL, e aumento da permeabilidade ao sódio e ao potássio da membrana apical. As últimas proteínas podem estimular a secreção ativa de H^+ , bem como, o aumento da permeabilidade ao Na^+ na ML. O aumento da concentração de Na^+ intracelular estimula a atividade da Na^+/K^+ -ATPase da MBL, aumentando a reabsorção de Na^+ e a concentração de K^+ intracelular. A estimulação do transporte de Na^+ torna a luz tubular mais negativa. Ambos os aumentos, da concentração intracelular de K^+ e da negatividade luminal, determinam uma elevação da secreção de K^+ , amplificando o fluxo secretório inicial, induzido pelo efeito imediato da aldosterona. A regulação da liberação da aldosterona pela supra-renal decorre principalmente de alterações da concentração plasmática de Na^+ e de K^+ , e dos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e da Angiotensina II (Giebisch, 1992).

Todavia, existem evidências que sugeriram a participação de outros hormônios que participam da homeostase do K^+ no rim, sob uma variedade de condições fisiológicas (Field e Giebisch, 1985; Wang e Giebisch 2008). Tais achados originaram-se pela utilização da técnica de microperfusão em túbulos renais *in vivo* e *in vitro*, as quais permitiram a avaliação de soluções artificiais com composição eletrolítica similar àquela encontrada no fluido nativo tubular (Haeberle et al., 1983). Quando este

método é aplicado em túbulo proximal, a taxa de reabsorção de fluido e íons é sempre mais baixa do que a observada durante a situação de fluxo livre (Gertz, 1963; Malnic et al, 1966; Stanton e Giebisch, 1982; Stanton e Kaissling, 1988; Malnic et al., 1990; Okusa et al, 1990; Velásquez et al., 1992). As maiores diferenças relatadas entre a técnica de microperfusão por bomba e fluxo livre são observadas no túbulo distal. A reabsorção de Na^+ e a secreção de K^+ também é afetada pela perfusão com fluido nativo, particularmente em túbulo distal (Khuri et al., 1975; Malnic, 1990).

De fato, a secreção de potássio é marcadamente alterada durante perfusão luminal com solução artificial. As razões para estes diferentes resultados podem estar associadas à presença de fatores endógenos, provavelmente adicionados ao fluido tubular durante seu percurso ao longo dos túbulos renais, que poderiam exercer efeito modulatório sobre o transporte iônico nos segmentos perfundidos.

Neste horizonte, realizamos no laboratório de Fisiologia e Biofísica Renal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP), experimentos em que túbulos distais corticais de rim de rato foram perfundidos com agentes hormonais avaliando-se concomitantemente o fluxo secretório de potássio (K^+), os quais revelaram que a AVP (Arginina Vasopressina) atua neste processo de transporte transepitelial estimulando a secreção de potássio pelo segmento final do nefro (Amorim e Malnic, 2000). Posteriormente observamos os possíveis mecanismos de transdução de sinal envolvidos no acoplamento do AVP nos receptores luminiais presentes nas células tubulares nos túbulos renais distais, bem como a natureza dos canais envolvidos nestes mecanismos de transporte (Amorim & Malnic 2003, 2004).

Todavia, ao avaliarmos outros agentes biologicamente ativos observamos efeitos distintos os quais julgamos importantes de serem investigados e apresentados no presente trabalho. Dentre estes agentes elencamos a Angiotensina II como alvo principal, devido ao seu

papel no transporte iônico tubular renal, sua interação com hormônios que atuam na manutenção de potássio pelo organismo (Aldosterona) e pelas evidências relatadas nos últimos anos por diversos laboratórios e pesquisadores.

1.1 Mecanismos de transporte do potássio ao longo do néfron.

Estudos de microperfusão e em fluxo livre, demonstraram que aproximadamente 65% do K^+ filtrado são reabsorvidos, por difusão e por *solvent drag*, no epitélio do túbulo proximal, em sua maior parte pela via paracelular, movido pela DP lúmen-positiva dos segmentos S_2 e S_3 . A existência de um componente ativo na reabsorção de K^+ pelo segmento S_1 do túbulo proximal é controvertida. O potássio sai da célula passivamente, por canais iônicos, pela membrana basolateral, a favor do seu gradiente eletroquímico. Sob condições fisiológicas, o ramo ascendente espesso da Alça de Henle (TAL) reabsorve, por transporte ativo adicionalmente cerca de 25% da carga filtrada de K^+ , através do cotransportador $2Cl^-:Na^+:K^+$ localizado na membrana luminal das células situadas neste segmento. O K^+ pode, em parte, voltar passivamente para a luz tubular, através de canais específicos. Entretanto, quando o cotransporte $Na^+:K^+:2Cl^-$ é bloqueado por diuréticos de alça, pode ocorrer também secreção de K^+ no TAL (Oberleithner et al., 1983). Presumivelmente, íons de K^+ são secretados para dentro do lúmen, por canais de K^+ sensíveis a ATP que são responsáveis pela recirculação de K^+ através da membrana apical (Hebert e Andreoli, 1984). Existem também evidências que a reabsorção de K^+ no TAL é regulada por hormônios tais como a vasopressina, que aumenta a condutância apical a K^+ neste segmento e contribui também para a estimulação da reabsorção de NaCl (Molony et al., 1989).

Entretanto, conforme já descrito anteriormente, a reabsorção de K^+ no túbulo proximal bem como no TAL, não são os mecanismos mais importantes na manutenção da homeostase de K^+ extracelular (Giebisch, 1987). Estudos de micropunção e microperfusão têm estabelecido firmemente que o ducto conector, coletor inicial e cortical (DCC) são o principal sítio de regulação fina da secreção de K^+ (Malnic et al., 1964/66/71; Stanton & Giebisch, 1982) (Figura 2). No segmento final do túbulo distal cortical (ou coletor inicial), existe uma diferença de potencial de cerca de -40 mV lúmen-negativa, favorável a transferência deste cátion para a luz tubular. A Na^+/K^+ -ATPase, localizada na membrana basolateral mantém a concentração celular de potássio elevada, fornecendo um potencial químico considerável para secreção passiva de K^+ que se observa nesse segmento tubular. O potássio desta forma pode ser transferido para a luz a favor deste gradiente eletroquímico através da membrana luminal das células epiteliais tubulares.

Os fenótipos celulares presentes neste segmento: a célula principal, responsável pela secreção de K^+ e reabsorção de Na^+ (Koeppen et al., 1983); e a célula intercalar; envolvida principalmente na reabsorção de K^+ e secreção de próton (H^+), via trocador K^+/H^+ (Wingo et al., 1990) e H^+ -ATPase do tipo vacuolar (Gluck et al., 1996) são influenciados por inúmeros fatores regulatórios como hormonais (Aldosterona, Vasopressina), não hormonais (velocidade de fluxo, pH, ânions impermeantes) e metabólicos (ingesta de potássio) (Figura 2).

O conhecimento dos mecanismos de transporte de K^+ renal foi grandemente ampliado por dois métodos. Em primeiro lugar, a introdução por Erwin Neher & Bert Sakmann (1976) da técnica de *patch clamp*, através da qual foi possível estudar a localização e as propriedades dos canais de K^+ ao longo do néfron. Posteriormente, com as técnicas de biologia molecular, foi possível clonar os canais de K^+ , fornecendo novas idéias sobre a estrutura destes canais e sua provável

regulação (Blatz e Magleby, 1986; Ho et al, 1993; Volk et al, 1994; Boim et al., 1995; Desir, 1995; Sakin, 1995; Khöler et al., 1996; Palmer et al., 1997; Xu et al., 1997 ; Joiner et al., 1997; Vergara et al, 1998).

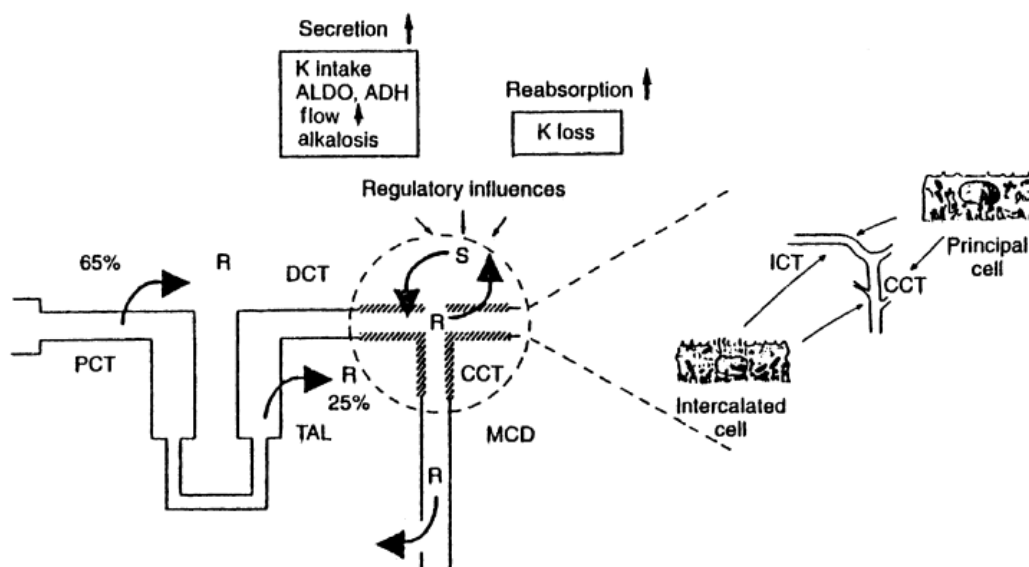


FIGURA 2 - Ilustração do transporte de potássio ao longo dos túbulos renais. Túbulo Proximal (PCT), Segmento Espesso da Alça de Henle (TAL); Túbulo Distal (DCT), Túbulo Coletor Cortical (CCT); Duto Coletor Medular (MCD); Reabsorvido (R); Secretado (S); Túbulo Conector Inicial (ICT) – Adaptado de Giebisch, 2002.

Os canais de K^+ são constituídos por um diversificado grupo de proteínas de membrana, que facilitam o movimento de K^+ através da membrana celular. Geralmente, mais de um tipo de canal de K^+ está presente em células de mamíferos. Nos últimos anos, foram descritos alguns tipos de canais de K^+ , com ampla caracterização molecular, e com seus prováveis papéis fisiológicos.

Segundo Wang et al. (1995), os canais de potássio desempenham ao menos quatro funções em células epiteliais dos túbulos renais. Primeiro, devido à sua alta especificidade ao potássio, estes canais participam na gênese do potencial de membrana (V_m), ou seja, na

diferença de potencial elétrico (DDP) negativo celular, e deste modo suprem a célula de uma força movente para difusão iônica através da membrana apical e basolateral. Segundo, as ativações de canais de potássio por alteração de volume das células tubulares contribuem para o controle do volume celular. Terceiro, a recirculação de íons K^+ por canais específicos para este cátion através da membrana apical e basolateral é um mecanismo essencial para manutenção de um funcionamento adequado de cotransportadores tais como o $Na^+:2Cl^-:K^+$, ou transportadores de natureza ativa (permutadores) como a Na^+/K^+ -ATPase. Finalmente, uma classe especial de canais de potássio de células principais localizada principalmente em ducto coletor cortical, responde a uma grande variedade de estímulos e desempenha o papel mais importante no processo da secreção de potássio.

Vários tipos de canais para potássio foram identificados na membrana apical em células principais de CNT e DCC incluindo ROMK (Kir1.1), canal de grande condutância para potássio (BK) e canal para K^+ com dois poros (KCNK1) por diversas técnicas metodológicas (Wang E Giebisch, 2009). Embora os canais KCNK1 ainda carecerem de maiores esclarecimentos sobre sua participação na regulação iônica celular, sabe-se que o ROMK e o BK são responsáveis pela secreção de potássio pelo epitélio tubular renal. Os canais ROMK possuem propriedades biofísicas e mecanismos regulatórios similares aos canais de pequena condutância (SK) expressos em DCC de rins de rato e camundongo.

Os ROMK, ainda, por apresentarem maior probabilidade de abertura e maior densidade em membranas luminiais de CNT e DCC, acredita-se que sejam os principais mecanismos de extrusão de potássio celular na condição de ingestão normal deste cátion na dieta (Frindt E Palmer 1987, 1989, 2004). Entretanto, quando o túbulo renal, especialmente no segmento final do néfron é submetido a variações de taxa de fluxo e/ou de dieta (nutricional) de K^+ , tanto os ROMK (*SK-like*)

como os BK estão envolvidos na secreção deste cátion na luz tubular. A Figura 3 ilustra os canais envolvidos no transporte de potássio nas células tubulares envolvidas com a secreção deste íon e seus principais mecanismos de regulação.

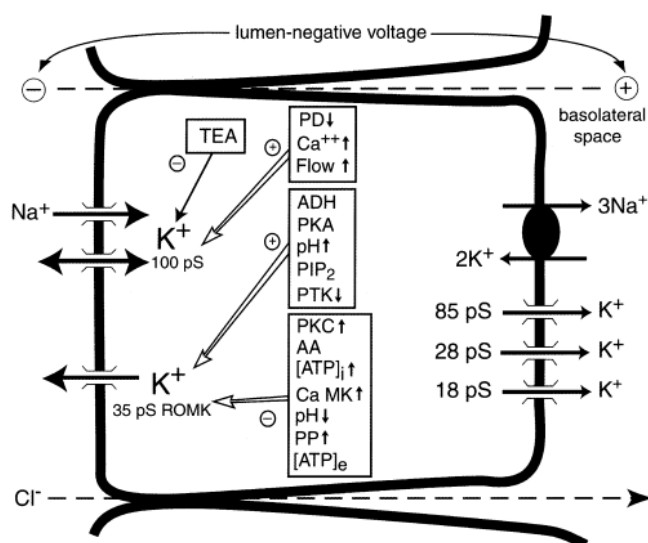


FIGURA 3 - Esquema representativo dos mecanismos de transporte de K⁺ envolvidos na atividade dos canais ROMK e BK, pelas células tubulares do CCD- Adaptado de Giebisch e Wang, 2000.

Conforme observado, os canais de pequena condutância (SK) para K⁺ são ativados pela fosforilação mediada pelo AMPc, pela vasopressina (ADH) (Cassola et al., 1993), pela alcalinização celular (Wang et al. 1990) e por fosfoinosítideo PIP₂ (Zeng et al., 2003). Por outro lado a atividade desses canais é reduzida na presença de PKC, ácido araquidônico, aumento de ATP celular (Wang et al., 1997), calmodulina quinase dependente de Cálcio (Kubokawa et al., 1995a), acidificação celular, estimulação de fosfatases protéicas (Kubokawa et al., 1995b) e por fosforilação de uma proteína quinase-tirosina (PTK) (Wang et al., 2000, Wei et al., 2000). Outro fator regulador descrito envolve a

presença de ATP extracelular, efeito que envolve a participação de um receptor purinérgico (Lu et al., 2000).

Recentemente, foi descrita uma proteína quinase denominada WNK, devido a ausência de lisina no subdomínio II (With no K kinases) que é expressa em DCC e modula os canais ROMK. Foram identificadas 4 WNKs em mamíferos, das quais WNK1, 3 e 4 inibem a atividade dos canais tipo ROMK (Gamba 2004; Wang e Giebisch 2009).

Já, os canais de grande condutância (BK), são dependentes de cálcio intracelular, são sensíveis ao pH celular e a presença de ATP, são modulados pela variação de fluxo tubular (ativação mecânica), variações da diferença de potencial transepitelial, e por apresentarem baixa probabilidade de abertura, inicialmente, não se postulava sua participação na secreção distal de potássio. Estes são inibidos por Tetraetilamonio (TEA) e Iberiotoxina (Bayley et al., 2006; Wang e Giebisch, 2009).

A atividade destes canais também é modulada em resposta as alterações de ingesta de potássio. A restrição de K⁺ reduz enquanto a sobrecarga aumenta a atividade destes canais catiônicos (Wang et al., 1990, 2000, Palmer 1999, Palmer e Frindt 1999). Os efeitos sobre o balanço de potássio resultam praticamente do número de canais presentes na membrana celular uma vez que a probabilidade de abertura é próxima de 95%. É improvável que a aldosterona module o transporte de K⁺ submetido a uma modificação rápida que se segue a uma dieta alta ou baixa deste cátion, pois a infusão de aldosterona não aumenta a atividade de canais para potássio de baixa condutância embora aumente a atividade dos canais para sódio (Giebisch e Wang, 2000).

1.2 Importância do Sistema Renina Angiotensina no organismo

As investigações sobre o Sistema Renina Angiotensina (SRA) iniciaram-se por volta de 1898 com os estudos realizados por Tigerstedt e Bergman, demonstrando um efeito pressórico decorrente da utilização de extratos de rim em coelhos e baseado em sua origem denominou esta substância vasoativa de renina (Basso et al., 2001) A partir de então uma série de descobertas relacionadas com este sistema tem colaborado para o entendimento e avanços na medicina do sistema cardiovascular bem como o desenvolvimento de drogas que interferem na atividade desse sistema e utilizadas corriqueiramente na terapia anti-hipertensiva atual.

O SRA é composto de complexos mecanismos endócrinos e cascatas hormonais que afetam o volume de líquido extracelular, a resistência periférica total e o débito cardíaco através de múltiplas vias bioquímicas. Os componentes do sistema incluem renina, angiotensinogênio, ECA, quimase, aldosterona, angiotensina II, e os vários receptores, enzimas e outras proteínas reguladoras para a sua adequada ação nos diversos tecidos alvos do organismo. A Figura 4 apresenta um panorama esquemático deste sistema.

A formação dos peptídeos efetores do SRA acontece inicialmente pela ação da protease Renina formada nas células justaglomerulares e liberada na circulação sanguínea, agindo sobre o angiotensinogênio hepático gerando a Angiotensina I (Ang I), que por sua vez é clivada pela Enzima de Conversão de Angiotensina (ECA), formando a Angiotensina II (Ang II), principal peptídeo efetor deste sistema (Figura 1).

