

**Medidas e modelagem do transporte de água e  
osmorregulação em células renais individuais  
usando pinça óptica e videomicroscopia**

Aline Duarte Lúcio

Agosto de 2003

**Medidas e modelagem do transporte de água e osmorregulação em células renais individuais usando pinça óptica e videomicroscopia**

Aline Duarte Lúcio

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Tese apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, como requisito parcial para a obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS (Física).

# Agradecimentos

Ao professor Oscar que, além de um excelente orientador, foi amigo e pai em todas as horas. Agradeço por me dar a oportunidade de trabalhar em um excelente grupo e por acreditar em minha capacidade!!!

Ao Gilson, meu marido, e minha família, que independente de meu humor, estiveram sempre do meu lado. Em especial, agradeço minha mãe, que, por toda minha vida, foi o maior exemplo de garra, dedicação, amor e força que conheci.

Às minhas grandes amigas Simone e Cris, por compartilharem comigo todos os bons e maus momentos que vivemos desde o início da nossa graduação.

Aos meus amigos de laboratório Bira, Nathan, Coelho e Márcio pela paciência e pela colaboração que foram muito importantes para a elaboração desta tese.

A todos os meus companheiros do departamento de Física, professores, funcionários, estudantes pelos grandes momentos que passei neste departamento.

Aos companheiros do Laboratório de Hipertensão do ICB pelo suporte e parceria neste trabalho. Em especial, agradeço à Betinha, ao Robson e à Ana Paula (auxiliar de laboratório) por sempre estarem presentes quando eu precisei.

Às agências financiadoras, Fapemig e CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que contribuíram e torceram para o sucesso deste trabalho.

# Sumário

<b>RESUMO</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>PREFÁCIO</b>	<b>ix</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Fisiologia Renal</b>	<b>7</b>
2.1 Estrutura do Rim . . . . .	9
2.2 Formação da Urina . . . . .	10
2.2.1 Regulação do volume de água . . . . .	12
2.3 O Sistema Renina-Angiotensina-Aldesterona . . . . .	13
2.4 Fator Atrial Natriurético . . . . .	14
2.5 O Hormônio Antidiurético . . . . .	14
<b>3 Aspectos fisiológicos da célula MDCK</b>	<b>16</b>
3.1 Origem da linhagem das células MDCK . . . . .	16
3.2 Morfologia das células do tipo MDCK . . . . .	17
3.3 Aquaporinas . . . . .	18
3.4 Mecanismo de regulação da AQP2 . . . . .	20

3.5	Regulação do volume celular em células do tipo MDCK . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Modelo para transporte de água através de membranas celulares</b>	<b>24</b>
4.1	Modelo de transporte de água com regulação do volume celular (RVI)	24
4.2	Cálculo do número de canais na membrana . . . . .	32
<b>5</b>	<b>Técnicas Experimentais</b>	<b>36</b>
5.1	Pinça óptica . . . . .	36
5.2	Câmara de Fluxo . . . . .	38
5.3	Montagem Experimental com Pinça-óptica . . . . .	39
<b>6</b>	<b>Material e método de cultura celular</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>Protocolo de medida</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Aquisição e análise de imagem</b>	<b>45</b>
<b>9</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>47</b>
9.1	Células do tipo MDCK submetidas a choque hiperosmótico sem adição do hormônio antidiurético (ADH) . . . . .	47
9.2	Células do tipo MDCK submetidas a um choque hiperosmótico com adição do hormônio antidiurético (ADH) . . . . .	49
<b>10</b>	<b>Conclusão</b>	<b>52</b>

# Lista de Figuras

2.1	Sistema excretor de mamíferos. [1] . . . . .	8
2.2	Estrutura renal (esquerda) e de um néfron (direita). [2] . . . . .	10
2.3	Esquema do funcionamento de um néfron . . . . .	10
3.1	Representação esquemática de uma monocamada de células do tipo MDCK crescidas em um substrato. Podemos observar os lados apical e baso-lateral destas células, bem como os pontos de ligação entre as células ( <i>tight junctions</i> ). . . . .	17
3.2	Representação esquemática da posição de uma aquaporina, do tipo AQP-1 em relação à membrana na qual ela esteja inserida. . . . .	18
3.3	Esquema de ação do ADH numa célula epitelial. O ADH liga-se ao receptor V2, localizado na membrana basolateral, ativando uma reação em cadeia (ver detalhes no texto) que resulta na inserção de canais de água do tipo AQP-2 na membrana apical da célula. . . . .	21
4.1	Curva teórica da evolução temporal de $V/V_0$ . Para construirmos esta curva, utilizamos os seguintes valores para os parâmetros das equações 4.38, 4.39, 4.40 e 4.41: $A = 1$ ; $B = 0.95$ ; $\tau_1 = 30s$ e $\tau_2 = 120s$ , respectivamente. . . . .	32

4.2	Seção transversal e longitudinal de um canal mostrando o perfil da velocidade do fluido em seu interior. . . . .	33
5.1	Esquema das forças da pinça óptica . . . . .	37
5.2	Esquema da câmara de fluxo com detalhes de seu interior . . . . .	38
5.3	Esquema de nossa montagem experimental . . . . .	40
8.1	Imagens obtidas através de uma câmera CCD da célula MDCK pinçada quando esta estava sendo banhada por a) meio isoosmótico e b) meio hiperosmótico. . . . .	45
9.1	Evolução temporal do volume normalizado da célula MDCK da Fig.8.1, após choque hiperosmótico de 300 mOsm para 500 mOsm. Os círculos são os pontos experimentais e a curva contínua é o ajuste usando a equação 4.37. Com o ajuste desta curva obtivemos os seguintes parâmetros $P = 6.6\mu m/s$ , $\alpha = 8.5 \times 10^{-10} mol/s.cm^2$ , $V_R/V_0 = 0.95$ e $b/V_0 = 0.52$ . . . . .	47
9.2	Evolução temporal do volume normalizado de uma célula MDCK após um choque hiperosmótico de 300 mOsm a 500 mOsm: os losângulos representam os dados relativos às medidas realizadas com concentração de 18nM, os círculos para concentração de 36 nM e triângulos para 54 nM de ADH. As curvas contínuas foram ajustadas utilizando a Eq. 4.37 . . . . .	50

# Resumo

Transporte de água é um processo essencial em qualquer célula. Nós desenvolvemos uma técnica que nos permite medir transporte de água em células únicas isoladas sujeita a um choque osmótico, usando pinça óptica e videomicroscopia. Em nossos experimentos, estamos utilizando células epiteliais renais do tipo MDCK. O uso da pinça óptica juntamente com a videomicroscopia nos permite obter uma medida direta da variação do volume celular em função do tempo, e podemos observar claramente a saída de água da célula devido ao choque hiperosmótico e a subsequente entrada de água na célula devido à processos de regulação do volume celular, sem a interação com outras células ou com o substrato. Como na literatura não encontramos modelos de transporte de água em células onde se leva em conta os mecanismos de regulação de volume, nós propomos neste trabalho um modelo fenomenológico de transporte de água onde se leva em conta a regulação de volume e que ajusta muito bem nossas observações experimentais. De nosso modelo, duas escalas de tempo aparecem naturalmente: um tempo curto relativo ao transporte de água e um tempo longo relativo ao transporte de soluto para regiões osmoticamente ativas que é responsável pela regulação do volume celular. Além disto, em



nossos experimentos, além de obtermos a permeabilidade celular à água, obtivemos também a taxa de fluxo de soluto para a regulação do volume celular e o volume regulatório (volume atingido pela célula após a regulação), parâmetros estes que não foram medidos antes e que parecem ser importantes para a análise do efeito de hormônios e drogas nas células, como foi evidenciado por nossos experimentos com a adição do hormônio antidiurético ou arginina-vasopressina.

# Abstract

Water transport is an essential process in any cell. We developed a technique that allows us to measure water transport in a single isolated cell under osmotic shock, using optical tweezers and videomicroscopy. We use a well-studied kidney cell (MDCK) for the experiments. The use of optical tweezers together with videomicroscopy allowed us to directly measure cell volume variation as a function of time, and clearly observe the outflow of water due to osmotic up-shock and the subsequent inflow of water due to regulation processes, without the interaction with other cells or substratum. Since in the literature there is no model of water transport in cells that takes into account cellular volume regulation, we propose in this work a phenomenological model of transport that takes volume regulation into account and that fits very well our experimental observations. From our model, two time scales appear naturally: a fast one related to transport of water and a slow one related to transport of solutes towards osmotically active regions that is responsible for cellular volume regulation. Therefore, in our experiments we are able to obtain in addition to water permeability, the solute influx rate for cellular volume regulation and the regulatory volume (cell volume after regulation), parameters not measured before

and that seem important to properly analyze the effects of hormones and drugs on cells, as evidenced by our measurements with the addition of the anti-diuretic hormone or arginine-vasopressin.

# Prefácio

No início de nosso Doutorado, decidimos trabalhar direcionados ao estudo de canais responsáveis pelo transporte de íons e outras substâncias através de membranas celulares. Passamos então algumas semanas no Departamento de Neurociência da FUNREI, sob a supervisão do Prof. Antônio Carlos Guimarães de Almeida, onde aprendemos a técnica de "Patch Clamp", largamente utilizada em estudos de canais de íons. Porém, por motivos alheios a nossa vontade, não pudemos introduzir a técnica de "Patch Clamp" no nosso laboratório, em tempo hábil.

Nesta mesma época, a técnica de pinçamento-óptico e video-microscopia já estava sendo implementada em nosso laboratório. Como veremos neste trabalho, esta técnica já vem sendo empregada em estudos biológicos. Por isto, imaginamos que ela poderia ser de grande potencial para estudos envolvendo sistemas biológicos tais como células, organelas, vírus ou bactérias. Começamos então uma pesquisa de campo para encontrarmos uma linha de pesquisa que apresentasse um desafio científico interessante e que pudesse ser investigada com nossas técnicas. Optamos por trabalhar em cooperação com o Prof. Robson Augusto S. dos Santos (que tornou-se nosso co-orientador) do laboratório de Hipertensão do Depto de Fisiologia

e Biofísica do ICB. O Prof. Robson nos propôs o estudo do transporte de água por uma única célula renal, já que com a pinça-óptica e vídeo-microscopia poderíamos efetuar tais estudos. Iniciamos então o estudo do transporte de água em células do tipo LLC-MK2. Estas células eram cultivadas pela Prof.a Maria de Fátima Leite. Porém, apesar dos bons resultados que vínhamos obtendo, a Prof. Fátima necessitou se afastar deste projeto. Além da necessidade de mudarmos o tipo de célula estudada, tivemos que aprender, com detalhes, o processo de cultura celular. Após um novo período de aprendizagem feito no laboratório de Farmacologia de Drogas Antitumorais do Depto de Farmacologia do ICB sob a supervisão da Prof. Miriam Teresa P. Lopes, fomos capazes de reestruturar o laboratório de cultura celular do Lab. de Hipertensão, com o apoio e supervisão constante do Prof. Robson. A partir de então, recomeçamos nosso trabalho totalmente independente em relação à cultura celular que nos é essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

É importante deixar claro que este trabalho só foi possível devido à colaboração entre o Laboratório de Física Estatística do Departamento de Física e do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica da ICB. Este tipo de colaboração vem sendo realizado por outros grupos, deste e de outros departamentos na UFMG, trazendo grandes resultados para o avanço científico de nossa comunidade. Por isto, achamos importante que estes trabalhos interdisciplinares continuem sendo implementados e incentivados.

# Capítulo 1

## Introdução

Os organismos biológicos basicamente mantêm-se vivos através de sua capacidade de manter o equilíbrio interno, adaptando-se às variações do meio ambiente (homeostase). Isto é possível pois o organismo possui mecanismos de regulação que mantêm as propriedades do fluido extracelular em condições adequadas, de forma que as células sejam capazes de realizar suas funções fisiológicas corretamente.

As células possuem um envólucro, o qual separa o interior celular do ambiente extracelular, conhecido como membrana plasmática. Esta membrana é formada por uma bicamada lipoproteica que tem como função reter, no interior da célula, os componentes vitais para o funcionamento celular e regular a entrada e saída de substâncias da célula, tais como íons e outros solutos, através de moléculas transportadoras que estão estrategicamente posicionadas na membrana celular.

Além disto, para que haja o equilíbrio osmótico, é necessária a regulação da permeabilidade da membrana à água. A maioria das células permitem a passagem de água de forma livre através da membrana (permeabilidade basal), assegurando o equilíbrio osmótico. Porém, existem algumas células que regulam a osmolaridade em seu interior, controlando o fluxo de água através da membrana, fazendo com que este

fluxo seja mais rápido ou mais lento. Nestes casos, o fluxo de água ocorre através de proteínas conhecidas como aquaporinas [3–5]. Nestes casos, a permeabilidade da membrana à água pode variar de níveis basais da ordem de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  cm/s, a altos valores da ordem de  $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  cm/s) [6].

Em condições fisiológicas normais, uma das propriedades mais básicas das células vivas é sua habilidade de manter um tamanho ideal durante suas atividades. Por isto, as células tentam minimizar o máximo as alterações nas concentrações de íons solúveis, entre outras substâncias. Assim, a tendência que as células tem de inchar-se como um resultado da pressão osmótica criada por macromoléculas intracelulares é constantemente controlada pelo funcionamento de bombas iônicas que contrabalança o "vazamento" passivo de íons. Em adição, muitas células possuem a capacidade de controlar a perturbação no volume celular através de processos regulatórios de volume. O processo no qual as células tendem a reduzir seus volumes para os valores originais através da perda de soluto juntamente com a perda de água é conhecido como decréscimo do volume regulatório (RVD). Já, o aumento do volume regulatório (RVI) ocorre naquelas células capazes de aumentar seu volume celular para aquele adequado, através da entrada de solutos e conseqüentemente, de água, na célula. Células epiteliais em geral e células renais em particular sofrem uma contínua entrada de solutos que deve ser controlada pelo bombeamento de solutos para controle da concentração iônica intracelular bem como do volume celular. Qualquer alteração na taxa de entrada de solutos deve ser rapidamente controlada pela mudança na eliminação daquele soluto, senão, como resultado, a célula poderá aumentar ou diminuir de volume. Desta forma, tanto para as células renais, como para outras células, a regulação de volume é vital para a sobrevivência celular; sem esta regulação, os gradientes para transporte, a concentração de substratos, a tensão

das membranas celulares, etc, estariam comprometidos. [7–12]

O objetivo principal deste trabalho é o estudo do transporte de água através da membrana plasmática de células renais do tipo MDCK submetidas a um choque hiperosmótico, devido à variação osmótica do meio extracelular.

Para podermos atacar tal problema, desenvolvemos então uma técnica de medida, onde utilizamos uma pinça óptica que consiste de um feixe de laser de infravermelho focalizado por uma objetiva de alta abertura numérica (N.A. = 1.4) que é capaz de aprisionar pequenas partículas dielétricas próximas de seu foco [13–15]. Com esta pinça-óptica instalada em nosso microscópio nós fomos capazes de prender uma única célula renal do tipo MDCK e pudemos mantê-la suspensa em seu meio sem tocar a lâmina ou outras células.

Como o aprisionamento óptico mantém a célula no formato esférico, podemos obter informações sobre a permeabilidade de água através de medidas diretas do volume celular em função do tempo de uma célula renal do tipo MDCK (Madin Darby Canine Kidney) usando um sistema de videomicroscopia com análise digital de imagem. Submetemos esta célula a um choque hiperosmótico de aproximadamente 200mOsm (da concentração ideal de 300 mOsm para 500 mOsm) e gravamos o processo em vídeo. Durante este processo a célula inicialmente diminui de volume, perdendo água para o meio extracelular, devido ao choque hiperosmótico e depois há uma reentrada de água, devido ao processo de RVI, onde a célula incha novamente, até alcançar um novo volume conhecido como volume regulatório [7,9–11].

Para determinar quantitativamente a permeabilidade à água da membrana plasmática de células renais (entre outras células), vários modelos matemáticos e diferentes técnicas vêm sendo recentemente desenvolvidos [16–20]. A idéia principal da maioria destes experimentos é submeter camadas de células ou tecidos a um



choque hiper ou hipoosmótico e medir a variação do volume celular em função do tempo. Os autores utilizam então um modelo simples, desenvolvido por Farinas et al. [16], para ajustar as curvas e obter a permeabilidade. A principal diferença entre as várias técnicas empregadas é como a mudança do volume celular em função do tempo é medida. As técnicas mais empregadas são interferência de luz, fluorescência e outras técnicas ópticas onde considerações sobre o formato aproximado da célula têm sido feitas para obtenção da variação do volume celular [7, 9, 16–22].

Nossos dados não podem ser ajustados pelos modelos que vêm sendo utilizados até agora, já que estes modelos somente leva em conta o transporte osmótico passivo de água. Vemos claramente em nossos dados que além deste transporte passivo, há uma fase subsequente onde, devido à regulação do volume celular, há uma reentrada de água na célula. Este modelo utilizado na literatura prediz apenas uma função exponencial de decaimento simples, para a variação do volume em função do tempo, o que é incompatível com nossos dados experimentais, onde observamos duas exponenciais relacionadas com os dois processos descritos acima.

Estudos eletrofisiológicos de células do tipo MDCK depois de um choque hiperosmótico têm sido realizados com o intuito de identificar os mecanismos responsáveis pelo RVI [10, 11, 23]. Um choque hiperosmótico em células MDCK leva a um aumento na seletividade da membrana celular ao íon  $K^+$  e paralelamente a um decréscimo na condutividade da membrana envolvendo a condutância de íons  $K^+$  e  $Cl^-$ . A redução da condutividade da membrana celular tende a reduzir a perda de íons e explicaria o RVI. Entretanto, o acúmulo de íons requerido pelo RVI não pode ser obtido apenas pela inibição da condução de íons mas envolve mecanismos que aumentem a osmolaridade da célula [10]. Outros estudos mais recentes vem sendo realizados, mas o conjunto completo de mecanismos microscópicos para explicar o

RVI em células MDCK ainda não foi estabelecido.

Neste trabalho estamos propondo um modelo fenomenológico simplificado onde todos os mecanismos para RVI são agrupados em uma única constante que introduz uma nova escala de tempo no problema. Nosso modelo ajusta muito bem nossos dados experimentais e, além da permeabilidade à água, nós pudemos obter outros parâmetros relacionados com o RVI em nossas células. Nos parece que este pode ser um bom caminho para caracterizar quantitativamente o RVI em nosso sistema e poderá ser útil para o estudo dos principais mecanismos microscópicos envolvidos.

Realizamos medidas também utilizando um hormônio conhecido como hormônio antidiurético (ADH) ou arginina-vasopressina (AVP), que possui como uma de suas funções, aumentar a permeabilidade à água de certos tipo de células [6, 24–27]. Observamos que a adição deste hormônio, além de aumentar a permeabilidade à água de nossas células, afetou o volume regulatório. Nossos dados leva-nos a crer que a presença deste hormônio no meio onde se encontra as células é capaz de interferir nos mecanismos relacionados com o processo de regulação do volume celular.

No próximo capítulo (Cap. 2) apresentamos um resumo da fisiologia renal básica, onde introduziremos alguns conceitos importantes para o entendimento deste trabalho. No capítulo 3, introduziremos os aspectos fisiológicos relacionados especificamente às células do tipo MDCK, que são o objeto de estudo deste trabalho. Nesse capítulo apresentaremos também a função das aquaporinas, a função renal do ADH e os mecanismos envolvidos na regulação do volume celular. À seguir, no capítulo 4, discutimos nosso modelo para o transporte de água e RVI na célula. No capítulo 5, apresentamos as técnicas experimentais aplicadas em nossos projetos (pinça óptica, câmara de fluxo e montagem experimental). No capítulo posterior,

capítulo 6, apresentamos os materiais biológicos e o método de cultura celular a partir dos quais obtivemos as amostras para nossos experimentos. O protocolo de medida é apresentado no capítulo 7 e a aquisição e análise de imagem no capítulo 8. Apresentamos então os resultados e discussões no capítulo 9 e finalmente as conclusões no capítulo 10.