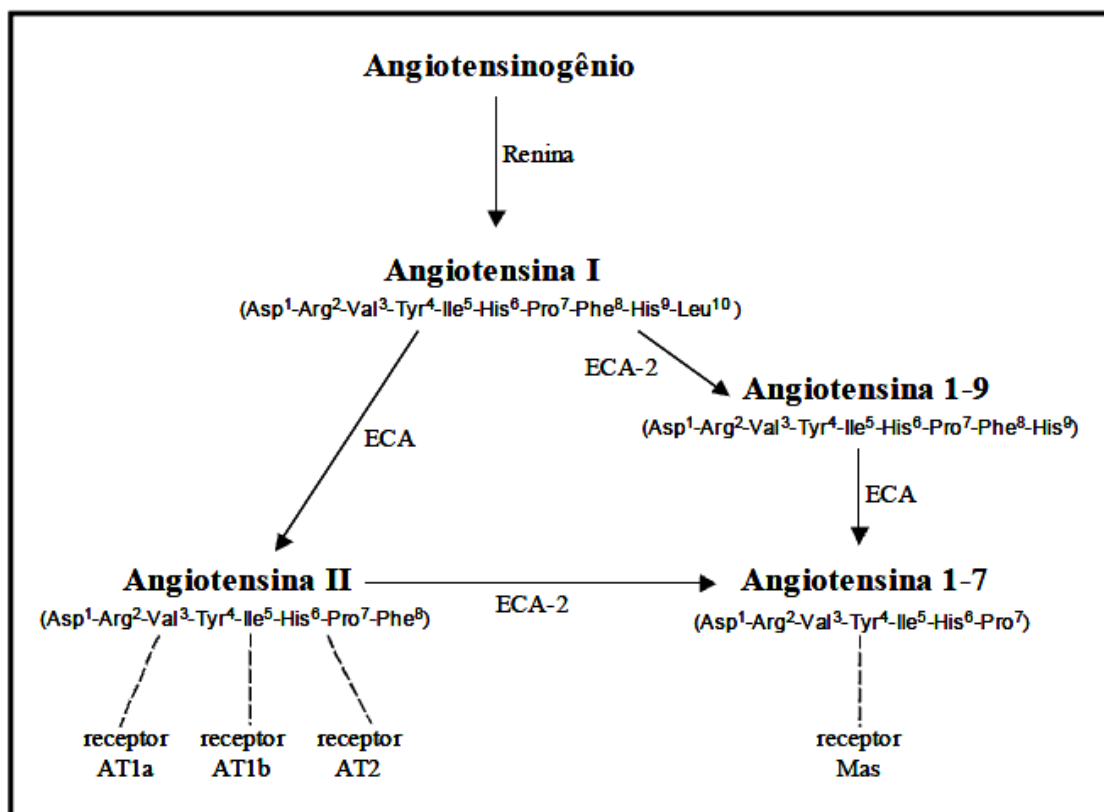


FIGURA 4 - Esquema global da gênese de Angiotensina no organismo.

A ECA constitui-se numa metaloproteínase expressa no plasma e em vários tecidos como os vasos sanguíneos, pulmão e rim. No leito vascular esta ancorada às células endoteliais por domínio transmembrânico carboxiterminal onde além de atuar sobre a Angiotensina I para originar Angiotensina II, também inativa os peptídeos do Sistema Cinina-Calicreína (SCC) (Turner et al., 2002).

A Angiotensina II interage com pelo menos dois tipos de receptores acoplados a proteína G, classificados como AT1 e AT2. A maioria dos efeitos biológicos conhecidos pela Ang II, incluindo vasoconstrição, estimulação da secreção de aldosterona, retenção de sal e água e crescimento celular são mediados pelo receptor AT1, que é expresso na maioria das células de mamíferos incluindo as dos vasos sanguíneos, coração, adrenal, rins e pulmões (Schiffirin et al., 2002;

Silverstein et al., 2004). O receptor AT2 parece ter efeitos opostos aos da ativação do AT1, como por exemplo, vasodilatação, inibição do crescimento celular, da diferenciação celular e de apoptose (Wagenaar et al., 2002; Schiffrin et al., 2002). Entretanto, apesar da expressão do receptor AT2 em tecidos embrionários ser bastante pronunciada, em tecidos adultos é reduzida quando comparada com a expressão do receptor AT1. Algumas condições disfuncionais como a hipertensão arterial (essencial) envolve de alguma forma o SRA (e a expressão de receptores AT1), e, em contrapartida outras alterações como a doença coronária isquêmica, cardiomiopatia e fibrilação atrial parecem estar relacionadas com o aumento da expressão do receptor AT2, que junto com o antagonismo do receptor AT1, podem apresentar efeitos terapêuticos benéficos sobre tais patologias (Ferrario, 2006).

Outros estudos mostraram ainda a presença adicional de outros peptídeos além do octapeptídeo originário do SRA, como os fragmentos da Angiotensina (1-7) (Ang 1-7), Angiotensina (3-8) (Ang IV) (Ardailou 1999; Hamilton et al., 2001). Dentre estes o mais estudado é a Ang 1-7 que pode ser formado pela ação das Prolil-endopeptidases Neutras (NEP) que clivam a Ang I liberando a Ang 1-7 ou então por ação da Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA 2) que cliva a Ang II e libera a Ang 1-7, cuja ações biológicas como vasodilatação, natriurese, diurese e efeito antitrófico acontecem pela interação com o receptor acoplado a proteína G denominado *mas*. As ações da Ang 1-7 sobre o receptor *mas* envolvem a geração de NO e prostaciclina e por isso sugere-se que sua formação possa atuar como efeito de *feedback* negativo sobre as ações da Ang II (Ferrario, 2006; Santos e Ferrario, 2006). Já, a Ang IV aparentemente relaciona-se com o aumento do fluxo sanguíneo cortical e o aumento da excreção de Na⁺ na urina, sem efeitos na pressão arterial média, no ritmo de filtração glomerular e no volume de urina produzido, sugerindo um efeito oposto promovido à via clássica da Ang II através de receptores AT1. Aliás, foram descritos outros receptores

específicos para este fragmento denominado AT4, altamente expresso em tecido nervoso, o qual poderia modular o processo de memória e fluxo sanguíneo do encéfalo (Ardaillou 1999; Hamilton et al., 2001; Wright et al., 2001).

Globalmente, a Angiotensina II atua no coração, vasos e rins de modo a aumentar a pressão arterial dentro de minutos a horas. A Angiotensina II também estimula a secreção de aldosterona e crescimento de alguns tipos de células no coração e vasos. A atividade Simpática mediada por Angiotensina II causa vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes no rim e aumento da liberação de adrenalina pela medula adrenal, fator que contribuem para a elevação da pressão arterial. A Angiotensina II participa da regulação do volume intravascular, em parte pelo estímulo da síntese e liberação de aldosterona pelo córtex adrenal e aumento da reabsorção tubular proximal e principalmente distal de sódio. Outros efeitos incluem a estimulação da sede, diminuição da secreção de renina, aumento da secreção do hormônio antidiurético, e da atividade mitogênica de células musculares vasculares e cardíacas.

Do ponto de vista fisiopatológico, a Angiotensina II provoca e facilita a lesão de órgãos-alvo por meio de dois mecanismos hemodinâmicos e não-hemodinâmicos. O ciclo vicioso da produção de Angiotensina II leva ao estresse oxidativo e ativação de citocinas, de moléculas de adesão e de fatores de crescimento, convergindo para uma resposta inflamatória tecidual. A Angiotensina II, via receptor AT1, leva a processos característicos da resposta inflamatória tais como: alteração da permeabilidade vascular, extravasamento leucocitário e reparo tecidual (Tracey, 2002) e é reconhecida como importante mediador inflamatório em vários tecidos incluindo os leitos vasculares (Suzuki et al., 2003). Como parte do processo inflamatório alguns vasos passam por um remodelamento por fibrose e crescimento celular. A Angiotensina II influencia o crescimento celular por estimular hiperplasia, hipertrofia e apoptose (Touyz et al., 2003; Kelli et al., 2004) e também a fibrose

vascular por induzir o acúmulo de proteínas de matriz extracelular particularmente colágeno e fibronectina na camada média. Além disso, a Ang II estimula a sinalização pró-fibrótica e aumenta a síntese protéica contribuindo para o remodelamento vascular (Ruperez et al., 2003).

1.3 Papel da Angiotensina II no transporte de Potássio pelo epitélio renal

No território renal, o SRA participa intensamente no transporte de água e sal pelas células epiteliais tubulares (Wei et al., 2007) e da microcirculação renal (Helou, 1998). Estudos de microperfusão de túbulos proximais no rato mostraram que a administração de Angiotensina em doses picomolares estimulou a reabsorção de Na⁺, particularmente pela ativação da permuta Na⁺/H⁺, enquanto a doses mais elevadas observaram-se efeitos opostos sugerindo um efeito bifásico nesta atividade (Nascimento-Gomes e Mello-Aires, 1992). Tais efeitos também foram corroborados por outros achados, como o aumento de excreção urinária de Na⁺ com a utilização de bloqueadores de receptores da ANGII em rim de rato e cão (Fenoy et al., 1991; Bovee et al., 1991), a inibição da reabsorção de Cl⁻, bicarbonato e H₂O em segmento S1 do túbulo convoluto proximal, utilizando-se microperfusão com antagonista de receptor de AT1 (Losartan) em ratos (Xie et al., 1990).

Estes autores, neste estudo ainda, mostraram que o Losartan foi mais potente do que Captopril (inibidor da ECA) na inibição do transporte de NaCl. O bloqueio do SRA com inibidores da ECA geralmente causa um aumento do K⁺ plasmático, devido ao decréscimo dos níveis plasmáticos de aldosterona. Já a ação do Losartan, em alguns

modelos experimentais, promoveu o aumento da excreção de K⁺ (Bovee et al., 1991; Xie et al., 1991).

Os primeiros trabalhos que relataram a presença de receptores para Angiotensina II em membrana luminal de célula tubular proximal datam da década de 80 (Harris e Navar, 1985; Douglas, 1987). Desde então vários pesquisadores vêm caracterizando e estudando a possível ação luminal deste hormônio. Paxton et al. (1993) identificaram, através da técnica de imunohistoquímica, receptores de ANGII do tipo 1(AT₁), em epitélio de alça ascendente espessa, e em *brush border* de túbulo proximal, em rim de rato. Já Harrison-Bernard et al. (1997), obtiveram novas evidências através do uso de anticorpos monoclonais, mostrando uma grande distribuição renal destes receptores, incluindo membrana basolateral e apical de células do túbulo proximal, ducto coletor cortical e túbulo distal convoluto. Meister et al. (1993), também caracterizaram o mRNA do receptor AT₁ em células da medula externa, túbulo proximal, TAL, glomérulo renal, vasculatura arterial e vasa recta.

Wei et al. (2007) em estudos de imunofluorescência demonstraram uma abundante expressão do receptor AT₁ em membranas apicais de células do duto coletor cortical. Esta presença sugere um efeito parácrino ou autócrino da Angiotensina presente na luz tubular, assim como observado anteriormente em relação à Vasopressina (Amorim e Malnic, 2000).

Também foi descrita a presença de angiotensinogênio na luz tubular de túbulo proximal, assim como a presença de mRNA de angiotensinogênio neste mesmo segmento tubular (Navar et al., 1999). Seikaly et al. (1990) relataram que a concentração de Angiotensina II no fluido tubular atinge valores da ordem de 10⁻⁹M (30-40pmol/ml), aproximadamente 1000 vezes acima da plasmática, fato observado também por outros autores (Braam et al., 1993; Thekkumkara et al., 1998).

Em conjunto os dados descritos *ut supra* permitiram sustentar a idéia, durante a década de 90, de que o angiotensinogênio pode ser secretado no túbulo proximal (uma vez que devido ao alto peso molecular do angiotensinogênio dificilmente seria filtrado pela membrana filtrante do glomérulo) e que a Angiotensina I poderia ser formada dentro do túbulo se ocorrer a presença de renina ou enzimas semelhantes à renina no fluido tubular, bem como de síntese de Ang II caso exista enzima conversora de Angiotensina.

Assim, Moe et al. (1993) e Heinrich et al. (1996) mostraram que a renina poderia ser secretada no túbulo proximal. Em adição, Leyssac (1986) reportou baixa, porém mensurável, concentração de renina no túbulo proximal, indicando que a renina pode ser responsável pela geração de ANGI na luz tubular. Foi relatada também a presença da enzima conversora em abundância em *brush border* de célula epitelial proximal (Schulz et al., 1988; Ikemoto et al., 1987).

Suga et al. (2002), avaliando animais hipocalêmicos, relataram aumento da expressão cortical da ECA sem supressão da geração cortical de Angiotensina enquanto se observa redução da atividade do SRA nos tecidos extra-renais. Este achado sugere um papel biológico distinto da Angiotensina nesta região e relaciona também os níveis de potássio no meio interno, envolvidos neste processo. Ainda, Navar e Nishiyama (2004) mostraram que a Angiotensina II poderia ser produzida em epitélio renal de túbulo proximal, sendo que seu papel biológico estaria relacionado a transporte iônico nos demais segmentos tubulares.

Wang e Giebisch (1996) estudaram o papel da Angiotensina II na regulação da taxa de reabsorção de bicarbonato em túbulo distal inicial e final, mostrando que ANGII em fluido tubular distal causou um efeito estimulatório na reabsorção de volume e de bicarbonato, sendo este efeito bloqueado por um antagonista não específico de Angiotensina (saralasin). O aumento da reabsorção de

volume observado implicaria no aumento da taxa de reabsorção eletrogênica de Na^+ , aumento da atividade da bomba Na^+/K^+ , despolarização da membrana luminal, levando a um aumento da diferença de potencial transepitelial, e todos estes fatores resultariam num possível aumento na secreção distal de K^+ .

Por outro lado, estudos recentes mostraram que a Angiotensina inibe a atividade dos canais ROMK em DCC isolados provavelmente através do acoplamento do receptor AT1 em membranas luminiais de células tubulares, envolvendo a ativação de diversas vias de sinalização celular (Figura 5). Este efeito parece estar acoplado à restrição de potássio pela dieta, o qual reduz o número de canais inseridos na ML através da via dependente de PKC (proteína quinase C) e PTK (proteína quinase tirosina) (Wang e Giebisch 2000; Sterling et al., 2004; Zeng et al., 2003, Wei et al., 2001).

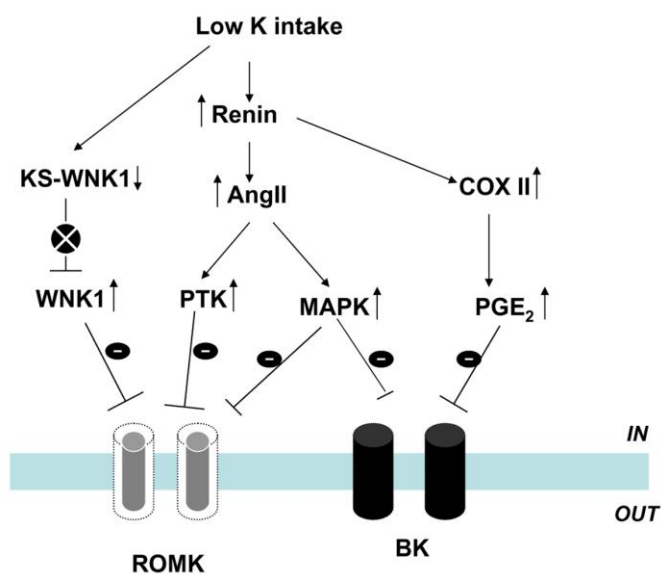


FIGURA 5 - Esquema mostrando diferentes vias de sinalização celular que modulam a secreção de K^+ pelos canais ROMK e BK no DCC. Adaptado de Wang E Giebisch, 2009.

A depleção de K^+ aumenta a expressão da PTK e de outras proteínas ligadas a esta quinase como a cSrc, a qual fosforila o canal ROMK, aumentando sua endocitose e reduzindo a secreção de potássio (Wang et al., 2000; Wei et al., 2001). Por outro lado a restrição de K^+ aumenta a expressão da ϵ PKC, a qual inibe a atividade do canal de potássio (tipo ROMK), provavelmente por internalizar a proteína ou por reduzir o conteúdo de PIP2 (fosfolípido de membrana requerido para manter o estado aberto do canal).

Desta forma, devido à importância deste agente biologicamente ativo e de sua presença na luz tubular perfundimos o túbulo distal final com Angiotensina, objetivando avaliar o fluxo secretório de potássio, e contribuir para o conhecimento das vias de sinalização celular envolvidos no transporte deste cátion pelo segmento final de néfron de rim de ratos.

2 OBJETIVOS

Como revisto na introdução a este trabalho, a secreção de potássio no néfron distal depende da natureza do fluido que o perfunde. Quando esta perfusão é realizada com fluido tubular nativo, é observado maior ritmo de secreção que durante a perfusão com soluções exclusivamente salinas, artificiais. O presente trabalho foi realizado para investigar o papel da Angiotensina II sobre o fluxo secretório de potássio (K^+), e investigar os possíveis mecanismos de sinalização celular envolvidos nesse processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, protocolo 13/2009-PA/CEP, estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos albinos Wistar machos, pesando entre 180 a 340g, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas, USP. Os animais receberam dieta sólida padrão (NUVILABcr1, PR) e água *ad libitum* até o momento do experimento. Durante a fase experimental, os animais foram anestesiados com Inactin (Byk-Gulden, Konstanz, FRG), na concentração de 100mg/Kg de peso corpóreo. Este anestésico apresenta as seguintes vantagens: rápida indução anestésica permite uma respiração regular e ausência de alteração da pressão sanguínea. Caracteriza-se ainda por manter um longo período anestésico, dispensando doses complementares. Sua utilização tem sido constante em nosso laboratório e seus benefícios têm suplantado seguramente suas restrições apontadas na literatura, como as evidências da depressão na reabsorção tubular proximal em ratos anestesiados pelo Inactin, comparando-os com ratos anestesiados por barbiturato (Vestri, 1992).