# Capítulo 2

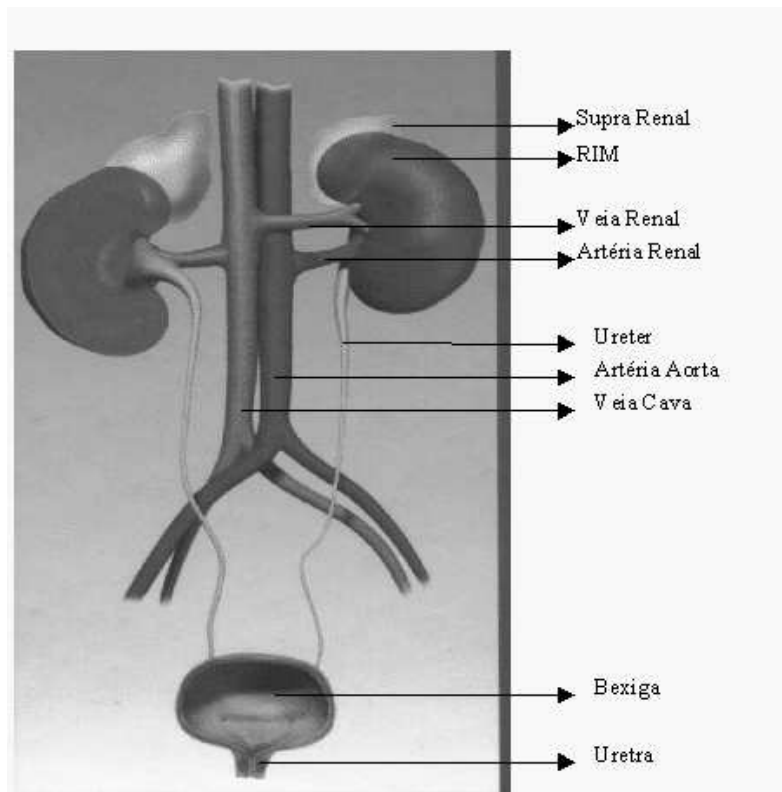
## Fisiologia Renal

Em nossos experimentos utilizamos células do tipo MDCK (suas características e funções serão descritas no próximo capítulo). Estas células foram primariamente extraídas do rim de cachorro [28]. Estamos interessados no transporte de água por estas células. Faremos neste capítulo um breve resumo da fisiologia renal, onde pretendemos descrever a anatomia dos rins e a formação da urina, bem como pretendemos mostrar como certas substância podem interferir na formação da urina [29–31].

O estudo detalhado da função do rim iniciou-se antes da Segunda Guerra Mundial. A teoria de filtração-reabsorção, formulada por Cushny, baseada nos estudos realizados por Ludwig foi o ponto de partida para os estudos subsequentes sobre a formação da urina. Estes estudos demonstraram que três processos (filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular), mediavam a excreção urinária de água e eletrólitos. [31]

Nosso sistema urinário é formado por dois rins, dois ureteres, uma bexiga e uma uretra (Fig. 2.1).

Os rins funcionam como principal órgão excretor do corpo removendo resíduos orgânicos do sangue e os eliminando por meio da urina, líquido composto, na sua



**Figura 2.1:** Sistema excretor de mamíferos. [1]

maioria, por água. E, dessa forma, eles atuam também na regulação do volume de água do corpo. Devido a essa função, seja qual for a quantidade de líquidos ingeridos, o volume de água mantém-se relativamente constante - cerca de 60% da massa de um adulto magro.

A função renal é regulada por substâncias, secretadas por células de diversos órgãos, conhecidas como hormônios. O valor normal da Osmolalidade Plasmática (Posm) é cerca de 287mOsm. Usualmente, esse nível é mantido dentro de limites estreitos, pois aumentos de apenas 1 a 2% da Posm são sentidas por células receptoras hipotalâmicas (localizadas no cérebro), iniciando uma cascata de reações que atuam de duas maneiras: deflagrando a sede, aumentando a ingestão de água, e au-

mentando a secreção do Hormônio Antidiurético ou Arginina-Vasopressina (ADH ou AVP), diminuindo a excreção renal de água. O aumento do volume plasmático (hipervolemia) acarretará o aumento da secreção do Fator Atrial Natriurético (FAN), responsável pelo aumento na excreção renal de sal e água, regulando a hipervolemia. Já a diminuição do volume plasmático (hipovolemia) dispara o sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, responsável pelo aumento da reabsorção renal de sódio e água.

Além da água, a urina também é composta de eletrólitos (sódio, potássio, cloreto, bicarbonato e outros íons menos abundantes) e pelos produtos finais do metabolismo protéico, sendo o principal deles a uréia. Quando os rins estão funcionando normalmente, as quantidades dessas substâncias excretadas por dia são exatamente iguais às quantidades ingeridas e formadas, de maneira que, durante determinado período de tempo, não há modificação da composição corporal total.

Algumas substâncias normalmente não estão presentes na urina, como é o caso de aminoácidos e glicose, que são normalmente reabsorvidas de forma completa logo nos primeiros segmentos dos rins (túbulos renais). No entanto, em algumas situações, como nos casos de diabetes mellitus, em que a concentração de glicose excede a capacidade de reabsorção renal, a glicose poderá aparecer na urina. As proteínas também não são normalmente encontradas na urina, pois não são filtradas pelos rins, devido ao seu grande tamanho (o aparecimento de proteínas na urina indica, geralmente, lesão no glomérulo).

Além da excreção de substâncias químicas estranhas e metabólitos, os rins possuem várias funções no organismo que são vitais para a manutenção da homeostase (capacidade do organismo de manter o equilíbrio interno, adaptando-se às variações do meio ambiente), tais como: regulação do balanço de água e eletrólitos,

regulação da pressão arterial, regulação do equilíbrio ácido-básico, etc.

## 2.1 Estrutura do Rim

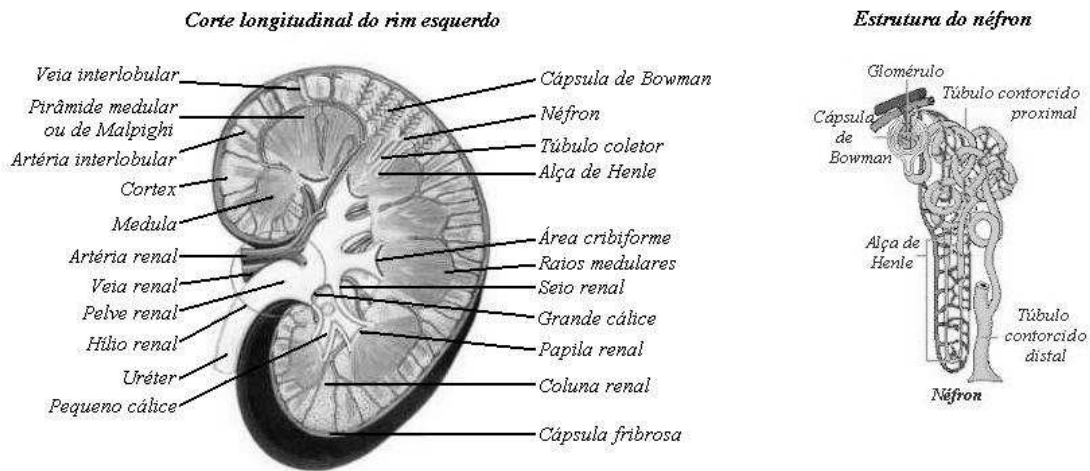
A função renal está diretamente ligada à sua estrutura. Assim, o conhecimento da estrutura dos rins facilita a compreensão de sua fisiologia.

Os mamíferos possuem dois rins que estão localizados no abdômem. Exteriormente, cada rim apresenta uma borda medial, na qual encontra-se o hilo (espécie de fissura) onde passa o ureter, canal que leva a urina formada no rim até a bexiga; a artéria renal, que leva o sangue para ser filtrado nos capilares glomerulares, e a veia renal, por onde retorna o sangue filtrado; os vasos linfáticos e os nervos (Fig. 2.1). Sobre a extremidade superior de cada rim, situa-se a glândula supra-renal (Fig. 2.1), pertencente ao sistema endócrino e com importante papel na regulação da função renal. Se fizermos um corte longitudinal no rim, veremos várias estruturas, sendo a principal o néfron, a região onde ocorre a filtração do sangue e o processamento do filtrado (Fig. 2.2).

## 2.2 Formação da Urina

Vindo da aorta, o sangue chega aos rins através das artérias renais. No interior de cada rim, cada artéria se ramifica em várias subdivisões até formarem os néfrons. Os néfrons são as unidades funcionais dos rins (Fig. 2.3). Cada rim contém cerca de um milhão deles. Dentro do néfron, o sangue passa para um novelo de capilares conhecido como glomérulo, que se localiza no córtex renal.

À formação da urina inicia-se no glomérulo renal onde um quinto do plasma que entra no rim são filtrados devido à pressão hidrostática do sangue nos capilares glomerulares. O fluido que segue através do rim é chamado de filtrado. Este fil-



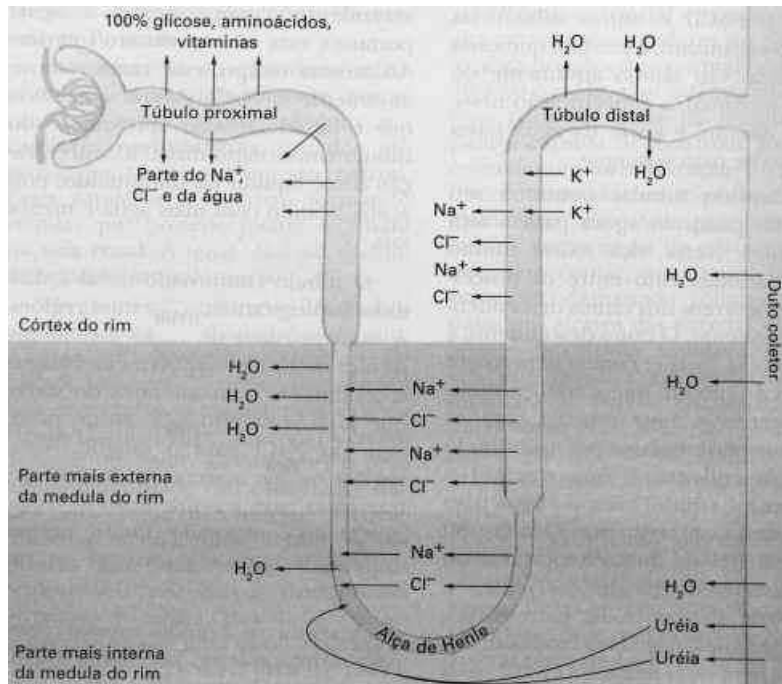
**Figura 2.2:** Estrutura renal (esquerda) e de um néfron (direita). [2]

trado possui poucas proteínas e macromoléculas pois estas dificilmente passam pelas paredes do glomérulo renal durante a filtração.

O filtrado, após ser formado, flui através dos túbulos renais, onde ele poderá ter ser volume e/ou composição modificados através dos mecanismos de reabsorção e secreção tubular existentes ao longo do néfron. Durante a formação da urina, haverá reabsorção tubular renal, onde uma substância é transportada do interior tubular para o sangue e a secreção tubular renal, que é o processo inverso. Graças à secreção tubular, haverá um processo de depuração renal, já que além da filtração glomerular, o sangue que não foi filtrado nas glomérulos passará por uma segunda rede capilar, peritubular, formada a partir das arteríolas aferentes. A reabsorção tubular permitirá que muitas substâncias voltem para o sangue que percorre os capilares peritubulares.