Os animais controles, a seguir, receberam infusão salina com 3% de manitol e preparados para microperfusão *in vivo* como descrito previamente por Gil E Malnic (1989). Resumidamente os experimentos consistiam das seguintes etapas:

3.1 Fase cirúrgica

- a) os animais foram levados a uma mesa cirúrgica com temperatura mantida a 37°C, por meio de uma placa aquecida. Posteriormente, foi feita a traqueostomia e canulação da veia jugular para infusão com solução de NaCl 0.9% acrescido de 3% de manitol, mediante uma bomba de infusão contínua (Havard Apparatus, MA, USA), numa velocidade variando de 0.05 a 0.1 ml/min. Em alguns grupos experimentais, foi feita a canulação da artéria carótida, a fim de coletar amostras de sangue para a medida de pH, Pco₂, através de um pHmetro (Radiometer BMS3/MK2), bem como determinar as concentrações de Na⁺ e K⁺ por fotometria de chama (B262, Micronal, Brasil);
- b) os animais foram colocados em decúbito lateral direito, sendo o rim esquerdo exposto por incisão lateral. Este foi liberado da gordura perirrenal, através da divulsão deste tecido por utilização de pequena tesoura reta cirúrgica com ponta arredondada. O rim foi fixado em um suporte acrílico e imobilizado com agar 5% em solução fisiológica. Uma pequena área na superfície renal, centro-lateralmente, foi mantida livre de ágar, a fim de permitir o acesso dos microeletrodos e micropipetas instalados nos micromanipuladores;
- c) a visualização tubular foi realizada através de microscópio estereoscópio (Leitz, Alemanha), com aumento de 40 à 100x, sendo o rim transiluminado por um bastão de quartzo, acoplado a uma lâmpada de tungstênio. O rim foi banhado durante todo o experimento com solução Ringer a 37°C. A cauda do

rato foi seccionada em sua extremidade e mergulhada em *beake*” contendo solução salina e fazia contato elétrico por ponte de Agar/KCl com uma hemicélula de Ag/AgCl. Desta forma, o compartimento extracelular do animal foi utilizado como nível de referência das medidas elétricas realizadas.

3.2 Preparo das micropipetas duplas e microeletrodos

Foram confeccionadas micropipetas duplas, utilizando-se capilares duplos do tipo Theta (R & D. optical systems, Inc., Spencerville, MD, USA). Cada capilar foi estirado verticalmente (estirador Narishige, modelo P2, Japão) e bixelado por um microesmeril (Fabricado na oficina do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, USP) para obtenção de um bixel com diâmetro de ponta entre 12 e 15 μm . A micropipeta dupla continha em um dos ramos solução perfusora controle contendo 100 mM de NaCl, 10 mM HEPES, 1mM CaCl_2 , 1 m Na_2SO_4 , 1mM NH_4Cl , 0.5mM KCl, pH 6.5, e acrescentava-se rafinose para manter a osmolalidade em 300mOsm. Adicionava-se também um corante verde FDC 0.05% para facilitar a identificação do segmento renal perfundido. O outro ramo foi preenchido com óleo de rícino corado com negro sudan (Sudan-black) com a finalidade de se bloquear a coluna de fluido perfusor dentro do lumen (*stopped flow microperfusion*).

Para os microeletrodos duplos, utilizamos capilares duplos do tipo Hilgenberg (Malsfeld, Alemanha), assimétricos (ramo maior com 1.6mm de diâmetro externo, ramo menor com 0.8mm). Inicialmente os capilares foram estirados verticalmente (Narishige, modelo P2, Japão), de forma a obter-se diâmetro de ponta de 1 μm . Devido à natureza apolar

da resina de troca iônica, o ramo maior, onde é adicionada esta resina, sofria um processo de silanização (hidrofobização).

Este processo consiste na reação dos grupos hidroxila do vidro com o átomo de silício do composto orgânico Hexamethyldisilazano (Fluka Chemika, Buchs, SW), através da exposição do capilar ao vapor deste composto, por um período médio de 30 min. A silanização foi realizada através da adição de 0.2ml de disilazano em uma câmara de vidro, com 15cm de altura por 5cm de diâmetro, com tampa de rosca, e com uma vedação de borracha adaptada para permitir a fixação dos microeletrodos e impedir o vazamento do composto. Esta câmara foi também mantida em capela com exaustão, durante este procedimento.

O microeletrodo, assim preparado, foi posteriormente colocado num dessecador, evitando contato com a umidade do ar. A adição da resina de troca iônica, específica para o K⁺ (Fluka Chemika, SW) na ponta do microeletrodo foi feita através de um capilar de vidro, estirado manualmente em maçarico e introduzido no maior ramo, previamente silanizado, 24 horas antes do início da fase cirúrgica. Pelo mesmo processo, solução eletrolítica de fosfato ácido de potássio (40mM) e NaCl (15mM), com pH 7, foi colocada no mesmo ramo, acima da resina. No ramo menor (referência), solução composta de 0.26M NaCl e 0.76M acetato de sódio, corada com 0.1% de corante FDC, foi introduzida.

Para calibração dos microeletrodos, realizada antes e depois de cada punção, foram utilizadas 3 soluções de composições similares à solução utilizada para microperfusão tubular controle (NaCl 100mM, CaCl₂ 1.2mM, MgSO₄ 1mM, NH₄Cl 1mM, HEPES 10mM), porém contendo diferentes concentrações de K⁺, a saber: 3, 10 e 30mM. O microeletrodo era então calibrado, observando-se a variação de voltagem em relação à variação de concentração de K⁺. O valor médio da DP por década de variação de [K⁺] foi de 43 ± 2.5 mV, semelhante aos valores referidos por Wright e McDougal (1972).

Foram confeccionadas micropipetas simples com capilares do tipo Kimax (A. H. Thomas, Philadelphia, USA), de paredes finas, e diâmetro externo de 0.8mm. Os capilares foram estirados horizontalmente (estirador de Livingstone) ou verticalmente (estirador Narishige). A seguir, sua ponta foi quebrada manualmente, através de pinça de relojoeiro, sob microscopia óptica (Zeiss, Alemanha), de maneira a obter-se um diâmetro final de 5 a 14 μ m. A pipeta foi então afilada com microesmeril, para permitir a formação de bixel. Esta micropipeta simples foi preenchida com uma solução, contendo a mesma composição eletrolítica da solução perfusora controle, além da substância a ser estudada (ANGII, Losartan, PD123319, entre outros).

As conexões entre os ramos das micropipetas dupla e simples, e as seringas injetoras foram feitas com tubos de polietileno. A conexão entre os ramos da micropipeta e os tubos de polietileno foi mantida através de agulhas hipodérmicas, vedadas com lacre. A seguir, as micropipetas duplas e o microeletrodo foram colocados em micromanipuladores mecânicos (Leitz, Wetzlar, Alemanha), enquanto a pipeta simples foi adaptada num micromanipulador (Fischer, Alemanha) através de um porta-micropipetas feito na oficina do Departamento, ligado a outra seringa.

3.3 Metodologia da microperfusão

A determinação da secreção tubular de potássio foi feita através da técnica de microperfusão estacionária, como previamente descrito por Malnic e Mello-Aires (1971) e Gil & Malnic (1989). A utilização desta ferramenta metodológica foi inicialmente utilizada para avaliação da secreção de H⁺ e reabsorção de bicarbonato em túbulos renais, e para determinação de transporte de K⁺ em túbulo proximal. Este modelo

permite avaliações seqüenciais da atividade de K⁺ luminal durante perfusões controle e experimental no mesmo segmento tubular renal (Vestri et al., 1992).

Os túbulos distais foram localizados, inicialmente, por perfusão com soluções perfusoras coradas a partir de uma alça proximal média ou final com a micropipeta dupla. Posteriormente, impalava-se o segmento distal final com microeletrodo duplo, contendo num dos ramos resina de troca iônica sensível ao potássio (Fluka Chemika, SW), e no outro, menor, solução eletrolítica referência corada com verde FDC 0.1% (eletrodo de referência) (Figura 6).

A identificação e confirmação das alças distais finais foi feita por critérios anatômicos e elétricos. A partir de alça distal inicial ocorre um tempo de trânsito abaixo de 2 segundos de uma solução corada, de uma alça até a seguinte, e em geral o segmento distal não consta de mais de duas alças (Velasquez et al., 1987). Ainda, a diferença de potencial transepitelial de túbulos distais finais (segmento conector e coletor cortical) encontra-se acima de -20mV (lúmen negativo) (Gil e Malnic, 1989; Lopes e Malnic, 1989). A solução perfusora era isolada do fluido tubular com óleo de rícino corado com Sudan, injetado pelo outro ramo da micropipeta. Em alguns experimentos a perfusão dos túbulos renais foi feita do segmento distal inicial para o segmento distal final (perfusão distal-distal).

Finalmente, a micropipeta simples contendo o agente hormonal a ser estudado era inserida no mesmo néfro (proximal ou distal inicial). Cada túbulo foi perfundido primeiramente com solução controle, e a seguir, com solução experimental, permitindo, desta forma, comparação pareada entre a microperfusão controle e experimental.

Por esta técnica cerca de quatro a oito curvas, controle e experimental, foram obtidas, constituindo sua média, um par de valores para cada túbulo. A figura 5 ilustra a metodologia de microperfusão estacionária utilizada. O valor de "N" de nossas tabelas, corresponde ao

número de túbulos perfundidos, sendo aproximadamente de 1 a 3 túbulos para cada rato estudado.

3.4 Medidas de Potenciais elétricos e Análise das curvas de atividade de K⁺

No trabalho de Vestri e Malnic (1990) discute-se alguns aspectos relevantes quanto ao funcionamento do microeletrodo íon-seletivo.

Para estudar e caracterizar microeletrodos íon-seletivos assumiu-se um modelo com formalismo adequado para a análise do equilíbrio do sistema microeletrodo-solução desconhecida (fluido tubular). O mesmo formalismo pode ser usado para soluções de calibração. Para isto, utiliza-se os coeficientes de atividade de Debye-Hueckel, a resposta básica do eletrodo dada por Nicolsky e o potencial de junção líquida dado por Henderson.

Cada íon interferente j contribui para a soma dentro do fator logarítmico na equação de Nicolsky (Nicolsky, 1937; Edelman et al., 1978), que pode ser reduzida para:

$$E = E_o + RT/zF \ln(a_i + a_j)$$

e, no nosso caso:

$$E = E_o + Sp. \text{Log} (aK^+ + k.aNa^+)$$

Onde:

$E - E_o$ = diferença de potencial elétrico medido pelo microeletrodo.

E_o = potencial de referência.

k = fator de seletividade.

S_p = variação de voltagem por década de concentração de potássio (slope) em solução pura.

a_{K^+} - atividade de potássio,

a_{Na^+} - atividade de sódio.

A seletividade do microeletrodo para sódio é cerca de 10x menor que para o potássio, mas a concentração de sódio é em média 10x maior (100mM) que a de potássio. Por isto, os *slopes* obtidos na calibração são menores que o valor teórico de 61,5mV a 37°C.

As voltagens referidas acima e a diferença de potencial transepitelial foram lidas em um eletrômetro, de dois canais, diferencial, de alta impedância de entrada, modelo FD223 (WPI, New Haven, CT), cuja saída foi continuamente registrada por um polígrafo de quatro canais (Beckman, modelo R511A) e simultaneamente digitalizada em intervalos de 1 segundo por microcomputador Itautec (Infoway, Pentium 4) acoplado a um conversor analógico digital (Lynx Eng ADS 1000, São Paulo), através do qual os dados são adquiridos e processados. As atividades de potássio correspondem à diferença de potencial elétrico entre os canais de potássio e de referência.

Os dados foram analisados por um programa *Visual Basic* no *software* Excel (Microsoft). Foram obtidos a meia-vida ($t_{1/2}$) para retorno da atividade de K^+ ao nível estacionário, a atividade de potássio estacionária $[K^+]_s$ e a Diferença de potencial (DP) transepitelial. O fluxo de potássio (J_{K^+}) foi então calculado, em analogia a fluxos de H^+ medidos anteriormente por meio deste método, seguindo a seguinte equação (Gil e Malnic, 1989):

$$J_{K^+} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} (K_s - K_o) * \frac{r}{2}$$

Onde $t_{1/2}$ corresponde ao tempo decorrido para atingir a metade da diferença máxima de concentração de K^+ ;

K_s é a atividade de K^+ estacionário;

K_0 é a atividade de K^+ inicial (0.5mM)

r corresponde ao raio do túbulo

Após a aquisição e processamento dos dados, e a determinação dos fluxos secretórios de potássio, estes eram tabelados e a significância das diferenças estatísticas foi determinada através da aplicação do "teste t" pareado de *Student*, considerando $p < 0.05$ como nível de significância.

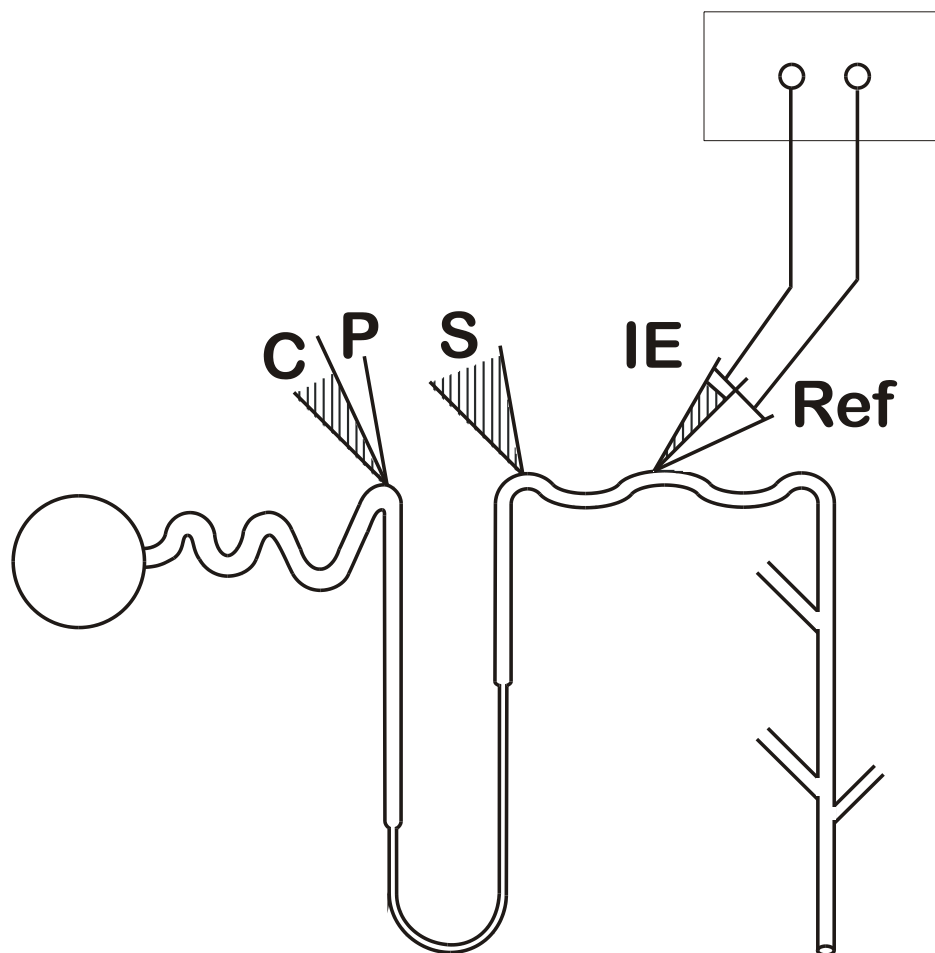


FIGURA 6 - Desenho esquemático do sistema experimental. A esquerda, micropipeta dupla com solução perfusora controle (P) e óleo de rícino corado (C). A direita, micropipeta dupla com resina de troca iônica (IE) e solução de referência (Ref). Uma terceira micropipeta simples (S) também foi utilizada no túbulo proximal ou distal final durante a microperfusão com solução experimental.

4 RESULTADOS

O protocolo experimental padrão envolve a microperfusão com uma solução contendo uma concentração baixa de potássio (0.5mM), seguido pela observação da variação da atividade deste cátion até um valor estacionário durante o bloqueio do fluxo de fluido na alça distal final. A figura 7 ilustra um registro obtido num dos experimentos mostrando acima, a variação da atividade de potássio, e abaixo, a variação da diferença de potencial durante a perfusão com Ringer controle.

Como descrito anteriormente, os dados obtidos por digitalização foram processados em uma planilha do Excel através de um macro dentro deste *software*. Este procedimento permite a construção de gráficos como ilustrado na figura 8a, mostrando o decaimento exponencial da diferença entre a concentração de potássio estacionário e a concentração no tempo t . Esta figura corresponde à perfusão com uma solução Ringer controle, enquanto que na figura 8b, mostra-se o mesmo procedimento, porém com solução contendo agente hormonal.