O transporte de solutos através do epitélio renal pode ser feito a favor de um gradiente eletroquímico, ou por processos específicos que ocorrem na membrana plasmática de algumas células tubulares. O transporte de sódio, que utiliza





**Figura 2.3:** Esquema do funcionamento de um néfron

grande parte da energia gasta no rim, exerce uma enorme influência no gradiente eletroquímico através do epitélio tubular renal, e desta forma afeta o transporte dos demais íons através da parede tubular. A reabsorção de sódio e cloreto, que são os solutos presentes em maior quantidade no filtrado, criam gradientes osmóticos responsáveis pela reabsorção de água. A reabsorção de água aumenta a concentração de solutos no interior dos túbulos, modificando o gradiente químico responsável pelo transporte passivo dos solutos através do epitélio. O gradiente eletroquímico de sódio pode também fornecer energia para a reabsorção de outras substâncias. Assim sendo, a modificação desta reabsorção de sódio, que pode ser causada por hormônios ou drogas, causa alteração no transporte de outros solutos.

Basicamente, vários processos ocorrem no interior do néfron afim de variar a concentração de substâncias que serão excretadas na urina final. A reabsorção de

água tende a aumentar a concentração de solutos no interior dos túbulos. A maioria das substâncias presentes no filtrado inicial é reabsorvida ao longo da formação da urina e volta ao sangue. A quantidade de substâncias filtradas é sempre maior do que as excretadas; porém sua concentração na urina final pode ser maior ou menor que aquela no filtrado glomerular, dependendo da quantidade de água que será reabsorvida.

A maior parte dos solutos no fluido extracelular são íons. Já na urina final, há grande concentração de substâncias neutras, particularmente uréia. A quantidade de sódio excretada na urina pode variar de acordo com sua ingestão, porém, independente disto, o equilíbrio entre a ingestão e excreção deve ser mantido. Da mesma forma, o volume urinário é maior em condições de ingestão excessiva de água do que em restrição da mesma.

### **2.2.1 Regulação do volume de água**

Do total de sangue que entra nos rins diariamente (aproximadamente 1200 litros), 180 litros são filtrados no glomérulo e apenas 1 a 2 litros de urina é formada e eliminada, devido à grande reabsorção de água ao longo dos túbulos renais. No túbulo proximal (Fig. 2.3), um volume considerável de água é reabsorvido (158 litros por dia, aproximadamente). Isto ocorre juntamente com a reabsorção de sódio, tendo um papel importante na manutenção do fluido extracelular. O filtrado restante pode ser parcialmente reabsorvido nas partes finais do néfron, dependendo da ação do hormônio antidiurético. Este hormônio aumenta a permeabilidade do túbulo distal e do duto coletor (Fig. 2.3) à água, favorecendo a reabsorção de água sem que esta dependa da reabsorção de soluto. Desta forma o rim possui papel importante na regulação da tonicidade do flui extracelular. A osmolaridade da urina

final pode variar de 40 a 1400 mOsm/kg de  $H_2O$ .

## 2.3 O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona (RAA) é responsável por um importante mecanismo que aumenta a eficácia do controle renal dos líquidos corporais.

Células especializadas, localizadas no rim, secretam uma protease denominada renina. Esta age no angiotensinogênio (produzido no fígado) gerando a angiotensina I, que, por perda de dois aminoácidos terminais, é convertida em angiotensina II (Ang-II). A Ang-II tem uma série de efeitos sistêmicos e renais, além de estimular a secreção de aldosterona.

A Ang-II é um dos controladores do volume corporal. Quando ocorre hipovolemia, os níveis plasmáticos aumentados de Ang-II levam a um aumento da reabsorção de sódio nos túbulos proximais. Por sua vez, quando o volume plasmático está acima do normal, a secreção de renina é diminuída, diminuindo a formação de Ang-II que, por sua vez, diminui a reabsorção tubular de sódio e água.

A Ang-II atua, também, na resistência periférica total, por ter potente ação vasoconstritora, contribuindo para aumentar a pressão sanguínea sistêmica.

Até recentemente, a Ang-II era considerado o único produto biologicamente ativo da clivagem do angiotensinogênio. Hoje, porém, sabe-se que há uma família de peptídeos angiotensina biologicamente ativos. Dentre eles podemos ressaltar a Ang-(1-7), Ang-III ou Ang-(2-8), cuja ação assemelha-se à ação da Ang-II, e a Ang-IV ou Ang-(3-8) que vem mostrando possuir efeitos antagônicos aos da Ang-II [32].

A aldosterona, que é produzida nas glândulas supra-renais, estimula a reabsorção de sódio no duto coletor, através do aumento da síntese e da atividade da Na/K - ATPase existente na membrana baso-lateral dessas células.

## 2.4 Fator Atrial Natriurético

O fator atrial natriurético (FAN) ou peptídeo natriurético atrial (PNA) é um peptídeo secretado por células endócrinas no átrio cardíaco que tem ação natriurética (aumenta a excreção de sódio na urina), contribuindo para a regulação do volume dos líquidos corporais. O estímulo para liberação desse peptídeo é o estiramento do átrio, resultado de uma expansão do volume de sangue circulante. O FAN, uma vez na circulação, causa vasodilatação generalizada, aumento da permeabilidade vascular à água, aumento da filtração glomerular, diurese e natriurese. Estas ações combinadas levam à excreção aumentada de sal e água, que ajudam a compensar o excesso de volume.

## 2.5 O Hormônio Antidiurético

A regulação do volume e da tonicidade da urina é realizada pela ação de uma classe de hormônios conhecida como hormônios antidiuréticos ou ADH. A ação principal destes hormônios é aumentar a permeabilidade de certos epitélios renais permitindo que a água seja reabsorvida da urina e retornando ao sangue.

O ADH é um peptídeo formado por oito aminoácidos, sintetizado em células localizados no hipotálamo, adjacentes ao centro de controle da sede. Daí, o ADH é transportado para a neuro-hipófise, de onde é secretado para a circulação sanguínea. Basicamente, a secreção do ADH é influenciada por modificações na osmolaridade plasmática e pela variação do volume e pressão sanguíneos. Um pequeno aumento de 1% na osmolaridade é suficiente para estimular a secreção do ADH, que é inibida quando a osmolaridade decresce. Porém é necessária uma queda de 5 a 10% do volume ou da pressão para estimular a secreção do hormônio.

O ADH tem mostrado causar um enorme aumento na permeabilidade à água do epitélio renal de anfíbios e mamíferos através da regulação do número de canais especializados no transporte de água, conhecidos como aquaporinas. [6,26,27,33–39] Em determinados casos, a produção do ADH é muito reduzida, como acontece no *diabetes insipido*: os portadores dessa doença apresenta poliúria (urina volumosa, muito diluída), devido à grande perda de água não reabsorvida no túbulo distal. [40]

Uma análise mais detalhada das aquaporinas e como o número destas aquaporinas é regulado em epitélios renais, será vista no próximo capítulo.

# Capítulo 3

## Aspectos fisiológicos da célula MDCK

### 3.1 Origem da linhagem das células MDCK

A linhagem celular do tipo MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) foi originalmente estabelecida por S. H. Madin e N. B. Darby em 1958 [28]. As células foram retiradas do rim de uma cachorra adulta, aparentemente normal, da raça Cocker Spaniel. Estas células apresentam semelhanças com as células do túbulo distal convoluto, que é uma porção do néfron [ver Cap. 2].

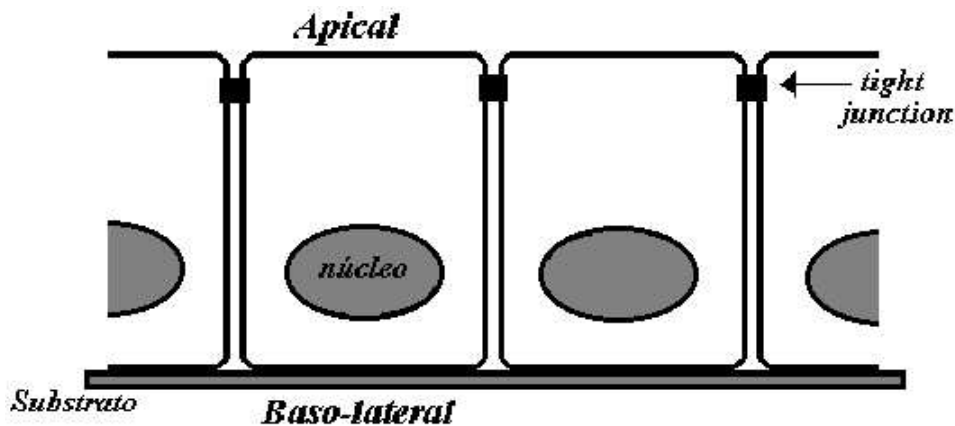
Células do tipo MDCK vêm sendo utilizadas para isolar vírus do tipo Influenza A e Influenza B entre outros [41]. Além disto, elas são utilizadas em estudos dos mecanismos relacionados com o transporte de íons, proteína, lipídio e drogas [42,43]. O estudo de transporte de água através da membrana plasmática celular, estudo este que é o principal alvo de nosso trabalho, também vem sendo desenvolvido por alguns grupos de pesquisa utilizando esta linhagem celular [17–20].

## 3.2 Morfologia das células do tipo MDCK

As células iniciais, obtidas por Madin et. al., aparentavam ser do tipo fibroblastos (formato alongado). Estas células foram então modificadas de tal forma que o resultado foi o estabelecimento de células do tipo epitelial, que, embora sejam bastante resistentes à ação da tripsina, podem ser trabalhadas em cultura sem maiores dificuldades (o processo de cultura celular será detalhado no Cap. 6). [28]

Como toda célula epitelial, as células MDCK, quando crescidas em um substrato, formam uma monocamada celular com dois lados bastante distintos (Fig. 3.2). O lado conhecido como membrana baso-lateral envolve toda a membrana plasmática que se encontra abaixo de uma ligação entre células vizinhas e o lado conhecido como membrana apical envolve a parte superior desta membrana. Esta ligação entre células vizinhas se dá através de pontos de contato entre suas membranas em torno da célula, conhecida como *tight junction*. A função das *tight junctions* é separar o lado superior (apical) do lado inferior (baso-lateral) das monocamadas de células epiteliais, de forma a impedir o contato direto entre estas partes [17, 36].

Quando estudamos um organismo real, *in vivo*, observamos que esta separação da membrana celular em duas partes distintas é essencial para o funcionamento celular. No caso das células do tipo MDCK, a membrana apical permanece em contato com o filtrado (líquido que se transformará em urina) e é por esta porção celular que ocorre a reabsorção de substâncias e excreção de outras para o filtrado. Já a membrana baso-lateral está em contato com o interior do rim e é responsável pelo transporte de substâncias de ou para este (e conseqüentemente para o sangue).



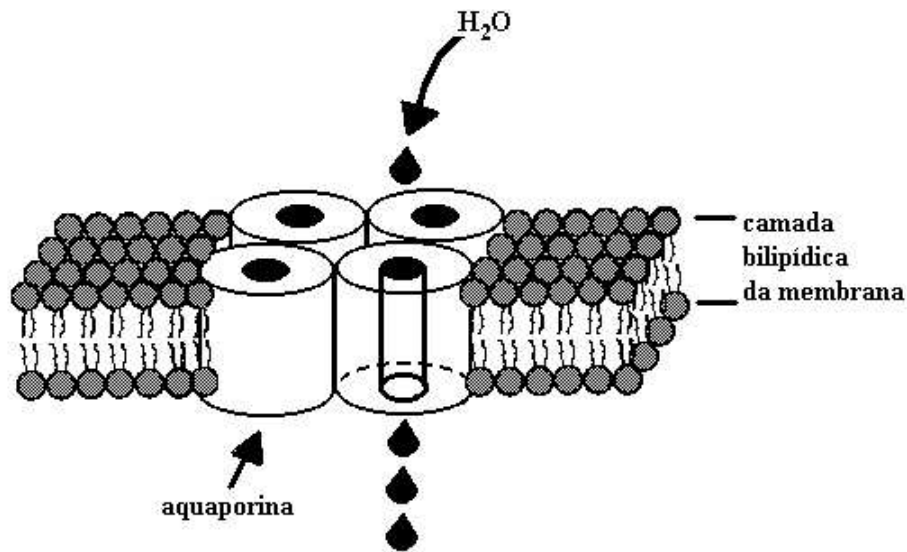
**Figura 3.1:** Representação esquemática de uma monocamada de células do tipo MDCK crescidas em um substrato. Podemos observar os lados apical e baso-lateral destas células, bem como os pontos de ligação entre as células (*tight junctions*).

### 3.3 Aquaporinas

Em 1992, que Preston et al. [3], procuravam por moléculas de fator Rh em células vermelhas do sangue, quando detectaram a presença de uma grande quantidade de proteínas de 28 kDa ( $\sim 4,6 \times 10^{-20}g$ ) de massa nas membranas das células vermelhas. Estudando estas proteínas, eles deduziram que elas atuavam como poros ou canais de água através dos quais fluídos poderiam passar de um lado para outro da membrana. Preston et al. chamaram esta nova proteína da CHIP28. Atualmente os canais de água são conhecidos como aquaporinas ou AQPs e a CHIP 28, que foi a primeira aquaporina isolada, passou a ser conhecida como aquaporina-1 ou AQP-1.

Mais de dez diferente tipos de aquaporinas já foram identificados em mamíferos [4, 5, 33–35, 39, 44–46]. Baseado nos estudos com aquaporina-1, concluiu-se que as AQPs são pequenas proteínas do tipo integrais que cruzam a membrana de um lado a outro, contendo dois semi-poros que juntos formam um canal de água (Fig. 3.3) [4, 6].





**Figura 3.2:** Representação esquemática da posição de uma aquaporina, do tipo AQP-1 em relação à membrana na qual ela esteja inserida.

Um sumário da localização e de algumas funções conhecidas (ou esperadas) importantes das aquaporinas estão listadas na tabela 3.1.

Podemos ver claramente que as aquaporinas são vastamente distribuídas pelo corpo e também que diferentes aquaporinas possuem diferentes (e importantes) funções. No rim, foram encontrados até o momento 7 tipos de canais de água. A aquaporina do tipo AQP1 é a mais abundante e de fundamental importância na regulação da concentração urinária [47]. A AQP2 é a aquaporina regulada pelo hormônio antidiurético (ou vasopressina). Esta aquaporina é responsável pelo transporte de água, através da membrana apical, para dentro de células renais onde o fluxo de água é controlado pela presença do hormônio antidiurético [4,39]. As aquaporinas AQP3 e AQP4 estão presentes na membrana basolateral e são responsáveis pelo escape de água da célula de volta para o sangue. As aquaporinas AQP6 e AQP8 são intracelulares e suas funções ainda não são bem conhecidas. A AQP7 parece

**Tabela 3.1 - Principais sítios de expressão e funções das aquaporinas**

	PRINCIPAL SÍTIO DE EXPRESSÃO	FUNÇÕES E OBSERVAÇÕES
Aquaporina-0	Olhos:células do cristalino	Balanço do fluído dentro do cristalino
Aquaporina-1	Células vermelhas do sangue Rim: túbulo proximal Olhos: epitélio ciliar Cérebro Pulmão: células epiteliais alveolares	Proteção osmótica Concentração de urina Produção de humor aquoso Produção de fluído cerebro-espinhal Estado de hidratação alveolar
Aquaporina-2	Rim: duto coletor e túbulo contornado distal	Atividade mediada pelo hormônio antidiurético
Aquaporina-3	Rim: duto coletor Traquéa: células epiteliais	Reabsorção de água para o sangue Secreção de água para a traquéa
Aquaporina-4	Rim: duto coletor Cérebro: células endoteliais Cérebro: hipotálamo Pulmão: epitélio bronquial	Reabsorção de água Balanço do fluído CSF Provável função osmosensitiva (?) Secreção de fluído bronquial
Aquaporina-5	Glândulas salivares Glândulas lacrimais	Produção de saliva Produção de lágrimas
Aquaporina-6	Rim	Função desconhecida
Aquaporina-7	Rim: túbulo proximal Testículos e espermas	Reabsorção de água (?)
Aquaporina-8	Testículos, pâncreas, fígado, rim e outros	
Aquaporina-9	Leocócitos	

participar da reabsorção de água no túbulo proximal. A estrutura das aquaporinas é muito semelhante. A diferenciação entre as aquaporinas se dá principalmente pela seletividade e pelo posicionamento de cada tipo de aquaporina no organismo. Para maiores detalhes sobre a estrutura e funções das aquaporinas ver Verkman et al., 2000 [4].

### 3.4 Mecanismo de regulação da AQP2

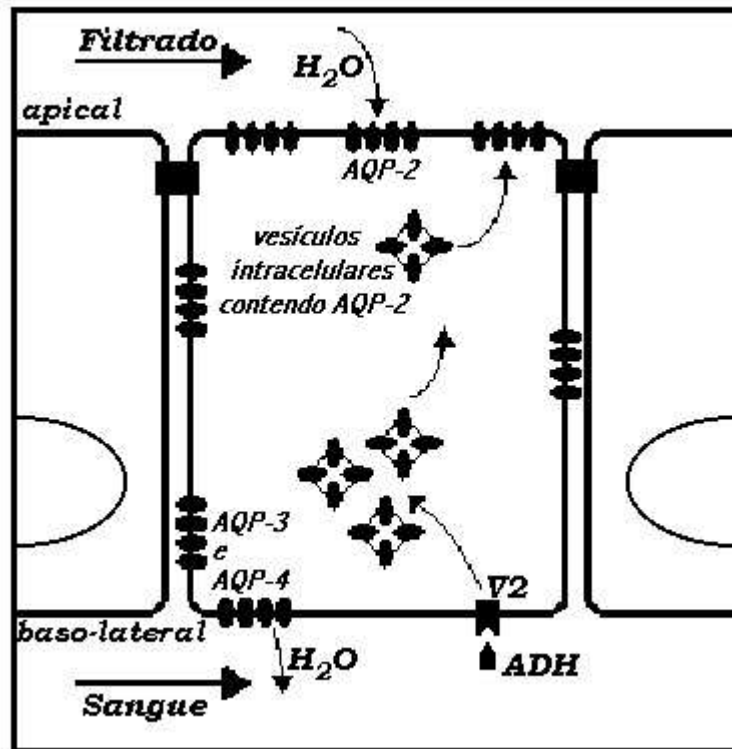
Como vimos no Cap.2, o hormônio antidiurético (ADH) ou arginina-vasopressina (AVP) é um peptídeo responsável pela regulação do volume e da tonicidade da urina.

Uma das ações do ADH no rim é estimular a reabsorção de NaCl pelo ramo grosso ascendente da alça de Henle através do aumento da atividade do co-transportador  $1Na^+ : 2Cl^- : 1K^+$ , fazendo com que o rim seja capaz de concentrar a urina.

Outra ação do ADH no rim é aumentar a permeabilidade do túbulo distal e do duto coletor à água e uréia. O fundamento da ação antidiurética do ADH é induzir o aumento de aquaporinas no tipo AQP-2 na região apical da membrana celular [6, 26, 27, 33–39]. Nas células, cuja regulação de permeabilidade à água depende da presença ou não de ADH, existe um receptor, chamado V2, localizado na membrana basolateral de célula, que é responsável pela ligação do ADH com a célula. Como vimos no Cap. 2, o ADH chega ao rim através do sangue. O hormônio liga-se ao receptor V2 que está acoplado à adenilciclase (AC). A ligação estimula a proteína G (Gs), ativando a AC, que por sua vez provoca a produção de AMP cíclico (AMPc). O aumento do AMPc leva à ativação da proteinoquinase A (PK) que conseqüentemente resulta na inserção de canais de água tipo AQP-2 na membrana apical da célula. As AQPs-2 estão previamente inseridas em vesículas intracelulares localizadas próximo à membrana apical (Fig. 3.4).

O aumento de aquaporinas na membrana apical da membrana faz com que a célula torne-se mais permeável à água nesta região, facilitando assim a reabsorção de água para dentro da célula e conseqüentemente o retorno desta água ao sangue. O processo inverso ocorre quando o ADH é desligado da célula, ou seja, as AQP2s inseridas na membrana apical retornam ao interior da célula (agrupadas em vesículas), diminuindo novamente a permeabilidade à água desta região.

A membrana basolateral é livremente permeável à água. A água entra na célula por canais regulados pelo ADH, porém, saem da célula por canais do tipo 3 e 4, que estão permanentemente inseridos na membrana basolateral e que não são



**Figura 3.3:** Esquema de ação do ADH numa célula epitelial. O ADH liga-se ao receptor V2, localizado na membrana basolateral, ativando uma reação em cadeia (ver detalhes no texto) que resulta na inserção de canais de água do tipo AQP-2 na membrana apical da célula.

regulados pelo ADH.