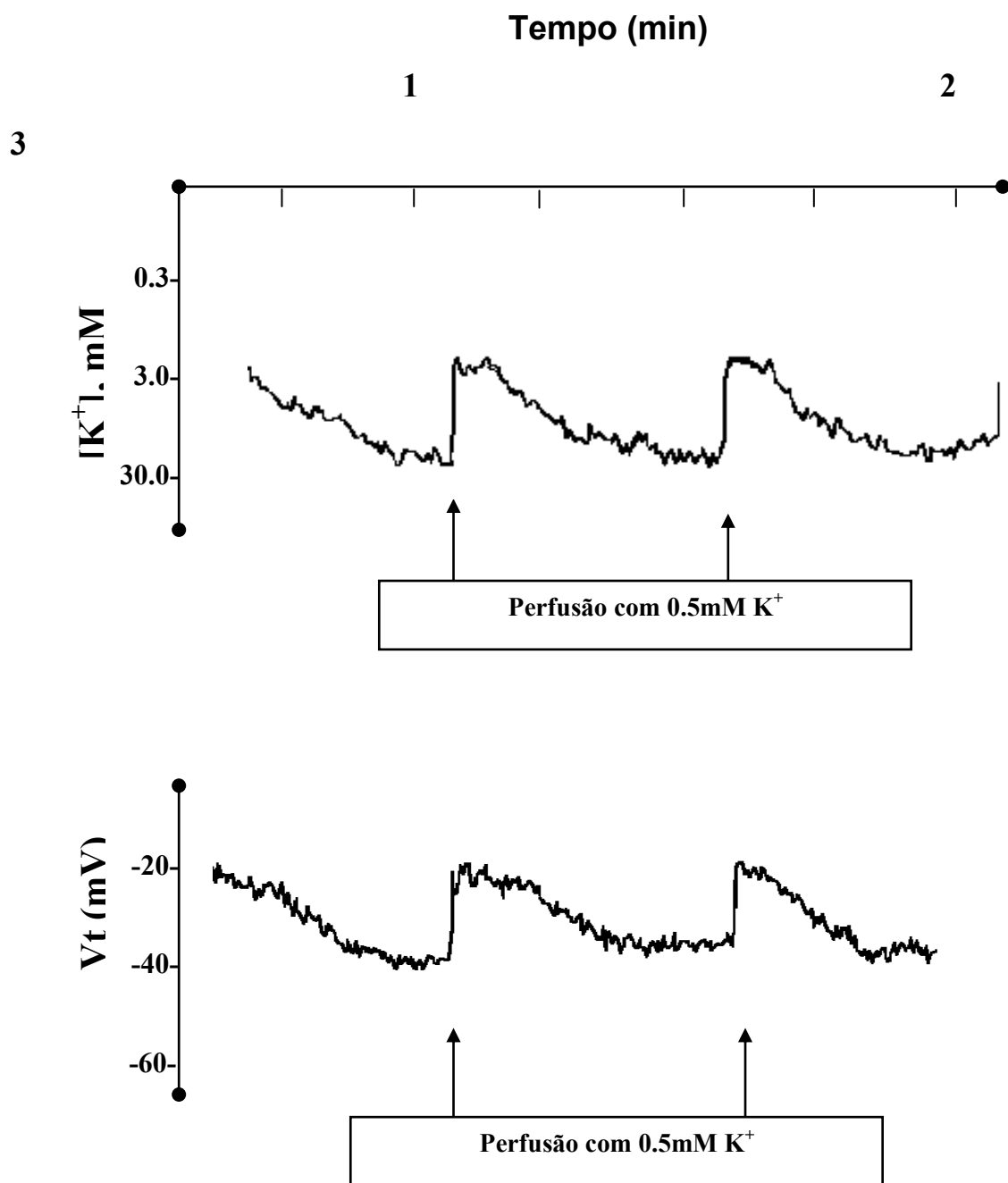


FIGURA 7 - Registro seqüencial de uma série de microperfusões realizados em túbulo distal, utilizando solução controle (C) contendo 0.5mM de potássio.

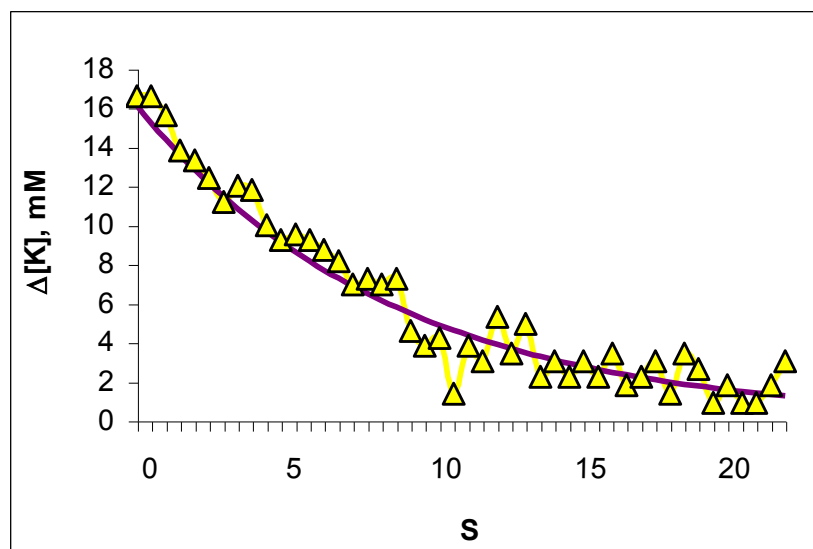


FIGURA 8^a - Gráfico mostrando a variação da concentração de K⁺ ($\Delta[K]$), em função do tempo (t), durante perfusão controle na alça distal final cortical.

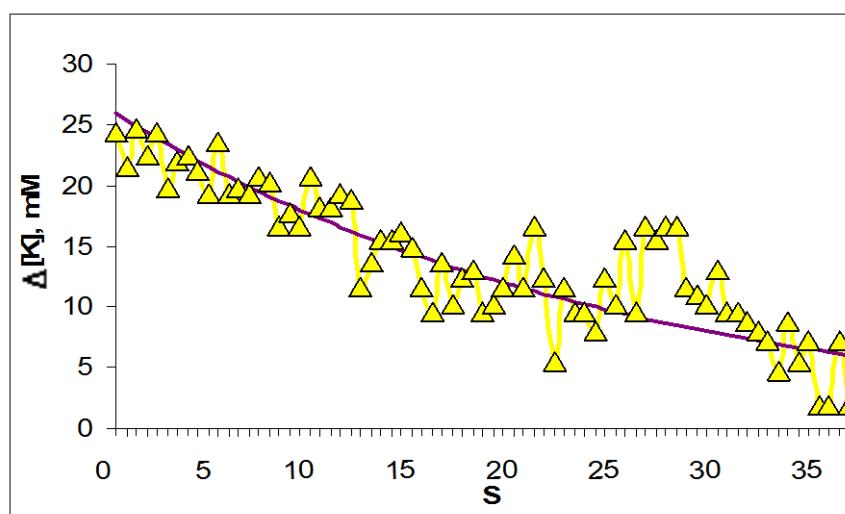


FIGURA 8b - Gráfico mostrando a variação da concentração de K⁺ ($\Delta[K]$), em função do tempo (t), durante perfusão experimental na alça distal final cortical.

A tabela 1 mostra alguns valores dos parâmetros ácido-base do sangue de grupos de animais utilizados, nos estudos de

microperfusão deste laboratório de pesquisa, indicando este modelo experimental não interferiu significativamente nos valores considerados fisiologicamente normais. Mostram-se também os valores médios de concentrações plasmáticas de potássio e sódio, que se encontraram na faixa fisiológica.

Tabela 1 - Parâmetros ácido-base sanguíneos, e concentrações de Na⁺ e K⁺ plasmáticos, obtidos durante os experimentos de microperfusão renal.

	pH (unidades)	P_{co2} (mmHg)	[Na⁺] mM/l	[K⁺] mM/l
Ratos Wistar (N=45)	7.35±.10	39.3±0.63	137±2.8	3.56±0.54

Os valores correspondem às médias ± erro-padrão, N corresponde ao número de ratos avaliados.

4.1 Efeito da Angiotensina II

A Tabela 2 e Figura 9 ilustram os dados referentes à microperfusão distal com o peptídeo ativo (Angiotensina II) e um gráfico ilustrando os efeitos deste agente no JK⁺ comparado a situação controle, respectivamente . Podemos observar que durante a perfusão de ANGII na luz tubular, ocorreu uma redução no fluxo secretório de potássio, entretanto quando submetido a concentrações mais elevadas, observamos reversão desta inibição, sugerindo um efeito bifásico deste hormônio já reportado em outros processos de regulação de transporte iônico em túbulo renal.

Tabela 2 - Valores de fluxo secretório de K^+ (J_{K^+}), nos grupos controle e experimental (Angiotensina), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais.

$J_{K^+}(\text{nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1})$	CONTROLE	EXPERIMENTAL
ANGIOTENSINA II 10^{-12}M	$0.82\pm 0.17(9)$	$0.58\pm 0.05^{***}$
ANGIOTENSINA II 10^{-11}M	$1.00\pm 0.17(27)$	$0.63\pm 0.08^{***}$
ANGIOTENSINA II 10^{-9}M	$0.90\pm 0.19(27)$	$0.70\pm 0.22^{**}$
ANGIOTENSINA II 10^{-6}M	$0.82\pm 0.04(11)$	0.75 ± 0.06

***($p < 0.001$), **($p < 0.002$) vs controle, médias \pm erro padrão.

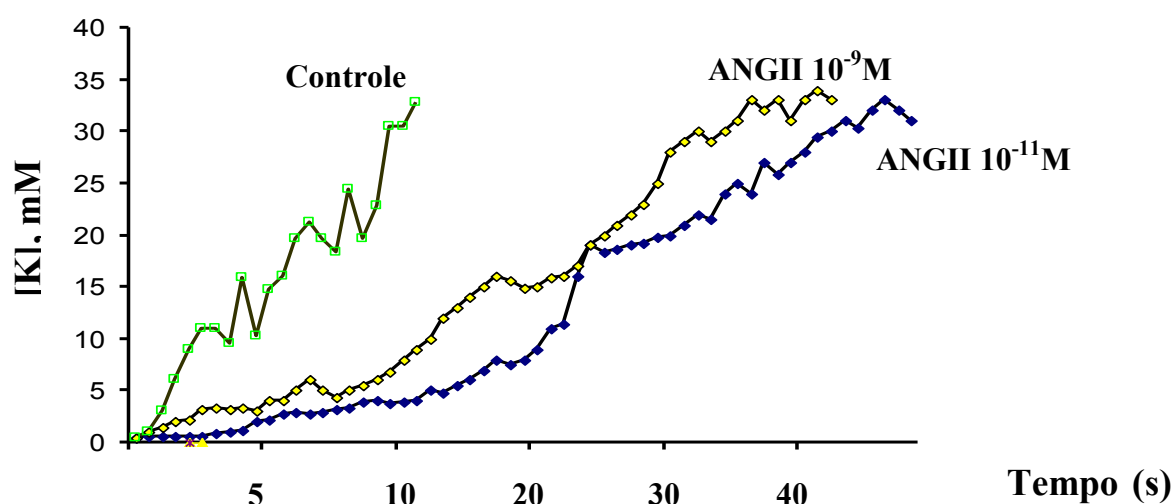


FIGURA 9 - Ilustração do efeito da Perfusão luminal de Angiotensina II sobre a concentração luminal de potássio, K^+ s, em função do tempo de aquisição (segundos). Amarelo e Azul continham Angiotensina II 10^{-9}M e 10^{-11}M , respectivamente; Verde, perfusão controle.

A Figura 10 também demonstra o efeito da Angiotensina II comparado à média dos valores obtidos da perfusão controle ($J_{K^+} = 0.82\pm 0.07 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Tendo em vista que grande parte dos efeitos fisiológicos da Angiotensina II no rim adulto são mediados principalmente pela ativação dos receptores AT1 (Smith et al., 1992), realizamos uma série de experimentos com um antagonista de receptores AT1, Losartan (10^{-6} M) e Candesartan (10^{-6} M), no intuito de se estudar a natureza do receptor responsável pelo efeito inibitório deste agente hormonal no transporte distal de potássio.

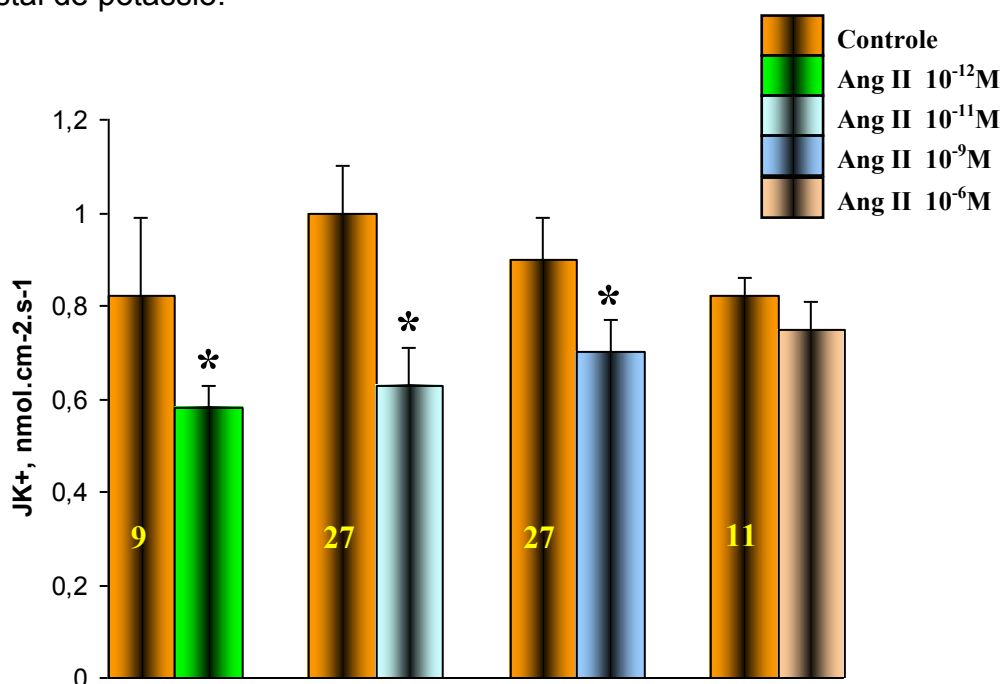


FIGURA 10 - Fluxo secretório de potássio obtido durante a perfusão luminal de diferentes concentrações de Angiotensina II. Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos; * $p < 0.05$ comparado ao controle.

Como pode ser notado na Tabela 3 e Figura 12, o emprego do Losartan e Candesartan (dois bloqueadores específicos de receptor AT1) não diferiram significativamente dos valores obtidos dos grupos controle, durante as perfusões sobre o fluxo resultante de potássio (Jk+). Entretanto, quando associado à Angiotensina, observou-se redução do efeito inibitório quando comparado nesta condição a perfusão pareada de

Angiotensina. Tais achados indicam que a Angiotensina participa da modulação do transporte de K⁺, luminalmente, mediante ao acoplamento aos receptores tipo AT₁.

Tabela 3 - Valores de fluxo secretório de K⁺ (J_{k+}), nos grupos controle e experimental (Antagonistas de receptores de Angiotensina), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais

J _{k+} (nmol.cm ⁻² .s ⁻¹)	CONTROLE	EXPERIMENTAL
LOSARTAN –AT ₁ 10 ⁻⁶ M	0.80±0.08(11)	0.67±0.09
CANDESARTAN – AT ₁ 10 ⁻⁶ M	0.83±0.03(12)	0.82±0.2

Médias±erro padrão.

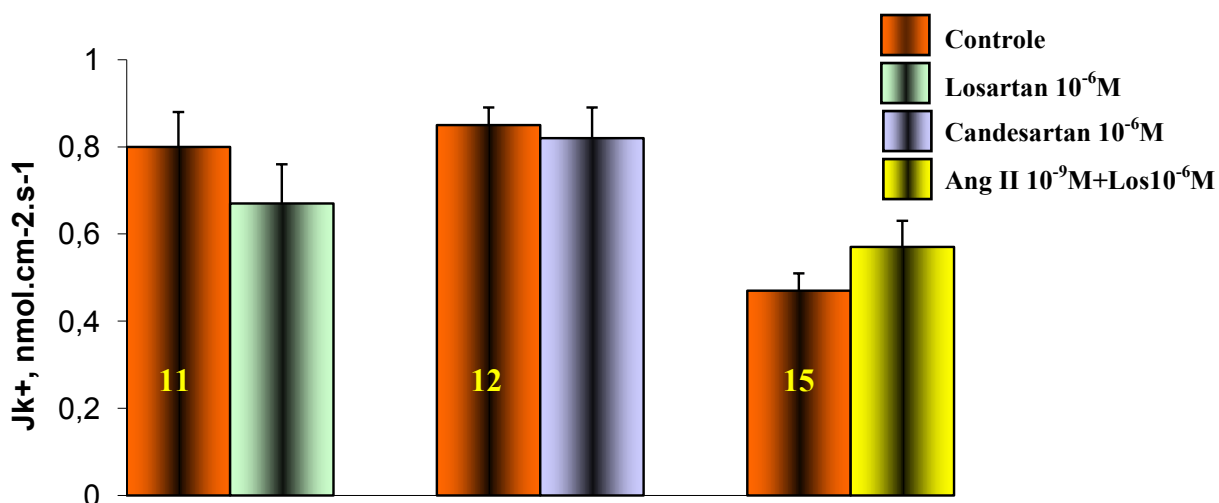


FIGURA 11- Efeito dos bloqueadores de receptor AT₁ (Losartan e Candesartan) sobre o fluxo secretório de potássio (JK⁺). Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos.

No intuito de se avaliar quais as possíveis vias de sinalização celular envolvidos na modulação do transporte de potássio no epitélio distal renal pela Angiotensina, realizamos, inicialmente, experimentos com agonistas e antagonistas da via AMPc e PKA, respectivamente. Conforme observado na Figura 12 e tabela 4, o 8bromo-AMPc inibiu o fluxo de K⁺ quando comparado aos valores do grupo controle enquanto que a utilização de H89, reverteu a inibição promovida pela Angiotensina, sugerindo que parte dos efeitos promovidos pela Angiotensina II deveu-se a esta via de transdução de sinal celular.

Tabela 4 - Valores de fluxo secretório de K⁺ (J_{k+}), nos grupos controle e experimental (Agonista e Antagonista da via AMPc/PKA), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais

J _{k+} (nmol.cm ⁻² .s ⁻¹)	CONTROLE	EXPERIMENTAL
8-bromo AMPc 10⁻⁵M	0.74±0.0035(13)	0.67±0.053*
ANG. 10⁻¹¹M + H89 10⁻⁴M	0.71±0.05(12)	0.96±0.08**

*(p<0.05),**(p<0.001) vs controle, médias±erro padrão.