Não há muitos estudos sobre as aquaporinas presentes na célula MDCK, mas sabe-se que esta célula reage à presença do ADH aumentando sua permeabilidade à água [36, 38]. Isto sugere que a ação do ADH sobre esta célula é semelhante ao mencionado acima e ilustrado na Fig. 3.4.

### 3.5 Regulação do volume celular em células do tipo MDCK

Como vimos no capítulo de introdução deste trabalho, muitas células possuem a capacidade de controlar a perturbação no volume celular através de processos regulatórios de volume (RVI ou RVD). [7–12] Neste trabalho, introduzimos NaCl no meio de forma a torná-lo hiperosmótico, causando assim um hiper-choque na célula MDCK estudada. Mudança na concentração de substâncias induzida pelo estresse hiperosmótico, o qual reflete o comportamento do volume celular, causa a ativação de mecanismos de regulação de volume que têm sido determinados em células do tipo MDCK unidas entre si e em monocamadas crescidas em suportes [11].

Estas e outras investigações levam à conclusão que células do tipo MDCK respondem ao estresse hipertosmótico pelo aumento do volume regulatório (RVI) mediado por uma elevação de eletrólitos inorgânicos e pelo acúmulo intracelular de osmólitos orgânicos.

Ritter et al. [10] observaram o comportamento das propriedades elétricas da célula MDCK submetida a uma retração osmótica do volume celular. Como resultado, eles concluíram que uma exposição das células a um choque hiperosmótico levava a uma moderada hiperpolarização e um aumento da seletividade ao íon potássio ( $K^+$ ) da membrana celular e paralelamente, a um notável aumento da resistência elétrica da membrana. Assim, a retração do volume celular diminui a condutância iônica da membrana da célula MDCK, diminuindo a perda de íons. Este processo mostra ser um importante aliado do RVI, porém, o acúmulo de íons requerido pelo RVI não pode ser conseguido apenas pela inibição da condutância iônica da célula, mas deve envolver mecanismos de aumento da osmolaridade celular. Estes mecanis-

mos vêm sendo estudados por vários grupos, porém poucos resultados satisfatórios já foram obtidos [11].

# Capítulo 4

## Modelo para transporte de água através de membranas celulares

### 4.1 Modelo de transporte de água com regulação do volume celular (RVI)

Em estudos feitos anteriormente de transporte de água através de células renais, o processo de RVI não foi levado em consideração. Assim, a curva relativa à diminuição do volume celular em função do tempo de medida, quando a célula era submetida a um choque hiperosmótico, podia ser ajustada por uma função exponencial simples cujo tempo de decaimento é relativo à permeabilidade à água [16]. Porém, para longos tempos de medida, o volume celular volta a aumentar devido à reentrada de água na célula (ver Fig. 9.1, capítulo 9), causada pelos mecanismos de regulação do volume celular (RVI). Como foi discutido no capítulo 3, o processo de RVI em células do tipo MDCK pode estar relacionado com fluxo de osmólitos depois do choque hiperosmótico, mas o mecanismo completo que leva ao RVI ainda não foi esclarecido. Nosso modelo leva em conta tanto o transporte osmótico passivo de água quanto o processo de RVI, como descrito a seguir.

Assumimos aqui que a permeabilidade à água através da membrana plasmática

#### Capítulo 4. Modelo para transporte de água através de membranas celulares 27

de uma dada célula é constante durante um choque osmótico. Podemos utilizar a Lei de Fick para expressar a densidade de fluxo de água ( $J_w$ ) pela célula da seguinte forma

$$J_w = P\Delta\Phi, \quad (4.1)$$

onde  $P$  é a permeabilidade da membrana à água [ $\text{cm/s}$ ] e  $\Delta\Phi$  é a diferença entre a osmolaridade interna  $\Phi_i$  e a externa  $\Phi_e$  [ $\text{moles/cm}^3$ ] [48].

Utilizando a equação de continuidade [49], temos que:

$$\frac{dM_w}{dt} = \int J_w dA = J_w A_0, \quad (4.2)$$

onde  $A_0$  é a área total inicial da membrana celular [ $\text{cm}^2$ ]. Utilizamos a área externa total da membrana celular ( $A_0$ ) e não a área instantânea da célula, pois supomos que o número total de canais na membrana responsáveis pela permeabilidade da célula à água permanece constante durante o choque osmótico. Dadas as unidades de  $A_0$  e  $J_w$ , temos que

$$[M_w] = \text{cm}^2 \frac{\text{cm moles}}{\text{s cm}^3} \text{s} = \text{moles de água}, \quad (4.3)$$

ou seja,  $M_w$  é o número de moles de água. Assim,

$$M_w = \frac{1}{18} \rho_w V, \quad (4.4)$$

com 1 mol  $H_2O = 18g$ ,  $\rho_w = 1g/\text{cm}^3$  a densidade da água e  $V$  o volume total da célula [ $\text{cm}^3$ ].

Da equação 4.4 temos que



$$\frac{dM_w}{dt} = \frac{1}{18} \frac{dV}{dt}, \quad (4.5)$$

Substituindo as equações 4.5 e 4.1 em 4.2, temos então que

$$\frac{dV}{dt} = 18A_0P(\Phi_i - \Phi_e), \quad (4.6)$$

em unidades CGS.

Uma primeira análise da equação 4.6 nos mostra que se  $\Phi_i$  é maior que  $\Phi_e$  haverá um fluxo de água para dentro da célula, aumentando o volume celular, caso contrário, haverá um fluxo de água para fora da célula, diminuindo o volume celular.

Supondo que o ambiente externo à célula comporte-se como um reservatório, tal que o transporte de água para dentro da célula não afeta a osmolaridade externa, temos que  $\Phi_e$  é constante.

A osmolaridade interna deve mudar devido ao fluxo de água para dentro ou para fora da célula, tal que a situação de equilíbrio ocorre quando  $\Phi_i = \Phi_e$ .

A osmolaridade interna  $\Phi_i$  varia com volume da seguinte forma

$$\Phi_i = \frac{M_s}{V - b}, \quad (4.7)$$

onde  $M_s$  é o número de moles de soluto no volume celular osmoticamente ativo da célula. Como o volume total da célula ( $V$ ) não é totalmente ocupado por água, se chamamos de  $b$  o volume osmoticamente inativo ( $cm^3$ ), temos que o volume celular ocupado por água é  $(V-b)$  [49]. Substituindo a equação 4.7 na equação 4.6, temos que

$$\frac{d(V - b)}{dt} = \frac{18A_0P}{\rho_w} \left[ \frac{M_s}{V - b} - \Phi_e \right], \quad (4.8)$$

#### Capítulo 4. Modelo para transporte de água através de membranas celulares 29

Resolvendo a equação 4.8 para um choque hiperosmótico e para pequenas variações de volume, mantendo  $M_s$  constante, chegaremos à uma função de decaimento exponencial simples para o volume em função do tempo como foi obtido por Farinas et al. [16].

Podemos reescrever a equação 4.8 na forma

$$\frac{M_s}{V-b} = \frac{1}{18A_0P} \frac{d(V-b)}{dt} + \Phi_e. \quad (4.9)$$

Modelamos o transporte de osmólitos para o processo de RVI permitindo que  $M_s$  varie da seguinte forma

$$\frac{dM_s}{dt} = -\alpha A_0 \left( \frac{V - V_R}{V_0} \right), \quad (4.10)$$

onde  $V_R$  é o volume regulatório [ $cm^3$ ] (volume que a célula atinge após a regulação) e  $\alpha$  é uma constante relativa à taxa de transporte de osmólitos para o processo de RVI por unidade de área de membrana ( $mol/s.cm^2$ );  $\alpha$  deve ser diferente para um choque hipo ou hiperosmótico. Nossa proposta é que a taxa de entrada de osmólitos nas regiões osmoticamente ativas dentro da célula é proporcional à variação relativa do volume celular em relação ao volume final ( $V_R$ ).  $V_R$  é o novo volume de equilíbrio depois do choque osmótico e do RVI, conseqüentemente ele é independente de nosso modelo. Este novo volume de equilíbrio é em geral muito próximo do volume inicial  $V_0$ .

Derivando a equação 4.8 em relação ao tempo temos

$$\frac{d^2(V-b)}{dt^2} = 18P_w A_0 \left( \frac{1}{V-b} \frac{dM_s}{dt} - \frac{M_s}{(V-b)^2} \frac{d(V-b)}{dt} \right). \quad (4.11)$$

Das equações 4.9 e 4.10 podemos reescrever a equação 4.11 acima como

$$(V - b) \frac{d^2(V - b)}{dt^2} + \left( \frac{d(V - b)}{dt} \right)^2 + \gamma_1 \frac{d(V - b)}{dt} + \gamma_2(V - b) = \gamma_2(V_R - b), \quad (4.12)$$

onde

$$\gamma_1 = 18P_w A_0 \Phi_e, \quad (4.13)$$

e

$$\gamma_2 = 18 \frac{P_w A_0^2 \alpha}{V_0}. \quad (4.14)$$

Como,

$$\frac{d^2(V - b)^2}{dt^2} = 2 \left( \frac{d(V - b)}{dt} \right)^2 + 2(V - b) \frac{d^2(V - b)}{dt^2}, \quad (4.15)$$

ou seja,

$$(V - b) \frac{d^2(V - b)}{dt^2} + \left( \frac{d(V - b)}{dt} \right)^2 = \frac{1}{2} \frac{d^2(V - b)^2}{dt^2}, \quad (4.16)$$

e ainda

$$\frac{d(V - b)^2}{dt} = 2(V - b) \frac{d(V - b)}{dt}, \quad (4.17)$$

assim, substituindo as equações 4.16 e 4.17 na equação 4.12, obtemos então uma equação diferencial não linear de segunda ordem para a evolução do volume em função do tempo, da forma

$$\frac{1}{2} \frac{d^2(V - b)^2}{dt^2} + \gamma_1 \frac{d(V - b)}{dt} + \gamma_2(V - b) = \gamma_2(V_R - b). \quad (4.18)$$

Se as variações de volume são pequenas, temos que

$$(V - b) = (V_0 - b) + \Delta V, \quad (4.19)$$

onde  $V_0$  é o volume inicial da célula e  $\Delta V \ll (V_0 - b)$  e

$$(V - b)^2 = (V_0 - b)^2 + \Delta V^2 + 2(V_0 - b)\Delta V \approx (V_0 - b)^2 + 2(V_0 - b)\Delta V, \quad (4.20)$$

assim

$$\frac{1}{2} \frac{d^2(V - b)^2}{dt^2} \approx (V_0 - b) \frac{d^2 \Delta V}{dt^2} \quad (4.21)$$

As equações 4.20 e 4.21 nos levam então à linearização da equação 4.19, ou seja,

$$\frac{d^2 \Delta V}{dt^2} + \frac{\gamma_1}{(V_0 - b)} \frac{d \Delta V}{dt} + \frac{\gamma_2}{(V_0 - b)} \Delta V = \frac{\gamma_2}{(V_0 - b)} (V_R - V_0) \quad (4.22)$$

que é a equação para um oscilador harmônico amortecido.

Podemos resolver a parte homogênea da equação 4.22 acima da seguinte forma

$$\lambda^2 + \frac{\gamma_1}{V_0 - b} \lambda + \frac{\gamma_2}{V_0 - b} = 0, \quad (4.23)$$

onde

$$\lambda_1 = -\frac{\gamma_1}{2(V_0 - b)} - \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{\gamma_1}{(V_0 - b)}\right)^2 - \frac{4\gamma_2}{(V_0 - b)}}, \quad (4.24)$$

e

$$\lambda_2 = -\frac{\gamma_1}{2(V_0 - b)} + \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{\gamma_1}{(V_0 - b)}\right)^2 - \frac{4\gamma_2}{(V_0 - b)}}. \quad (4.25)$$

#### Capítulo 4. Modelo para transporte de água através de membranas celulares 32

Das equações 4.24 e 4.25 obtemos então dois tempos característicos  $\tau_1$  e  $\tau_2$  dados por

$$\tau_1 = -\frac{1}{\lambda_1} = \left[ \frac{\gamma_1}{2(V_0 - b)} + \frac{1}{2} \sqrt{\left( \frac{\gamma_1}{(V_0 - b)} \right)^2 - \frac{4\gamma_2}{(V_0 - b)}} \right]^{-1}, \quad (4.26)$$

e

$$\tau_2 = -\frac{1}{\lambda_2} = \left[ \frac{\gamma_1}{2(V_0 - b)} - \frac{1}{2} \sqrt{\left( \frac{\gamma_1}{(V_0 - b)} \right)^2 - \frac{4\gamma_2}{(V_0 - b)}} \right]^{-1}. \quad (4.27)$$

As equações 4.26 e 4.27 também predizem que oscilações amortecidas do volume poderão ocorrer para osmolaridades tais que

$$\Phi_e^2 < \frac{4\alpha(V_0 - b)}{18P_w V_0}. \quad (4.28)$$

Porém, na prática, estas oscilações são difíceis de serem observadas e o caso mais comum é a solução amortecida para o volume celular em função do tempo.

A solução para a equação 4.22 é dada por

$$\Delta V = A e^{-\frac{t}{\tau_1}} + B e^{-\frac{t}{\tau_2}} + C. \quad (4.29)$$

Resolvendo para a parte não-homogênea temos

$$\frac{\gamma_2}{V_0 - b} C = \frac{\gamma_2}{V_0 - b} (V_R - V_0), \quad (4.30)$$

ou seja,

$$C = V_R - V_0. \quad (4.31)$$

Substituindo 4.31 em 4.29, temos

#### Capítulo 4. Modelo para transporte de água através de membranas celulares<sup>33</sup>

$$\Delta V = Ae^{-\frac{t}{\tau_1}} + Be^{-\frac{t}{\tau_2}} + (V_R - V_0). \quad (4.32)$$

Estabelecendo as condições iniciais na equação 4.32 acima, temos que, em  $t = 0$

$$\Delta V = 0, \quad (4.33)$$

e

$$\Phi_i - \Phi_2 = -\Delta\Phi_0 \Rightarrow \frac{d\Delta V}{dt} = -18P_w A_0 \Delta\Phi_0, \quad (4.34)$$

onde  $\Delta\Phi_0$  é o choque osmótico ( $mol/cm^3$ ) considerado positivo para um choque hiperosmótico como em nossos experimentos. Podemos então resolver para A e B,

$$A = \frac{\tau_1\tau_2}{\tau_2 - \tau_1} \frac{P_w A_0 \Delta\Phi_0}{\rho_w} + \frac{\tau_1(V_R - V_0)}{\tau_2 - \tau_1}, \quad (4.35)$$

e

$$B = - \left[ \frac{\tau_1\tau_2}{\tau_2 - \tau_1} \frac{P_w A_0 \Delta\Phi_0}{\rho_w} + \frac{\tau_2(V_R - V_0)}{\tau_2 - \tau_1} \right], \quad (4.36)$$

Substituindo as equações 4.35 e 4.36 na equação 4.31 e sabendo que  $\Delta V = V - V_0$ , chegamos finalmente à solução final para  $V(t)$ , ou seja,

$$V = \left[ \frac{\tau_1\tau_2}{\tau_2 - \tau_1} \frac{P_w A_0 \Delta\Phi_0}{\rho_w} + \frac{\tau_1(V_R - V_0)}{\tau_2 - \tau_1} \right] e^{-\frac{t}{\tau_1}} - \left[ \frac{\tau_1\tau_2}{\tau_2 - \tau_1} \frac{P_w A_0 \Delta\Phi_0}{\rho_w} + \frac{\tau_2(V_R - V_0)}{\tau_2 - \tau_1} \right] e^{-\frac{t}{\tau_2}} + V_R \quad (4.37)$$

Se  $\gamma_1^2 \gg 4\gamma_2(V_0 - b)$  então  $\tau_2 \gg \tau_1$  e obtermos,

$$A = \frac{(V_0 - b)\Delta\Phi_0}{\Phi_e}, \quad (4.38)$$

$$B = - \left[ \frac{(V_0 - b)\Delta\Phi_0}{\Phi_e} + (V_R - V_0) \right], \quad (4.39)$$

$$\tau_1 = \frac{\rho_w(V_0 - b)}{P_w A_0 \Phi_e}, \quad (4.40)$$

$$\tau_2 = \frac{\Phi_e V_0}{\alpha A_0}, \quad (4.41)$$

Neste caso fica claro que  $\tau_1$  é o tempo característico para transporte de água e  $\tau_2$  o tempo característico para o transporte de soluto responsável pelo RVI.

Na Fig. 4.1 traçamos uma curva teórica de  $V/V_0$  em função do tempo ilustrando nosso modelo. Para construirmos esta curva, utilizamos os seguintes valores para os parâmetros das equações 4.38, 4.39, 4.40 e 4.41:  $A = 1$ ;  $B = 0.95$ ;  $\tau_1 = 30s$  e  $\tau_2 = 120s$ , respectivamente.

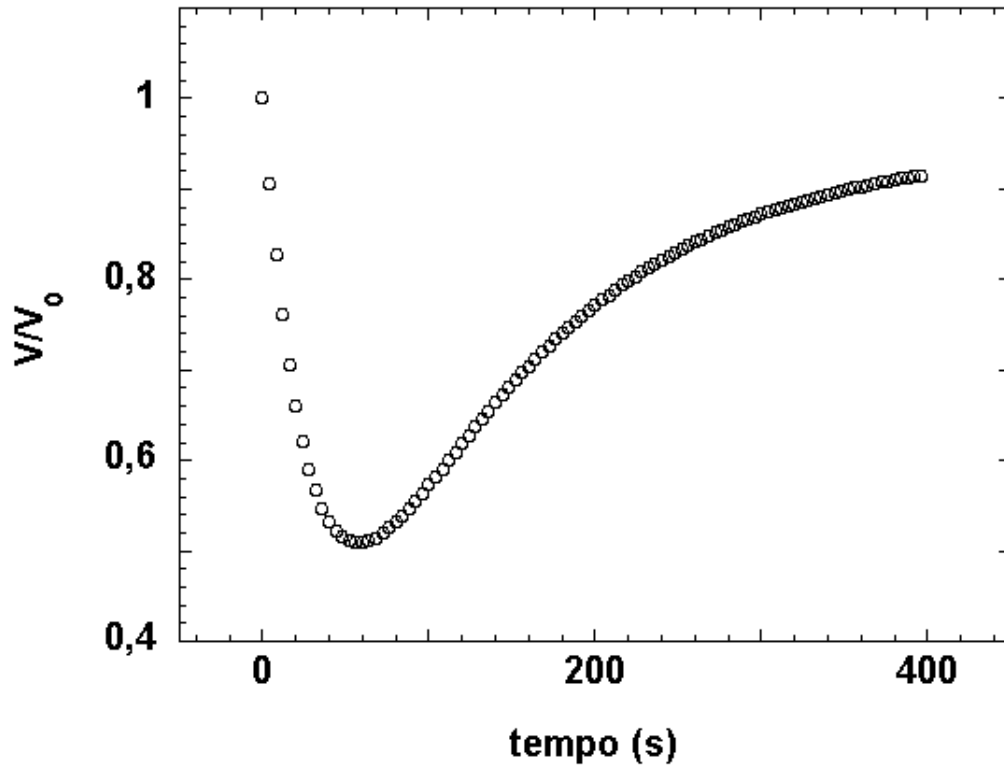
Se eliminarmos a regulação do volume celular fazendo  $\tau_2 \rightarrow \infty$ , a expressão simplificada para  $A$  e  $\tau_1$  será aquela obtida por Farinas et al [16].

## 4.2 Cálculo do número de canais na membrana

A equação que governa o movimento de um fluido dentro de um canal cilíndrico é conhecida como equação de Poiseuille [48]. Ela leva em consideração a viscosidade, embora ela realmente só seja válida para o fluxo não-turbulento (fluxo laminar). Podemos aplicar a equação de Poiseuille para o fluxo de água através de uma aquaporina e desta forma calcular o número de canais por onde há fluxo de água através da membrana celular.

Vamos desconsiderar a força gravitacional e consideraremos que não há nenhuma aceleração de forma que a força total em qualquer elemento de volume será nula.

Sob todas as circunstâncias em que se pode checar experimentalmente, a velocidade de um fluido real diminui para zero próximo da superfície de um objeto

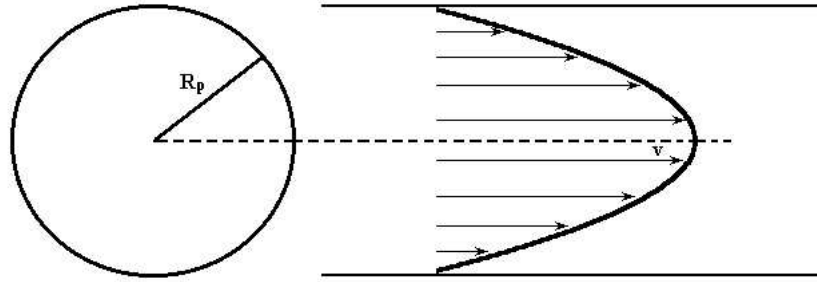


**Figura 4.1:** Curva teórica da evolução temporal de  $V/V_0$ . Para construirmos esta curva, utilizamos os seguintes valores para os parâmetros das equações 4.38, 4.39, 4.40 e 4.41:  $A = 1$ ;  $B = 0.95$ ;  $\tau_1 = 30s$  e  $\tau_2 = 120s$ , respectivamente.

sólido. Uma pequena camada de fluido próximo às paredes de um canal possui velocidade zero. A velocidade do fluido aumenta com a distância às paredes do canal como podemos observar na Fig. 4.2.