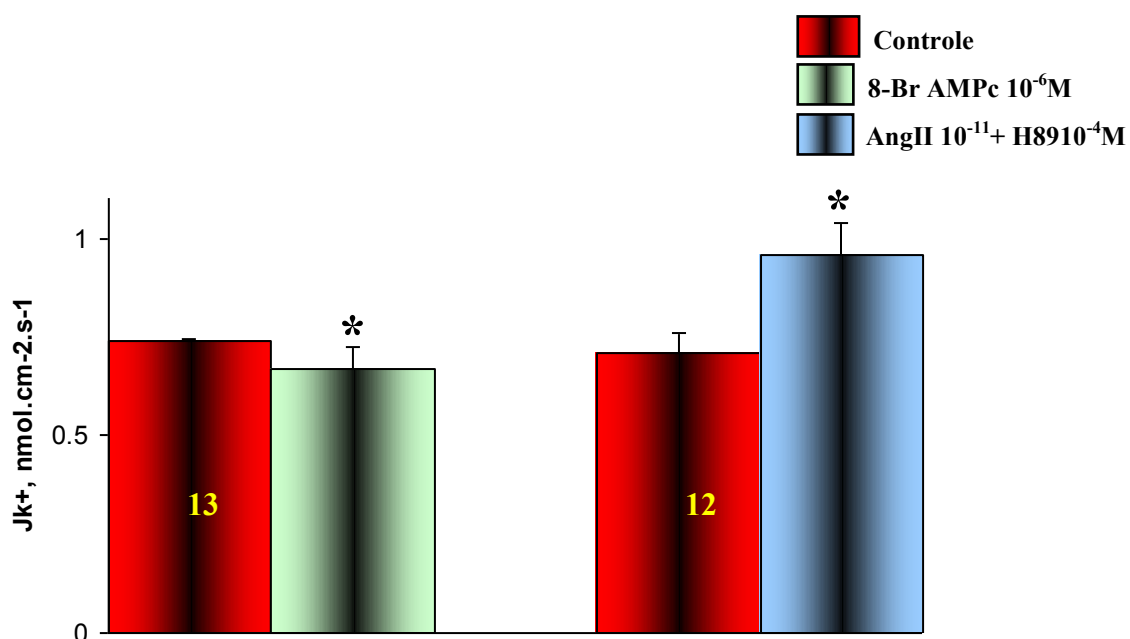


FIGURA 12- Efeito da perfusão luminal com 8-Br-AMPC e do H89 sobre a secreção de K⁺ (JK⁺). Em amarelo (N), número de túbulos perfundidos, *p<0.001.

Devido à possibilidade da ativação da via dos eicosanóides através do acoplamento da Angiotensina II em receptores presentes na membrana luminal, estudamos o efeito dos metabólitos do ácido araquidônico sobre o fluxo de JK⁺, bem como sua inativação na presença de Indometacina, bloqueador específico da ciclo-oxigenase (Cox). Desta forma, conforme observado na tabela 5 e Figura 13, a presença de Prostaglandina (PGE₂) no perfusato, nas concentrações de 10⁻⁹ e 10⁻⁶M, inibiram significativamente o transporte de potássio pelo epitélio renal, enquanto que na presença de Angiotensina a Indometacina reverteu à inibição promovida pelo agente peptídico, estes achados indicam que parte dos efeitos ligados a Angiotensina II envolvem os metabólitos do ácido araquidônico.

Tabela 5 - Valores de fluxo secretório de K^+ (J_{K^+}), nos grupos controle e experimental (PGE2), obtidos durante a microperfusão de túbulos distais.

$J_{K^+}(\text{nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1})$	CONTROLE	EXPERIMENTAL
Prostaglandina PGE2 10^{-9}M	$0.93\pm 0.08(12)$	$0.55\pm 0.05^{**}$
Prostaglandina PGE2 10^{-6}M	$0.80\pm 0.08(12)$	$0.47\pm 0.04^{**}$
Indometacina 10^{-6}M	$0.735\pm 0.067(10)$	0.59 ± 0.08
Ang II 10^{-9}M + Indometacina	$0.63\pm 0.05(10)$	$0.95\pm 0.12)^*$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, em comparação ao controle, médias \pm erro padrão.

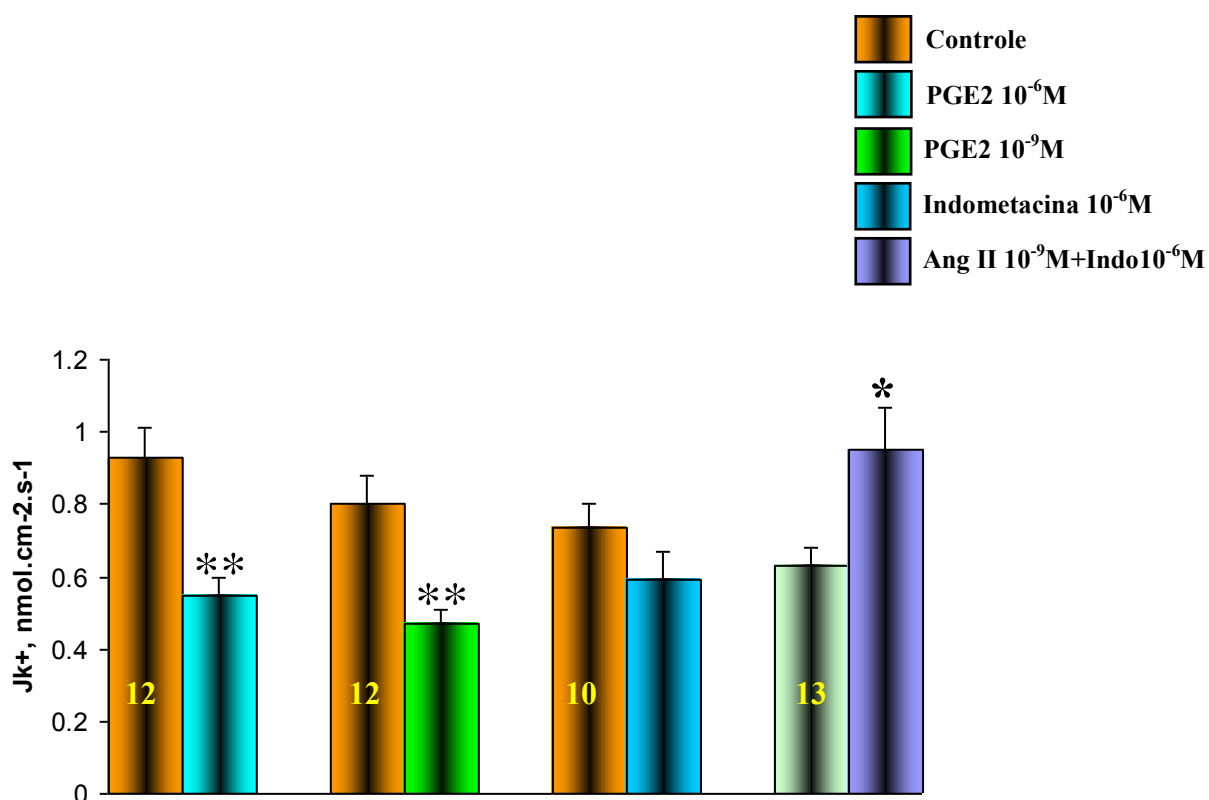


FIGURA 13 - Efeito da perfusão luminal com PGE2 (10^{-6} e 10^{-9}M) e do inibidor da Ciclo-oxigenase (Indometacina - 10^{-6}M), sobre o fluxo secretório de potássio (J_{K^+}). Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos, * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$.

Em experimentos realizados recentemente no laboratório de Fisiologia do ICB, também estudamos a possibilidade de receptores AT₂ participarem dos eventos ligados aos efeitos da Angiotensina II sobre o Fluxo secretório de K⁺. A figura 14, ilustra os efeitos da presença do PD 123319 (inibidor específico do receptor AT₂) associado à Angiotensina (10^{-11} M), comparado a perfusão com o mesmo agente hormonal e na mesma concentração utilizada no grupo experimental. Apesar dos dados preliminares, aparentemente a Angiotensina também poderia exercer seus efeitos através destes receptores, uma vez que os valores médios obtidos das perfusões experimentais foram superiores quando comparados ao grupo controle ($0,82 \pm 0.08$ vs 0.682 ± 0.047 nmol/cm².s).

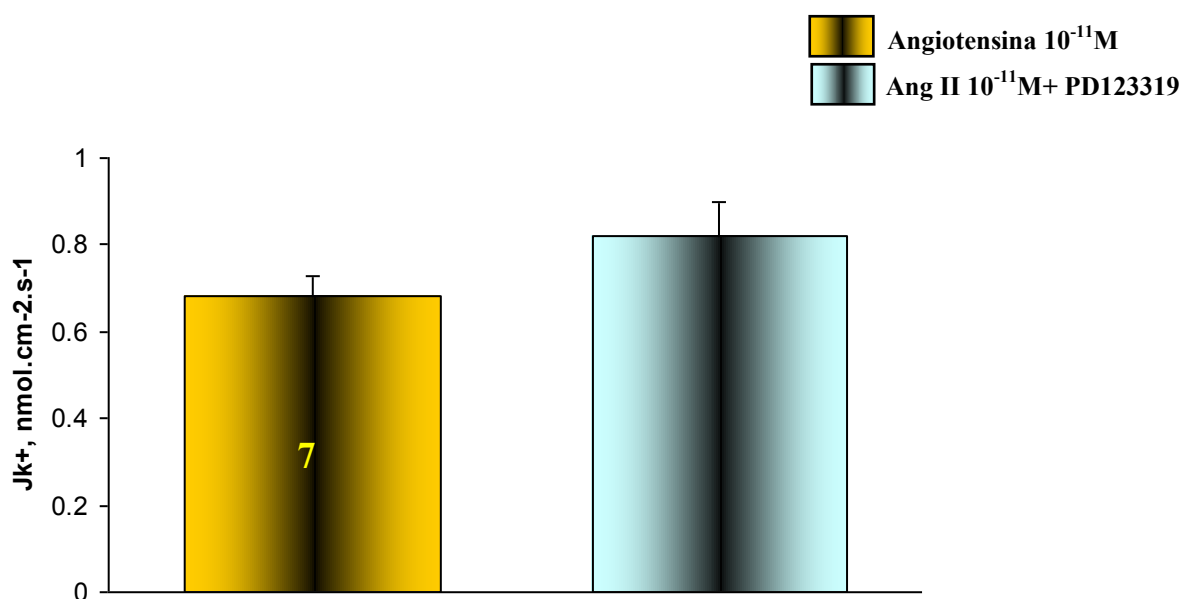


FIGURA 14 - Efeito do PD 123319 (10^{-4} M) (bloqueador específico do receptor AT₂) sobre o fluxo secretório de Potássio (JK⁺). Em amarelo (N) número de túbulos perfundidos.

5 DISCUSSÃO

Dados anteriores do nosso laboratório usando técnicas de microperfusão *in vivo* em rim de rato mostraram que a secreção de potássio (JK⁺) no segmento final do néfron é estimulada pela presença Luminal de vasopressina - AVP (Amorim e Malnic, 2000). Além disso, demonstramos que a AVP afetou a condutância de K⁺ na membrana luminal através de receptor V1, ao qual estava acoplada a atividade da PLC, e conseqüente aumento de cálcio no citossol (Amorim e Malnic, 2004). O presente trabalho sugere que a Angiotensina II também modula a secreção de potássio pelo epitélio renal atuando na inibição deste transporte catiônico, podendo ser revertido na presença de Losartan ou Candesartan sugerindo a participação do receptor AT1 na transdução de sinal celular.

No entanto, segundo a literatura, a Angiotensina II exerce seus efeitos predominantemente através da proteína quinase C dependente de cálcio, quando acopladas ao receptor AT1. Assim parece improvável que a Angiotensina e a Vasopressina possam agir de formas opostas no transporte de potássio nos túbulos distais, tendo o mesmo percurso de sinalização celular.

Porém, antes de adentrarmos aos eventos que se seguem ao acoplamento do hormônio ao seu receptor é necessário esclarecer sobre a presença da Angiotensina, ou dos fatores necessários a sua síntese na luz tubular renal. Existem vários achados que demonstraram a presença de todos os componentes do SRA no tecido renal. Foi relatado que a Angiotensina II é produzida em túbulo proximal, bem como sua concentração esta na ordem de nanomolar neste mesmo segmento, embora em túbulo distal ainda sua presença permaneça

desconhecido. Entretanto a detecção de renina e ECA no túbulo distal e ainda de Angiotensina urinária é maior que 300 fmol/ml sugerindo que os níveis de Angiotensina em fluido tubular distal podem influenciar o transporte iônico nestes segmentos. Wang e Giebisch (1996) relataram através de estudos de microperfusão *in vivo*, que concentrações ao redor de 10fmol/ml (10^{-11} M) já são suficientes para estimular o transporte de Na^+ e inibir o de K^+ em segmento final de néfron (CCD). Evidencias de efeitos da Angiotensina sobre o transporte iônico, através da utilização da ferramenta metodológica utilizada no nosso laboratório, também foram reportadas. Em tais estudos, a microperfusão de túbulos proximais no rato mostrou que a administração de Angiotensina II em doses picomolares estimula a reabsorção de Na^+ , particularmente pela ativação da permuta Na^+/H^+ (Nascimento-Gomes & Mello-Aires, 1992). Entretanto, não foi esclarecido ainda porque doses diferenciadas de Angiotensina podem estimular a reabsorção de fluido e de bicarbonato, bem como a secreção de hidrogênio (Barreto-Chaves e Mello-Aires, 1997, Wang e Giebisch, 1996). Nossos resultados mostraram um padrão similar ao comportamento da Angiotensina, descrito acima, na secreção de potássio pelo túbulo distal, ou seja, doses baixas ou fisiológicas (10^{-12} a 10^{-9} M) luminalmente inibiram o K^+ enquanto doses elevadas (10^{-6} M) reduziram o transporte de K^+ neste segmento tubular.

Entretanto os efeitos da Angiotensina II dependerão da presença e/ou do tipo de receptor presente na membrana luminal. Dessa forma, inicialmente, buscamos evidencias que pudessem identificar qual(is) tipo(s) de receptor em membranas luminiais estaria presente em túbulos distais. Vários autores detectaram a presença do receptor AT1 (Paxton et al., 1993; Harrison-Bernard, 1997; Prieto-Carrasquero et al., 2005) em diversos segmentos tubulares incluindo Duto Coletor Cortical. Da mesma forma, o mRNA do AT1R foi localizado em duto coletor cortical e medular no néfron (Terada et al., 1993; Meister et al., 1993). Ainda o mRNA que codifica o AT1a (principal subtipo de receptor AT1 em

roedores) é mais expresso em duto coletor do que túbulo proximal e segmento espesso da alça de Henle (Imanishi et al., 2003). Wey et al. (2007) em estudos de imunofluorescência, demonstraram abundante expressão do AT1R no lado apical de células do DCC em ratos com restrição de potássio pela dieta.

Por outro lado a expressão de AT2R é muito baixa em rim adulto, mas elevada em tecidos renais fetais. O mRNA deste receptor foi identificado em artérias interlobulares, artérias estas cujas ações vasculares dependem do SRA (Matsubara, 1998).

Carey e Padia (2008) relataram que o AT2R pode ser expresso em células do túbulo proximal (Ozono et al., 1997; Miyata et al., 1999). Um estudo *in vitro* demonstrou a inibição do transporte renal de Na⁺ mediada pelo AT2R (Haithcock et al., 1999). Em outros estudos recentes, alguns achados confirmaram a possibilidade de participação de AT2R na modulação do transporte iônico em tecido renal, através de técnicas de microinfusão intersticial direta de agentes farmacológicos sem influenciar a hemodinâmica ou alterar secreções hormonais. Observaram que o bloqueio intrarenal de AT1R induziu uma resposta natriurética significativa que foi abolida com a coinfusão de antagonista PD123319 (antagonista específico de AT2R). Estes achados sustentam a possibilidade de modulação do transporte de K⁺ pelo receptor AT2R apresentado no presente trabalho, no qual a perfusão de Angiotensina II associada ao PD123319 resultou no incremento ou na reversão da inibição do JK⁺ comparado a Angiotensina perfundida isoladamente (Figura 15).

Apesar de existir poucas evidências das vias de sinalização celular desencadeadas pelo receptor AT2, mostrou-se que esta proteína está acoplada ao subtipo Gi da proteína G (Carey et al., 2000) sendo altamente expresso durante o desenvolvimento fetal e, após o nascimento, sua expressão diminui significativamente (Horiuchi, et al., 1999). Em certas condições, como lesão vascular e infarto do

miocárdio, o receptor AT2 pode ser re-expresso no leito vascular (Horiuchi et al., 1999), atuando como um mecanismo compensatório, que antagoniza as ações mediadas pelo AT1 (Nakajima et al., 1995). A ligação da Ang II aos receptores do tipo AT2 induz a apoptose, vasodilatação e a efeitos anti-proliferativos (Tsuzuki, et al., 1996), ou seja, ações antagônicas àquelas observadas após ligação ao receptor AT1. Uma das principais vias de sinalização envolvida com a ativação dos receptores AT2 é a das proteínas tirosina fosfatases, responsáveis pela desfosforilação de algumas proteínas da via das MAPK (Bottari et al., 1992; Horiuchi et al., 1999). Além disso, a interação da Ang II com este receptor ativa a via de produção do NO (Siragy e Carey, 1997) e GMPc (Siragy e Carey, 1996), vias estas envolvidas no processo de relaxamento de células musculares lisas e, conseqüentemente, vasodilatação. Ainda em relação às vias de sinalização, estudos recentes demonstraram que o receptor AT2 é capaz de ativar a via da PI3K/Akt, a qual envolve a síntese de NO (Caruso-Neves et al., 2005).

Tem sido discutida na literatura a comunicação existente entre os receptores AT1 e AT2. Pesquisadores demonstraram que o receptor AT2 sofre heterodimerização com o receptor AT1 e esta dimerização antagoniza os efeitos promovidos pelo AT1, independente da ativação e sinalização do receptor AT2, ou seja, o receptor AT2 pode ser ativado mesmo na ausência da Ang II (Abdalla et al., 2001). Outro grupo de pesquisadores (Galindo et al., 2005) também mostrou que a co-expressão dos receptores AT1 e AT2 em fibroblastos humanos oferece um mecanismo de resistência a Ang II. Embora os achados sobre os efeitos do balanço entre os receptores AT1 e AT2 ainda sejam prematuros, o melhor entendimento desse mecanismo poderá oferecer subsídios para compreender o papel do SRA em tecidos que co-expressam os receptores AT1 e AT2 de maneira semelhante e que podem ser ativados na ausência de Ang II.

Diante do exposto, podemos inferir que a reversão dos efeitos da Angiotensina na secreção distal de potássio na presença de PD123319 no presente trabalho poderia decorrer de efeito semelhante aos observados por tais pesquisadores, neste sentido estamos realizando atualmente experimentos de microperfusão utilizando bloqueadores de AT1R e AT2R no intuito de estudar a possível interação destes receptores no processo de transporte de K⁺ pelo epitélio distal renal.

Czekalski et al. (1996), por sua vez, relataram uma linha de células humanas, oriundas de DCC que apresentam características morfológicas e biofísicas similares às células principais, as quais expressam um receptor AT4 específico. Uma vez que a sinalização celular promovida por este receptor na presença de Angiotensina II (ou de seus fragmentos, como Ang IV) envolve a gênese de AMPc (Ardaillou, 1999; Hamilton et al., 2001, Wright et al., 2001) este segundo mensageiro poderia modular o transporte de água e de íons, e assim resultar na inibição de canais de baixa condutância para potássio como observado neste trabalho. Observamos uma redução significativa no JK⁺ na presença de AMPc e reversão desta inibição durante perfusão de antagonista de PKA. Assim sendo, existe a possibilidade de parte dos efeitos inibitórios da Angiotensina se relacionarem também com esses tipos de receptores caso sejam expressos em membrana luminal em células tubulares do segmento final do néfron em ratos.

No entanto, nossos dados são consistentes com a presença de receptores AT1 mediando o efeito luminal da Angiotensina II sobre transporte de K⁺ no túbulo distal, já que a adição de Losartan ou Candesartan, bloqueadores específicos do receptor AT1, reverteram à inibição de JK⁺ pelo agente hormonal. Em favor desta hipótese, foi descrito que a Angiotensina presente luminalmente inibe a atividade dos canais ROMK em DCC isolados de ratos através de receptor AT1 (Wang e Giebisch, 2000; Wei et al., 2007). Este efeito foi observado quando os animais foram submetidos à restrição de K⁺ na dieta, o que reduziu a

densidade de canais de baixa condutância para K⁺ na membrana apical. Entre as possíveis vias envolvidas nesta regulação foi relatada a via dependente de PKC e PTK (Wang e Giebisch, 2000; Wei et al., 2001; Zeng et al., 2003; Sterling et al., 2004, Wang et al., 2010). A via da PKC inibe a atividade dos canais tipo ROMK possivelmente por internalizar a proteína ou reduzir algum fosfolípide requerido para manter o estado do canal aberto (PIP₂) enquanto a PTK esta envolvida na depleção de potássio e atividade de outras proteínas de regulação como cSrc a qual fosforila o canal ROMK aumentando sua endocitose.

Dessa forma, o efeito inibitório da Angiotensina sobre o transporte de Potássio pelo epitélio final do néfron observado no presente trabalho, pode estar acoplado (pelo menos em parte) a sua ação sobre canais de baixa condutância presentes em membranas luminiais durante as perfusões contendo este agente peptídico.

Em outra linha de raciocínio, sabe-se que a ligação da Angiotensina em receptor AT₁R pode induzir a ativação de múltiplas cascatas de sinalização celular. Tem sido evidenciado que alguns agentes hormonais, como bradicinina, vasopressina, e a própria Angiotensina, poderiam afetar o transporte de eletrólitos através do estímulo da síntese de prostaglandinas, e no caso do território renal, o principal prostanóide envolvido nestas ações seria a PGE₂ (Zusman et al., 1980; Holt e Lechene, 1981 I e II). As Prostaglandinas (PG) compreendem uma diversificada família de lipídeos biologicamente ativos, derivados do metabolismo do ácido araquidônico, pela ação da ciclooxigenase (Cox). O rim é particularmente uma fonte rica destes prostanóides, sendo a PGE₂ seu maior metabólito renal, atingindo concentração urinária da ordem de nanomolar, enquanto na circulação sua concentração é bem menor, na faixa de picomolar (Dunn e Hood, 1977; Bonvalet et al., 1987). A produção local pode ser estimulada por vários hormônios como a Angiotensina, e por outro lado os prostanóides modulam também a ação destes hormônios (Breyer et al., 1996). As prostaglandinas regulam a

hemodinâmica renal e existem evidências de sua ação no transporte de solutos e água (Morduchowicz, 1991, Musa-Aziz et al., 2005), apresentando efeitos distintos sobre células alvo do tecido renal, dependendo particularmente do tipo de receptor presente nas membranas celulares, denominados EP1, EP2, EP3 e EP4.

Dos quatro subtipos, o EP₃ parece ser o mais ubíquo. O RNA mensageiro do receptor EP₃ é muito expresso em rim e útero, e é expresso também em estômago, timo, baço, pulmão, e cérebro (Sugimoto et al., 1992). Takeuchi et al. (1993), clonou receptor EP₃ em rato e examinou a distribuição de seu mRNA em rim através de transcrição reversa e PCR, em segmentos de néfrons dissecados. Seus resultados indicam que estes receptores são expressos em segmento espesso da alça de Henle e ducto coletor no córtex e na medula renal.

Por outro lado, demonstrou-se que a Cox (1 e 2) é expressa em DCC (Yang et al., 1998). Wang e Giebisch (2009) relataram que a restrição na dieta de potássio estimula a expressão de Cox 2 e também a produção de PGE₂ no tecido renal e ainda que a PGE₂ inibe os canais ROMK através da via dependente de PKC e MAPK. Outro aspecto interessante relatado, em função da restrição de K⁺ na dieta, seria o estímulo à produção de renina, o qual aumenta a produção de PGE₂ (Sealey et al., 1970; Saikaley et al., 1986; Ray et al., 2001) e desta forma, tal mecanismo poderia apresentar um papel biológico de regulação celular que envolveria a supressão dos canais de K⁺ apicais durante a redução de ingesta deste íon pelo organismo.

Assim, realizamos experimentos de microperfusão renal direcionando a possibilidade de a Angiotensina atuar no transporte de potássio, indiretamente, através do estímulo à produção de PGE₂, neste segmento tubular. Observamos uma forte inibição do JK⁺ (ao redor de 50%) ao passo que o hormônio na presença de Indometacina (bloqueador específico da Ciclooxygenase) reverteu este processo, sugerindo que

parte dos efeitos da Angiotensina poderiam estar relacionados à presença de PGE₂.

Não foi evidenciada, até o presente momento, a identidade do receptor de PGE₂ envolvido neste processo. Todavia, existem evidências que este prostanóide poderia estar atuando na redução do fluxo secretório de potássio, através da ativação de receptores EP₃ acoplados a proteína Gi, diminuindo os níveis de AMPcíclico. Este segundo mensageiro e a proteína quinase A (PKA) relaciona-se fortemente com o aumento da condutância iônica pelos canais luminais de pequena condutância para o potássio (Cassola et al., 1993). Porém, nossos dados demonstraram que na presença de AMPc e/ou na inibição da PKA, ocorreu redução do fluxo de K⁺, ilustrando a complexidade das ações da Angiotensina neste segmento tubular. Por outro lado, sabe-se que a PGE₂ pode acoplar-se a outros tipos de proteína G, como a proteína G_q, aumentando os níveis de fosfolipase C, com aumento de proteína quinase C (inibidora dos mesmos canais de baixa condutância), e subsequente aumento de Ca⁺⁺ intracelular. Entretanto, em experimentos anteriores, mostramos que o estímulo da via ligada a PKC e os níveis de cálcio intracelular, ativam os canais de grande condutância para o K⁺ e assim decorre o estímulo no fluxo secretório de potássio (Amorim e Malnic, 2000; 2004).

Por outro lado, Sakairi et al. (1995), em estudos de microperfusão isolada de DCC, demonstraram pela primeira vez que a PGE₂ aplicada luminalmente modula o transporte iônico em ducto coletor de coelho, causando uma hiperpolarização provavelmente associada à via do receptor EP₄, insensível a Butaprost (agonista EP₂). O receptor EP₄, por sua vez, está envolvido no estímulo de AMPc, o que promoveria o aumento da permeabilidade osmótica observado no trabalho destes autores.

Acreditamos que novos estudos sejam necessários para definir as vias de transdução de sinal celular, com maior precisão, no

intuito de estabelecer a importância fisiológica dos efeitos luminais da Angiotensina II no transporte de K^+ , embora esteja claro sua participação na condição de restrição de potássio com a inibição de canais de baixa condutância deste cátion. Por outro lado, se justifica o achado clínico do aumento da excreção de potássio na urina quando da utilização terapêutica de losartan.

Nas figuras 15, 16 e 17, esquematizamos as principais vias correlacionadas com nossos resultados, as quais sugerem a participação de pelo menos 3 eventos celulares ligados aos efeitos luminais da Angiotensina II na manutenção da homeostasia do K^+ no epitélio tubular em segmento final do néfron.

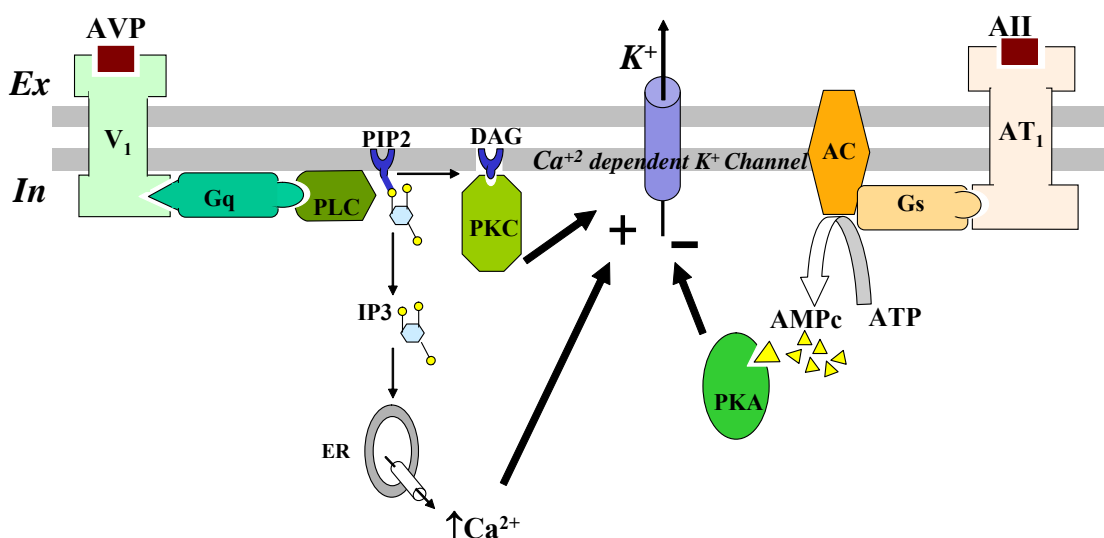


FIGURA 15 - Ilustração da via de sinalização celular envolvida no acoplamento da Arginina Vasopressina (à esquerda) e da Angiotensina II (à direita) através do receptor AT_1 .

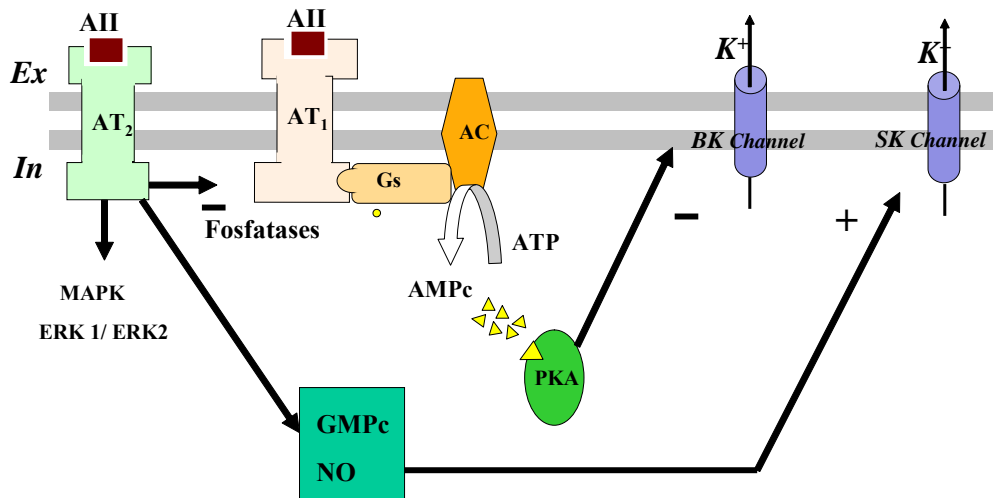


FIGURA 16 - Ilustração da via de sinalização celular envolvida no acoplamento da Angiotensina II (à direita) ao receptor AT₂.

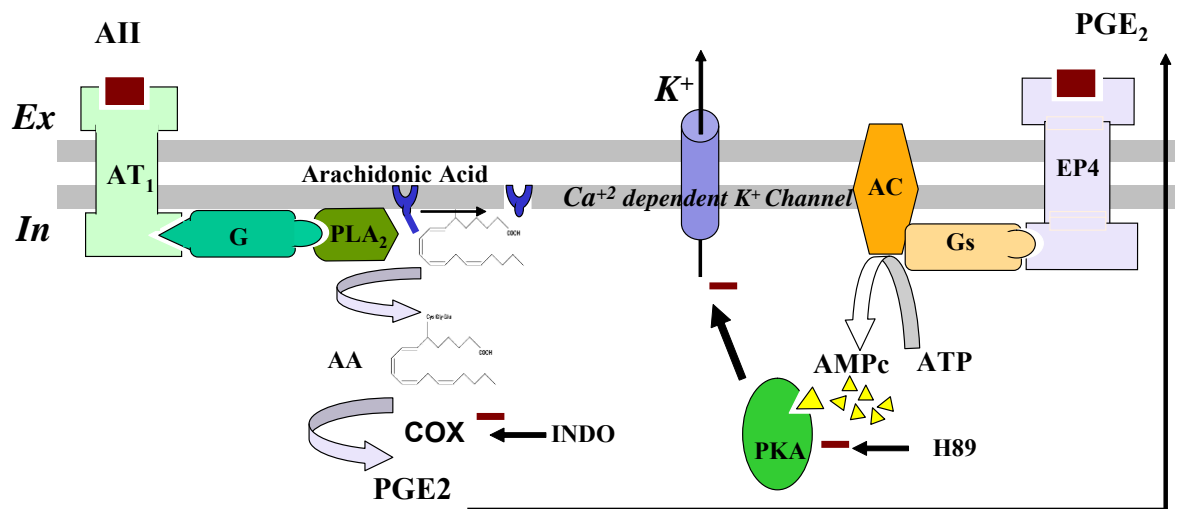


FIGURA 17 - Ilustração da via de sinalização celular envolvida no acoplamento da Angiotensina II e posterior estímulo de síntese de PGE₂.

6 CONCLUSÕES

- a) os resultados do presente trabalho indicam que a Angiotensina inibe a secreção de potássio no segmento final do néfron;
- b) a reversão dos efeitos observados pela Angiotensina na presença de Losartan sugere que o AT1R participa neste processo de transporte;
- c) a reversão dos efeitos observados pela Angiotensina na presença de PD 123319 sugere que o AT2R pode também participar neste processo de transporte;
- d) a via AMPc – PKA parece mediar o efeito da Angiotensina II na regulação distal de potássio;
- e) o efeito da PGE2 foi similar aos resultados obtidos pela Angiotensina, sugerindo a possibilidade de efeito adicional de outras vias de sinalização celular envolvidas na regulação do transporte de K⁺ em túbulos distais.

7 REFERÊNCIAS*

Abdalla S, Lothar H, Abdel-Tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001 Oct.; 26;276(43):39721-6.

Alkhunaizi AM, Yaqoob MM, Edelstein CL, Gengaro PE, Burke TJ, Nemenoff RA, et al. Arachidonic acid protects against hypoxic injury in rat proximal tubules. *Kidney Int.* 1996 Mar.; 49(3):620-5.

Amorim JB, Malnic G. V(1) receptors in luminal action of vasopressin on distal K(+) secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 May; 278(5):809-16.

Amorim JB, Bailey MA, Musa-Aziz R, Giebisch G, Malnic G. Role of luminal anion and pH in distal tubule potassium secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Feb.; 284(2):381-8.

Amorim JB, Musa-Aziz R, Mello-Aires M, Malnic G. Signaling path of the action of AVP on distal K+ secretion. *Kidney Int.* 2004 Aug.; 66(2):696-704.

Bailey MA, Cantone A, Yan Q, Macgregor GG, Leng Q, Amorim JB, et al. Maxi-K channels contribute to urinary potassium excretion in the ROMK-deficient mouse model of Type II Bartter's syndrome and in adaptation to a high-K diet. *Kidney Int.* 2006 July; 70(1):51-9. Epub 2006 May 17.

Amorim JB, Musa-Aziz R, Lessa LM, Malnic G, Fonteles MC. Effect of uroguanylin on potassium and bicarbonate transport in rat renal tubules. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Oct.; 84(10):1003-10.

An S, Yang J, So SW, Zeng L, Goetzl EJ. Isoforms of the EP3 subtype of human prostaglandin E2 receptor transduce both intracellular calcium and cAMP signals. *Biochemistry* 1994 Dec.; 6;33(48):14496-502. PubMed PMID: 7981210.

* Baseado em:

International Committee of medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM: c2003 [disponibilidade em 2008 ago: citado em 25 ago: disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html]

Ardailou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jan.; 10 Suppl 11:S30-9.

Ballermann BJ, et al. Vasoactive peptides and the kidney. 4.ed. Philadelphia: Saunders; 1991. p.510-83.

Barreto-Chaves ML, Mello-Aires M. Luminal arginine vasopressin stimulates Na⁺-H⁺ exchange and H⁺ -ATPase in cortical distal tubule via V1 receptor. *Kidney Int.* 1997; 52:1035-41.

Barreto-Chaves MLM, Mello-Aires M. Effect of luminal angiotensin II and ANP on early and late cortical distal tubule HCO₃⁻ reabsorption. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1996; 271:977-84.

Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2001 Dec.; 1;38(6):1246-9.

Becari C, Sivieri Junior DO, Santos CF, Moysés MK, Oliveira EB, et al. Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005 Oct.; 46(4):498-504.

Beck FX, Dörge A, Rick R, Schramm M, Thurau K. The distribution of potassium, sodium and chloride across the apical membrane of renal tubular cells: effect of acute metabolic alkalosis. *Pflugers Arch.* 1988 Mar.; 411(3):259-67.

Beck JS, Hurst AM, Lapointe JY, Laprade R. Regulation of basolateral K channels in proximal tubule studied during continuous microperfusion. *Am J Physiol.* 1993 Mar.; 264(3):496-501.

Biagi B, Kubota T, Sohtell M, Giebisch G. Intracellular potentials in rabbit proximal tubules perfused in vitro. *Am J Physiol.* 1981 Mar.; 240(3):200-10.

Bia MJ, DeFRONZO RA. External potassium homeostasis. *Am J Physiol.* 1981; 240:257-68.

Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, et al. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol.* 1995 June; 268(6):1132-40.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994 Apr.; 28;368(6474):850-3.

Bonvalet JP, Pradelles P, Farman N. Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *Am J Physiol* 1987 Sept.; 253(3):377-87.

Bourdeau JE, Lau K. Basolateral cell membrane Ca-Na exchange in single rabbit connecting tubules. *Am J Physiol*. 1990; 258:1497-503.

Bovee KC. Effects of nonpeptide angiotensin II receptors antagonist Dup 753 on blood pressure and renal functions in spontaneously hypertensive PH dogs. *Am J Hypertens*. 1991; 4:327S-33S.

Blatz AL, Magleby KL. Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 1986; 323:718-20.

Bolger PM, Eisner GM, Ramwell PW, Slotkoff LM. Renal actions of prostacyclin. *Nature* 1978 Feb.; 271(5644):467-9.

Braam B, Mitchell KD, Fox J, Navar LG. Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am J Physiol*. 1993 May; 264(5):891-8.

Breyer MD, Aando Y. Hormonal signaling and regulation of salt and water transport in the collecting duct. *Annu Rev Physiol*. 1994; 56:711-39.

Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol*. 1996 Jan; 7(1):8-17.

Burnier M, Rutschmann B, Nussberger J, Versaggi J, Shahinfar S, Waeber B, et al. Salt-dependent renal effects of an angiotensin II antagonist in healthy subjects. *Hypertension* 1993 Sept.; 22(3):339-47.

Burnier M, Waeber B, Brunner HR. Clinical pharmacology of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium in healthy subjects. *J Hypertens Suppl* 1995 July; 13(1):S23-8.

Burnier M, Brunner HR. Renal effects of angiotensin II receptor blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition in healthy subjects. *Exp Nephrol*. 1996; 4(Suppl 1):41-6.

Butcher RW, Baird CE. Effects of prostaglandins on adenosine 3'5'-monophosphate levels in fat and other tissues. *J Biol Chem*. 1968; 243:1713-7.

Carey RM, Padia SH. Angiotensin AT₂ receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Apr.; 19(3):84-7.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Update: role of the angiotensin type-2 (AT₂) receptor in blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep.* 2000 Apr.; 2(2):198-201.

Caruso-Neves C, Kwon SH, Guggino WB. Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT₂ receptor-mediated protein kinase B activation. *Proc Natl Acad Sci* 2005 Nov.; 102(48):17513-8.

Cassola AC, Giebisch G, Wang W Vasopressin increases density of apical low-conductance K⁺ channels in rat CCD. *Am J Physiol.* 1993 Mar.; 264(3):502-9.

Choe H, Zhou H, Palmer LG, Sackin H. A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *Am J Physiol.* 1997 Oct.; 273(4):516-29.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994 June; 46(2):205-29.

Coppola S, Frömter E. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO₃ cotransport and K conductance in renal proximal tubules I. Effect of picomolar concentrations. *Pflugers Arch.* 1994a; 427:143-50.

Coppola S, Frömter E. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO₃ cotransport and K conductance in renal proximal tubules. II. Effect of micromolar concentrations. *Pflugers Arch.* 194b; 427:151-156.

Cuthbert AW, Margolius HS. Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. *Br. J. Pharmacol.* 1982; 75:587-98.

Czekalski S, Chansel D, Vandermeersch S, Ronco P, Ardaillou R. Evidence for angiotensin IV receptors in human collecting duct cells. *Kidney Int.* 1996 Oct.; 50(4):1125-31.

DeFRONZO RA, Bia M, Birkhead G. Epinephrine and potassium homeostasis. *Kidney Int.* 1981 July; 20(1):83-91.

DeFRONZO RA, Stanton B, Klein-Robbenhaar G, Giebisch G. Inhibitory effect of epinephrine on renal potassium secretion: a micropuncture study. *Am J Physiol.* 1983 Sept.; 245(3):303-11.

Desir GV. Molecular characterization of voltage and cyclic nucleotide-gated potassium channels in kidney. *Kidney Int.* 1995; 48:1031-5.

Douglas JG. Angiotensin receptors subtypes of the kidney cortex. *Am J Physiol.* 1987; 253:1-7.

Dunn MJ, Hood VL. Prostaglandins and the Kidney. *Am J Physiol.* 1977; 233:169-84.

Edelman A, Curci S, Samarzija I, Frömter E. Determination of intracellular K⁺ activity in rat kidney proximal tubular cells. *Pflugers Arch.* 1978 Dec.; 378(1):37-45.

Edwards RM. Response of isolated renal arterioles to acetyl-choline, dopamine, and bradykinin. *Am J Physiol.* 1985; 248:183-9.

Fenoy FJ, Milicic I, Smith RD, Wong PC, Timmermans PB, Roman R. Effects of DuP 753 on renal function of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1991 Apr.; 4(4):321S-6S.

Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006 Mar.; 7(1):3-14.

Field MJ, Stanton BA, Giebisch GH. Influence of ADH on renal potassium handling: a micropuncture and microperfusion study. *Kidney Int.* 1984 Mar.; 25(3):502-11.

Field MJ, Stanton BA, Giebisch GH. Differential acute effects of aldosterone, dexamethasone, and hyperkalemia on distal tubular potassium secretion in the rat kidney. *J Clin Invest.* 1984 Nov.; 74(5):1792-802.

Field MJ, Giebisch G. Hormonal control of potassium excretion. *Kidney Int.* 1985; 27:379-87.

Frindt G, Palmer LG. Low-conductance K channels in apical membrane of cortical collecting tubule. *Am J Physiol.* 1989; 256:143-51.

Frindt G, Silver RB, Windhager EE, Palmer LG. Feedback regulation of Na channels in rat CCT. II. Effects of inhibition of Na entry. *Am J Physiol.* 1993 Mar.; 264(3):565-74.

Galindo M, Santiago B, Palao G, Gutierrez-Cañas I, Ramirez JC, Pablos JL. Co-expression of AT1 and AT2 receptors by human fibroblasts is associated with resistance to angiotensin II. *Peptides* 2005 Sept.; 26(9):1647-53.

Garcia-Filho E, Malnic G, Giebisch G. Effects of changes in electrical potential difference on tubular potassium transport. *Am J Physiol.* 1980; 238:235-46.

Garg LC, Narang, N. Ouabain-insensitive K⁺ adenosine triphosphatase indistal nephron segments of the rabbit. *J Clin Invest.* 1988; 81:1204-8.

Geibel J, Zweifach A, White S, Wang WH, Giebisch G. K⁺ channels of the mammalian collecting duct. *Ren Physiol Biochem.* 1990 Jan./Apr.; 13(1-2):59-69.

Gertz KH. Transtubulare natrium chloride flüsse und permeabilität für nichtelektrolyte in proximalen und distalen konvolut der rattenniere. *Pflügers Arch.* 1963; 276:336-56.

Giebisch GH. Cell models of potassium transport: in the renal tubule. In . *Currents topics in membranes and transport*, edited by G. Giebisch. Orlando, FL: Academic Press, 28:133-83, 1987.

Giebisch G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998; 274:817-33.

Gifford JD, Rome L, Galla JH. H⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase activity in rat collecting duct segments. *Am J Physiol.* 1992 Apr.; 262(4):692-5.

Gil FZ, Manic G. Effect of amphotericin B on renal tubular acidification in the rat. *Pfluegers Arch.* 1989; 413: 280-6.

Gluck SL, Underhill DM, Iyori M, Holliday LS, Kostrominova TY, Lee BS. Physiology and biochemistry of the kidney vacuolar H⁺-ATPase. *Annu Rev Physiol.* 1996; 58:427-45.

Greger R. Chloride activity in cells of isolated perfused cortical thick ascending limbs of rabbit kidneys. *Pfluegers Arch.* 1983; 399:29-34.

Haeberle DA, Von Baeyer H. Characteristics of glomerulotubular balance. *Am J Physiol.* 1983; 244:355-66.

Haithcock D, Jiao H, Cui XL, Hopfer U, Douglas JG. Renal proximal tubular AT2 receptor: signaling and transport. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jan.; 10(Suppl 11):S69-74.

Hamilton KL, Eaton DC. cAMP-induced potassium channel activity in apical membrane of cultured kidney cells. *Am J Physiol.* 1991; 261:1055-62.

Hamilton TA, Handa RK, Harding JW, Wright JW. A role for the angiotensin IV/AT4 system in mediating natriuresis in the rat. *Peptides.* 2001 June; 22(6):935-44.

Harris PJ, Navar LG Tubular transport responses to angiotensin. *Am J Physiol.* 1985; 248:621-30.

Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, El-Dahr SS. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol.* 1997 July; 273(1):170-7.

Hebert SC, Andreoli TE. Control of NaCl transport in the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol.* 1984; 246:745-56.

Hébert RL, Jacobson HR, Fredin D, Breyer MD. Evidence that separate PGE2 receptors modulate water and sodium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol.* 1993 Nov.; 265(5):643-50.

Hébert RL, Breyer RM, Jacobson HR, Breyer MD. Functional and molecular aspects of prostaglandin E receptors in the cortical collecting duct. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995 Feb.; 73(2):172-9.

Henrich WL. Renin regulation in cultured proximal tubular cells. *Hypertension* 1996; 27:1337-40.

Hidaka H, Kobayashi R. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1992; 32:377-97.

Hirsch J, Schlatter E. K⁺ channels in the basolateral membrane of rat cortical collecting duct. *Pflügers Arch.* 1993; 424:470-77.

Hirsch J, Schlatter E. K⁺ channels in the basolateral membrane of rat cortical collecting duct are regulated by a cGMP-dependent protein kinase. *Pflügers.Arch.* 1995; 429:338-44.

Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993 Mar.; 362(6415):31-8.

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999 Feb.; 33(2):613-21.

Ikemoto F, Itoh S, Song G, Tanaka M, Takada T, Tominaga M, et al. Contribution of renal angiotensin converting enzyme (ACE) to blood pressure regulation: possible role of brush border ACE. *Clin Exp Hypertens A*. 1987; 9(2-3):441-7.

Imanishi K, Nonoguchi H, Nakayama Y, Machida K, Ikebe M, Tomita K. Type 1A angiotensin II receptor is regulated differently in proximal and distal nephron segments. *Hypertens Res*. 2003 May; 26(5):405-11.

Jin Y, Wang Z, Zhang Y, Yang B, Wang WH. PGE2 inhibits apical K channels in the CCD through activation of the MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct.; 293(4):1299-307.

Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kaczmarek LK. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Sept.; 30;94(20):11013-8.

Kawahara K, Hunter M, Giebisch G. Potassium channels in Necturus proximal tubule. *Am J Physiol*. 1987 Sept.; 253(3):488-94.

Kelly DJ, Cox AJ, Gow RM, Zhang Y, Kemp BE, Gilbert RE. Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension*. 2004 Aug.; 44(2):195-202.

Khuri RN, Strieder WN, Giebisch G. Effects of flow rate and potassium intake on distal tubular potassium transfer. *Am J Physiol*. 1975 Apr.; 228(4):1249-61.

Koeppen BM, Biagi BA, Giebisch GH. Intracellular microelectrode characterization of the rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol*. 1983 Jan.; 244(1):35-47. .

Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, et al. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 1996 Sept.; 273(5282):1709-14.

Kubota T, Biagi BA, Giebisch G. Effects of acid base disturbances on basolateral membrane potential and intracellular potassium activity in the proximal tubule of Necturus. *J Membr Biol*. 1983; 73(1):61-8.

Kubokawa M. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in Ca²⁺-induced K⁺ channel inhibition in rat CCD principal cells. *Am J Physiol.* 1995; 268(37):211-9.

Leyssac PP. Changes in single nephron renin release are mediated by tubular fluid flow rate. *Kidney Int.* 1986; 30:332-9.

Li L, Wang YP, Capparelli AW, Jo OD, Yanagawa N. Effect of luminal angiotensin II on proximal tubule fluid transport: role of apical phospholipase A2. *Am J Physiol.* 1994 Feb.; 266(2):202-9.

Liu FY, Cogan MG. Angiotensin II: a potent regulator of acidification in the rat early proximal convoluted tubule. *J Clin Invest.* 1987 July; 80(1):272-5.

Liu Z, Wang HR, Huang CL. Regulation of ROMK channel and K⁺ homeostasis by kidney-specific WNK1 kinase. *J Biol Chem.* 2009 May; 284(18):12198-206. Epub 2009 Feb 25.

Lopes MJ, Malnic G. Sodium dependence of early distal H⁺ secretion in the rat kidney. *Braz J Med Biol Res.* 1988; 21:1065-68.

Lu M, Giebisch G, Wang W. Nitric oxide-induced hyperpolarization stimulates low-conductance Na⁺ channel of rat CCD. *Am J. Physiol.* 1997; 272(41):498-504.

Malnic G, Klose RM, Giebisch G. Microperfusion study of distal tubular potassium and sodium transfer in rat kidney. *Am J Physiol.* 1966 Sept.; 211(3):548-59.

Malnic G, Mello Aires M, Giebisch G. Potassium transport across renal distal tubules during acid-base disturbances. *Am J Physiol.* 1971 Oct.; 221(4):1192-208.

Malnic G, Berliner RW, Giebisch G. Flow dependence of K⁺ secretion in cortical distal tubules of the rat. *Am J Physiol.* 1989; 256:932-41.

Malnic G, Berliner RW, Giebisch G. Distal perfusion studies: transport stimulation by native tubule fluid. *Am J Physiol.* 1990; 258:1523-7.

Malnic G, Fernandez R, Cassola AC, Barreto-Chaves ML, Souza MO, Aires MM. Mechanisms and regulation of H⁺ transport in distal tubule epithelial cells. *Wien Klin Wochenschr.* 1997 June; 109(12-13):429-34.

Mello-Aires M, Giebisch G, Malnic G. Kinetics of potassium transport across single distal tubules of rat kidney. *J Physiol.* 1973 July; 232(1):47-70.

Matsubara H, Sugaya T, Murasawa S, Nozawa Y, Mori Y, Masaki H, et al. Tissue-specific expression of human angiotensin II AT1 and AT2 receptors and cellular localization of subtype mRNAs in adult human renal cortex using in situ hybridization. *Nephron*. 1998 Sept.; 80(1):25-34.

Meister B, Lippoldt A, Bunnemann B, Inagami T, Ganten D, Fuxe K. Cellular expression of angiotensin type-1 receptor mRNA in the kidney. *Kidney Int*. 1993 Aug.; 44(2):331-6.

Merot J, Bidet M, Le Maout S, Tauc M, Poujeol P. Two types of K⁺ channels in the apical membrane of rabbit proximal tubule in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1989 Jan.; 978(1):134-44.

Moe OW, Ujiie K, Star RA, Miller RT, Widell J, Alpern RJ, et al. Renin expression in renal proximal tubule. *J Clin Invest*. 1993 Mar.; 91(3):774-9.

Molony DA, Reeves WB, Andreoli TE. Na⁺:K⁺:2Cl⁻ cotransport and the thick ascending limb. *Kidney Int*. 1989 Sept.; 36(3):418-26.

Morduchowicz GA, Sheikh-Hamad D, Dwyer BE, Stern N, Jo OD, Yanagawa N. Angiotensin II directly increases rabbit renal brush-border membrane sodium transport: presence of local signal transduction system. *J Membr Biol*. 1991 May; 122(1):43-53.

Musa-Aziz R, Oliveira-Souza M, Mello-Aires M. Signaling pathways in the biphasic effect of ANG II on Na⁺/H⁺ exchanger in T84 cells. *J Membr Biol*. 2005 May; 205(2):49-60.

Muto S, Giebisch G, Sansom S. An acute increase of peritubular K stimulates K transport through cell pathways of CCT. *Am J Physiol*. 1988; 255:108-14.

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci*. 1995 Nov.; 92(23):10663-7.

Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, et al. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* 1993 Sept.; 365(6442):166-70.

Nascimento-Gomes G, Mello-Aires M. Interaction of atrial natriuretic factor and angiotensin II in proximal HCO₃⁻ reabsorption. *Am. J. Physiol*. 1992; 262:303-8.

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Wang CT, Cervenka L, Mitchell KD. Concentrations and actions of intraluminal angiotensin II. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jan.; 10(Suppl 11):S189-95.

Neher E, Sakman B. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 1976; 260:779-802.

Negishi M, Ito S, Hayaishi O. Prostaglandin E receptors in bovine adrenal medulla are coupled to adenylate cyclase via Gi and to phosphoinositide metabolism in a pertussis toxin-insensitive manner. *J Biol Chem.* 1989 Mar.; 264(7):3916-23.

Nicolisky BP. Theory of the glass electrode I. *Acta Physicochim.* 1937; 7:597.

Oberleithner H, Guggino W, Giebisch G. The effect of furosemide on luminal sodium, chloride and potassium transport in the early distal tubule of *Amphiuma* kidney. Effects of potassium adaptation. *Pflugers Arch.* 1983 Jan.; 396(1):27-33.

Okusa MD, Velásquez H, Ellison DH, Wright FS Luminal calcium regulates potassium transport by the renal distal tubule. *Am J Physiol.* 1990 Feb.; 258 (2):423-8.

Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension.* 1997 Nov.; 30(5):1238-46.

Padia SH, Howell NL, Siragy HM, Carey RM. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. *Hypertension* 2006 Mar.; 47(3):537-44.

Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Siragy HM, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, et al. Intrarenal aminopeptidase N inhibition augments natriuretic responses to angiotensin III in angiotensin type 1 receptor-blocked rats. *Hypertension* 2007 Mar.; 49(3):625-30.

Palmer LG, Frindt G. Effects of Cell Ca and pH on Na channels from rat cortical collecting tubule. *Am J Physiol.* 1987; 253(22):333-9.

Palmer LG, Sackin, H. Regulation of renal ion channels. *FASEB J.* 1988; 2:3061-5.

Palmer LG, Antonian L, Frindt G. Regulation of apical K and Na channels and Na/K pumps in rat cortical collecting tubule by dietary K. *J Gen Physiol.* 1994 Oct.; 104(4):693-710.

Palmer LG, Choe H, Frindt G. Is the secretory K channel in the rat CCT ROMK? *Am J Physiol.* 1997 Sept.; 273(3):404-10.

Paxton WG, Runge M, Horaist C, Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. *Am J Physiol.* 1993 June; 264(6):989-95.

Prieto-Carrasquero MC, Kobori H, Ozawa Y, Gutiérrez A, Seth D, Navar LG. AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Sept.; 289(3):632-7.

Quan A, Baum M. Endogenous angiotensin II modulates rat proximal tubule transport with acute changes in extracellular volume. *Am. J. Physiol.* 1998; 275:74-8.

Ray PE, Suga S, Liu XH, Huang X, Johnson RJ. Chronic potassium depletion induces renal injury, salt sensitivity, and hypertension in young rats. *Kidney Int.* 2001 May; 59(5):1850-8.

Regan JW, Bailey TJ, Donello JE, Pierce KL, Pepperl DJ, Zhang D, et al. Molecular cloning and expression of human EP3 receptors: evidence of three variants with differing carboxyl termini. *Br J Pharmacol.* 1994 June; 112(2):377-85.

Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, et al. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol.* 1994 Aug.; 46(2):213-20.

Rodriguez MG, Reyes JL. Induction of alkalization in cultured renal cells (MDCK line) by prostaglandin E2. *Prostaglandins.* 1995 Feb.; 49(2):79-91.

Rupérez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egidio J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* 2003 Sept.; 108(12):1499-505.

Rusch NJ, Stekiel, W.J. Ionic channels of vascular smooth muscle in hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 308:1-7.

Sackin, H. Mechanosensitive channels. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; 57:333-53.

Sah P. Properties of channels mediating the apamin-insensitive afterhyperpolarization in vagal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 1995; 74:1772-6.

Saikaley A, Bichet D, Kucharczyk J, Peterson LN. Neuroendocrine factors mediating polydipsia induced by dietary Na, Cl, and K depletion. *Am J Physiol.* 1986 Dec.; 251(6):1071-7.

Salomone LJ, Howell NL, McGrath HE, Kemp BA, Keller SR, Gildea JJ, et al. Intrarenal dopamine D1-like receptor stimulation induces natriuresis via an angiotensin type-2 receptor mechanism. *Hypertension* 2007 Jan.; 49(1):155-61.

Santos CF, Caprio MA, Oliveira EB, Salgado MC, Schippers DN, Munzenmaier DH, et al. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Aug.; 285(2):H775-83.

Santos RA, Ferreira AJ. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006 Fall-Winter; 24(3-4):239-46.

Sakairi Y, Jacobson HR, Noland TD, Breyer MD. Luminal prostaglandin E receptors regulate salt and water transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol.* 1995 Aug.; 269(2):257-65.

Schafer JA, Troutman SL, Schlatter E. Vasopressin and mineralocorticoid increase apical membrane driving force for K⁺ secretion in rat CCD. *Am J Physiol.* 1990 Jan.; 258(1):199-210.

Schiffrin EL. Vascular changes in hypertension in response to drug treatment: Effects of angiotensin receptor blockers. *Can J Cardiol.* 2002 May; 18(Suppl A):15A-18A.

Schlatter E, Schafer JA. Electrophysiological studies in principal cells of rat cortical collecting tubules. ADH increases the apical membranes Na⁺ conductance. *Pflügers Arch.* 1987; 409:81-92.

Schmidt A, Gruber U, Böhmig G, Köller E, Mayer G. The effect of ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist therapy on serum uric acid levels and potassium homeostasis in hypertensive renal transplant recipients treated with CsA. *Nephrol Dial Transplant.* 2001 May; 16(5):1034-7.

Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdös EG. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest.* 1988 Dec.; 59(6):789-97.

Sealey JE, Clark I, Bull MB, Laragh JH. Potassium balance and the control of renin secretion. *J Clin Invest.* 1970 Nov.; 49(11):2119-27.

Seikaly MG, Arant BS JR, Seney FD JR. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest.* 1990 Oct.; 86(4):1352-7.

Shayman JA, Morrison AR. Bradykinin-induced changes in phosphatidyl inositol turnover in cultured rabbit papillary collecting duct cells. *J. Clin. Invest.* 1985; 76:978-84.

Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, Stock G. Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol.* 1992; 311:53-72.

Silverstein RL, Fenves AZ, Ram CV. ARBs and target organ protection. Exploring benefits beyond their antihypertensive effects. *Postgrad Med.* 2004 Aug.; 116(2):31-8.

Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest.* 1996 Apr.; 97(8):1978-82.

Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 1997 July; 100(2):264-9.

Smith W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J.* 1989; 259:315-24.

Smith RD, Chiu AT, Wong PC, Herblin WF, Timmermans PB. Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1992; 32:135-65.

Sonnenburg WK, Smith WL. Regulation of cyclic AMP metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. *J Biol Chem.* 1988 May 5; 263(13):6155-60.

Sonnenburg WK, Zhu JH, Smith WL. A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J Biol Chem.* 1990 May; 265(15):8479-83.

Stanton BA, Giebisch G. Potassium transport by the renal distal tubule: effects of potassium loading. *Am. J. Physiol.* 1982; 243:487-93.

Stanton BA, Giebisch G. Renal potassium transport. In: *Handbook of physiology-renal physiology.* New York: Oxford University Press; 1992. p.813-74.

Sterling H, Lin DH, Chen YJ, Wei Y, Wang ZJ, Lai J, et al. PKC expression is regulated by dietary K intake and mediates internalization of SK channels in the CCD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 June; 286(6):1072-8.

Strange K. Volume regulation following Na⁺ pump inhibition in CCT principal cells: apical K⁺ loss. *Am J Physiol.* 1990; 258:732-40.

Strong P, Coleman RA, Humphrey PP. Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors. *Prostaglandins* 1992 Jun2; 43(6):559-66.

Suga S, Mazzali M, Ray PE, Kang DH, Johnson RJ. Angiotensin II Type 1 receptor blockade ameliorates tubulointerstitial injury induced by chronic potassium deficiency. *Kidney Int.* 2002 Mar.; 61(3):951-8.

Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, et al. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem.* 1992 Apr.; 267(10):6463-6.

Sugimoto Y, Negishi M, Hayashi Y, Namba T, Honda A, Watabe A, et al. Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins. *J Biol Chem.* 1993 Feb.; 268(4):2712-8.

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 June; 35(6):881-900.

Takeuchi K, Abe T, Takahashi N, ABE K. Molecular cloning and intrarenal localization of rat prostaglandin E2 receptor EP3 subtype. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 July; 194(2):885-91.

Teitelbaum, I. Hormone signaling systems in inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1992; 263:985-90.

Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F. PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int.* 1993 June; 43(6):1251-9.

Thekkumkara TJ, Cookson R, Linas SL. Angiotensin (AT1A) receptor-mediated increases in transcellular sodium transport in proximal tubule cells. *Am J Physiol.* 1998 May; 274(5):897-905.

Toh H, Ichikawa A, Narumiya S. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett.* 1995 Mar.; 361(1):17-21.

Tsuzuki S, Eguchi S, Inagami T. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT2) receptor in R3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Nov.; 228(3):825-30.

Tomita K, Pisano JJ, Knepper MA. Control of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct of the rat. Effects of bradykinin, vasopressin, and deoxycorticosterone. *J Clin Invest.* 1985 July; 76(1):132-6.

Toussante C, Vereerstraaeten Effects of blood pH changes on potassium excretion in the dog. *Am. J. Physiol.* 1962; 202:768-72.

Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003 Nov.; 30(11):860-6.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002 Dec.; 420(6917):853-9.

Turner AJ, Tipnis SR, Guy JL, Rice G, Hooper NM. ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallopeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002 Apr.; 80(4):346-53.

Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem.* 1990 Dec.; 265(36):22348-57. Erratum in: *J Biol Chem.* 1991 June; 266(18):12114.

Vallés P, Ebner S, Manucha W, Gutierrez L, Marin-Grez M. Effect of glandular kallikrein on distal nephron HCO₃⁻ secretion in rats and on HCO₃⁻ secretion in MDCK cells. *Am J Physiol.* 1997 Nov.; 273(5):807-16.

- Velázquez H, Ellison DH, Wright FS. Luminal influences on potassium secretion: chloride, sodium, and thiazide diuretics. *Am J Physiol.* 1992 June; 262(6):1076-82.
- Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol.* 1998 June; 8(3):321-9.
- Vestri S, Malnic, G. Mechanism of potassium transport across proximal tubule epithelium in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 1990; 23:1195-9.
- Volk KA, Husted RF, Pruchno CJ, Stokes JB. Functional and molecular evidence for Shaker-like K⁺ channels in rabbit renal papillary epithelial cell line. *Am J Physiol.* 1994 Oct.; 267(4):671-8.
- Voors AA, Pinto YM, Buikema H, Urata H, Oosterga M, Rooks G, et al. Dual pathway for angiotensin II formation in human internal mammary arteries. *Br J Pharmacol.* 1998 Nov.; 125(5):1028-32.
- Vos PF, Boer P, Koomans HA. Effects of enalapril on renal sodium handling in healthy subjects on low, intermediate, and high sodium intake. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993 July; 22(1):27-32.
- Xie MH, Liu FY, Wong PC, Timmermans PB, Cogan MG. Proximal nephron and renal effects of DuP 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Kidney Int.* 1990 Sept.; 38(3):473-9.
- Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski MJ, Eessalu TE, Hebert SC. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am J Physiol.* 1997 Nov.; 273(5):739-48.
- Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, Van Gilst WH. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol.* 2002 Dec.; 18(12):1331-9.
- Wang T, Giebisch, G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol.* 1996; 271:143-9.
- Wang W. View of K⁺ secretion through the apical K channel of cortical collecting duct. *Kidney Int.* 1995; 48:1024-30.
- Wang WH, Schwab A, Giebisch G. Regulation of small-conductance K⁺ channel in apical membrane of rat cortical collecting tubule. *Am J Physiol.* 1990 Sept.; 259(3):494-502.

Wang W, Cassola AC, Giebisch G. Arachdonic acid inhibits the secretory K⁺ channel of cortical collecting duct of rat kidney. *Am J Physiol.* 1992; 262:554-9.

Wang W, Sackin H, Giebisch G. Renal potassium channels and their regulation. *Annu Rev Physiol.* 1992; 54:81-96.

Wang W. Two types of K⁺ channel in thick ascending limb of rat kidney. *Am J Physiol.*, 1994; 267(36):599-605.

Wang WH, Lu M, Hebert SC. Cytochrome P-450 metabolites mediate extracellular Ca²⁺-induced inhibition of apical K⁺ channels in the TAL. *Am J Physiol.* 1996 July; 271(1):C103-11.

Wang W, Lu M. Effect of arachidonic acid on activity of the apical K channel in the thick ascending limb of the rat kidney. *J Gen Physiol.* 1995; 106:727-43.

Wang W, Lerea KM, Chan M, Giebisch G. Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jan.; 278(1):165-71.

Wang WH, Giebisch G. Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch.* 2009 May; 458(1):157-68.

Wang ZJ, Sun P, Xing W, Pan C, Lin DH, Wang WH. Decrease in dietary K intake stimulates the generation of superoxide anions in the kidney and inhibits K secretory channels in the CCD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 June; 298(6):1515-22.

Watanabe T, Umegaki K, Smith WL. Association of a solubilized prostaglandin E₂ receptor from renal medulla with a pertussis toxin-reactive guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem.* 1986 Oct.; 261(29):13430-7.

Wei Y, Bloom P, Lin D, Gu R, Wang WH. Effect of dietary K intake on apical small-conductance K channel in CCD: role of protein tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Aug.; 281(2):206-12.

Wingo, C.S. Active proton secretion and potassium absorption in the rabbit outer medullary collecting duct. *J Clin Invest.* 1990; 84:361-65.

Wright FS, Giebisch G. Regulation of potassium secretion. In: *The kidney: physiology and pathophysiology.* 2.ed. New York: Raven; 1992. p.2209-47.

Wright FS, McDougal WS. Potassium-specific ion exchanger microelectrodes to measure K⁺ activity in the renal distal tubule. *Yale J Biol Med.* 1972; 45:373-83.

Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. The angiotensin IV system: functional implications. *Neuroendocrinol.* 1995 Jan.; 16(1):23-52.

Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol.* 1998 Mar.; 274(3):481-9.

Zeidel ML. Hormonal regulation of inner medullary collecting duct sodium transport. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1993; 265(34):159-73.

Zeng WZ, Li XJ, Hilgemann DW, Huang CL. Protein kinase C inhibits ROMK1 channel activity via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2003 May; 278(19):16852-6.

Zusman RM, Keiser HR. Regulation of prostaglandin E₂ synthesis by angiotensin II, potassium, osmolality, and dexamethazone. *Kidney Int.* 1980; 17:277-83.

Anexo 1 – Comprovante do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia
de São José dos Campos-UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

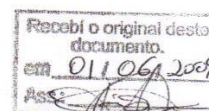
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / algotti@fosjc.unesp.br / Guedes@fosjc.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **13/2009-PA/CEP**,
sobre **“Efeito da angiotensina II, sobre a secreção de potássio em
segmento final do nefro”** sob responsabilidade de **JOSÉ BENEDITO
OLIVEIRA AMORIM**, está de acordo com os Princípios Éticos na
Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de
Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa.

São José dos Campos, 20 de maio de 2009

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora



Amorim JBO. Effect of luminal Angiotensin on potassium secretion by distal tubule of rat kidney [Tesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2010

ABSTRACT

The effect of luminal ANGII on K⁺ secretion by late distal tubule (connecting segment and initial cortical collecting duct) was studied using “in vivo” stationary microperfusion and K-sensitive microelectrode techniques. Luminal perfusion of ANG II reduced Jk⁺ from a control value of 0.90±0.19 (n=12) nmol/cm².s to 0.51±0.05, n=9, (10⁻¹²M), 0.70±0.22, n=27 (10⁻¹¹M) and 0.63±0.08, n=12 (10⁻⁹M) nmol/cm².s (p<0.05 by paired t-test). However, high doses of ANGII (10⁻⁶M) had no significant effect on Jk⁺. Losartan 10⁻⁶M, a non-peptide AT1 receptor blocker, reverted the inhibitory effect of ANGII. To test the possibility that the PLA2/arachidonic acid/PGE2 pathway, which had been shown to inhibit other transport mechanisms, is involved in ANGII-mediated cellular signaling cascades, PGE2 was perfused luminally (Jk⁺ control = 0.93±0.08, n=12 nmol/cm².s; 10⁻⁹M PGE2, Jk⁺ = 0.55±0.05, n=12; 10⁻⁶M PGE2, Jk⁺ = 0.47±0.04), n=12; both doses reduced K⁺ secretion significantly (p<0.01). Perfusing with Indomethacin, an unspecific blocker of the PLA2/arachidonic acid/PGE2 path, (10⁻⁵M), plus ANG II (10⁻⁹M), JK⁺ increased to 0.95±0.12 (n=13) nmol.cm⁻².s⁻¹ compared to ANG II alone (Jk⁺ = 0.63±0.05, (n=13) nmol/cm².s, p<0.05). During luminal perfusion with Indomethacin alone, no significant effect on K⁺ secretion was seen (Jk⁺ control = 0.73±0.05 (n=10) nmol/cm².s, 10⁻⁶M INDO Jk⁺ = 0.63±0.07 (n=10), P>0.19. In conclusion, ANG II is able to regulate distal K⁺ secretion when applied to the tubule lumen, probably via AT1 receptors; it is suggested that the signalling path of the inhibitory effect of ANG II may involve PLA2/arachidonic acid/PGE2.

Key words: Microperfusion; Angiotensin; Distal Tubule; K⁺ Channel; Kidney.