Se um fluido estiver fluindo suavemente através de um canal, ele está em um estado de fluxo laminar. A velocidade em um dado ponto não muda no valor absoluto e na direção e sentido. Dizemos que há um fluxo contínuo. Um pequeno volume do fluido se movimenta ao longo de uma linha de fluxo, e diferentes linhas





**Figura 4.2:** Seção transversal e longitudinal de um canal mostrando o perfil da velocidade do fluido em seu interior.

de fluxo não se cruzam.

Sob estas condições, a equação de Poiseuille para a vazão de massa passando através de um canal  $i_c$  ( $mol/s$ ), é dada por

$$i_c = \frac{\pi\rho(R_c)^4RT}{8\eta L}\Delta\Phi_0, \quad (4.42)$$

onde  $\rho$  é a densidade do fluido ( $mol/m^3$ ),  $R_c$  é o raio do canal ( $m$ ),  $R$  é a constante dos gases ( $J/(mol.K)$ ),  $T$  é a temperatura ( $K$ ),  $\eta$  é o coeficiente de viscosidade do fluido ( $N.s/m^2$ ),  $L$  é o comprimento do canal ( $m$ ) e  $\Delta\Phi_0$  é o choque osmótico ( $mol/m^3$ ). [48].

Para  $N$  canais, a vazão de massa pela membrana será

$$i_m = Ni_c = N\frac{\pi\rho(R_c)^4RT}{8\eta L}\Delta\Phi_0, \quad (4.43)$$

A densidade de vazão de massa  $J_m$  através da membrana será dada por

$$J_m = \frac{i_m}{A_m} = \frac{N\pi\rho(R_c)^4RT}{A_m8\eta L}\Delta\Phi_0, \quad (4.44)$$

onde  $A_m$  é a área da membrana ( $m^2$ ).

#### Capítulo 4. Modelo para transporte de água através de membranas celulares 37

Porém, de acordo com a Lei de Fick [48], podemos expressar esta densidade de vazão pela membrana da seguinte forma

$$J_m = P_m \Delta \Phi_0, \quad (4.45)$$

onde  $P_m$  é a permeabilidade da membrana ( $m/s$ ). Da Eq. 4.44, encontramos então que

$$P_m = \frac{N\pi\rho(R_c)^4 RT}{A_m 8\eta L}. \quad (4.46)$$

Podemos reescrever a Eq. 4.46 da seguinte forma

$$N = \frac{P_m A_m 8\eta L}{\pi\rho(R_c)^4 RT}. \quad (4.47)$$

A Eq. 4.47 dá uma estimativa do número de canais existente na membrana celular.

No caso do transporte de água através de aquaporinas teremos os seguintes valores para a Eq. 4.47:

$$\rho = \frac{10^6 \text{ moles}}{18 \text{ m}^3},$$

$$R_c = 6\text{\AA} = 6 \times 10^{-10} \text{ m},$$

$$R = 8,3 \frac{J}{\text{moles.K}},$$

$$T = 300K \text{ e}$$

#### Capítulo 4. Modelo para transporte de água através de membranas celulares<sup>38</sup>

$$\eta \approx 10^{-3} \frac{N \cdot s}{m^2},$$

$$L = 7nm = 7 \times 10^{-9}m.$$

Substituindo os valores acima na Eq. 4.47, obteremos

$$N \approx 10^{18} P_m A_m. \quad (4.48)$$

De posse da permeabilidade e da área da membrana, poderemos estimar o número de canais existente na membrana celular, como será visto no capítulo 9.

# Capítulo 5

## Técnicas Experimentais

### 5.1 Pinça óptica

A luz é uma poderosa ferramenta para manipular objetos microscópicos [13]. Pode-se controlar a posição e a orientação de objetos tão largos quanto  $100\mu m$  e tão pequenos quanto um simples átomo [50]. A pinça-óptica, que consiste num simples feixe de laser focalizado, tem sido amplamente utilizada para aprisionar e manipular esferas dielétricas, vírus, bactérias, células vivas, organelas, DNA, etc [15, 50–52]. Através do pinçamento-óptico é possível medir elasticidade, força, torção, posição, estrutura da superfície, interações entre partículas, etc.

O surgimento da pinça-óptica ocorreu durante um estudo de Ashkin et al., em 1969, sobre o efeito da pressão de radiação da luz sobre pequenos objetos [51]. Neste trabalho eles propuseram um experimento para visualizar o movimento da microesfera sob a ação desta força. Basicamente, eles incidiram sobre uma amostra de microesferas de poliestireno um laser, no modo TEM<sub>00</sub>, fracamente focalizado e durante o estudo das velocidades destas microesferas, eles observaram inesperadamente que elas se direcionavam para a região central do feixe incidente.

Quando o laser é fortemente focalizado através de uma objetiva de grande

abertura numérica (maior que 1), é possível aprisionar objetos numa região próxima ao foco dessa objetiva, caracterizando, assim, o que convencionamos chamar de pinça-óptica.

No limite da ótica geométrica, onde os objetos aprisionados são muito maiores que o comprimento de onda da luz, podemos entender o funcionamento da pinça-óptica com o auxílio do esquema de forças apresentado na Fig. 5.1.

No quadro, à direita, na figura 5.1, representamos o momento linear do feixe menos intenso, incidindo à esquerda da esfera inferior. Os momentos lineares inicial e final do feixe são iguais em módulo (estão unidos pela linha pontilhada). Pela lei de conservação de momento linear deve haver, para a esfera, um momento linear no sentido apontado pela seta R para que haja conservação de momento linear do sistema feixe-esfera. Isto também deve ocorrer, porém ao inverso, quando o feixe incide à direita. Porém, como o feixe da direita é mais intenso, devido ao perfil gaussiano do laser no modo TEM<sub>00</sub> o momento linear que a esfera ganha, devido a este feixe, é maior. Desta forma, a resultante induzirá um movimento em direção ao foco. Se fizermos a mesma análise para o outro lado da figura, veremos que da mesma forma a esfera tomará o caminho do foco. Se observarmos a esfera representada acima da posição de foco, o mesmo acontecerá quando a esfera passar pelo foco. Porém, devido à pressão de radiação do laser, que incide de baixo para cima, a esfera permanecerá presa pouco acima do foco.

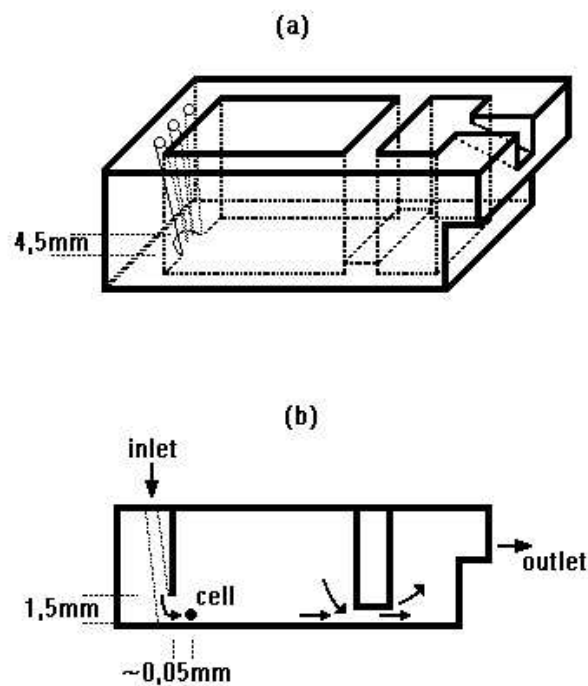
Experimentos realizados em 1987 com um tipo de vírus do tabaco foram o ponto de partida para a utilização da pinça óptica em problemas da biologia [13]. Foi também durante a continuação deste trabalho que observaram que o laser utilizado para o pinçamento (argônio) danificava a membrana de bactérias, que contaminavam as amostras de vírus, levando-as à morte. O pinçamento óptico passou então a ser



causa dano à célula para tempo de observação de até duas horas. Isto foi verificado usando-se uma substância conhecida como Trypan Blue (sua função é tornar o meio intracelular azul quando a membrana for danificada).

## 5.2 Câmara de Fluxo

Para podermos banhar a célula analisada com as soluções experimentais, foi construída uma câmara de fluxo adequada às nossas necessidades. A fig. 5.2 mostra um esquema da nossa câmara de fluxo. Como pode ser observado, esta câmara possui três orifício por onde introduzimos as cânulas por onde chegam as soluções, separadamente, que banharão as células.



**Figura 5.2:** Esquema da câmara de fluxo com detalhes de seu interior

Esta câmara possui dois compartimentos, que minimizam a flutuação em torno da célula, que são ligados pela parte inferior da parede entre eles. O compartimento da esquerda é o local onde são introduzidas as células que serão pinçadas e analisadas. Já o compartimento da direita é por onde ocorre a saída do material eliminado durante o fluxo das soluções. Este material é recolhido por um reservatório que é encaixado na saída da câmara.

Como pode ser observado na Fig. 5.2b, a célula é localizada muito próxima à entrada de fluxo da câmara ( $50\mu m$ ), de forma que o tempo de resposta seja bastante rápido.

A osmolaridade da solução em toda a câmara é bastante não-uniforme, durante o experimento. Porém, em torno da célula esta osmolaridade é bem uniforme e bastante próxima da osmolaridade do fluxo que está sendo introduzido na câmara. A célula está tão próxima quanto possível do fundo da câmara e o fluxo é feito da forma mais rápido quanto é possível para que este fluxo não tire a célula da pinça-óptica. Do momento em que começamos o fluxo até que haja uma boa homogeneização da osmolaridade em torno da célula, transcorre de um a dois segundos.

### 5.3 Montagem Experimental com Pinça-óptica

A montagem experimental inicial com pinça óptica foi feita pelos alunos de Doutorado Ubirajara Agero Batista e Nathan Bessa Viana. Para adequar às nossas necessidades, algumas modificações e regulagens foram feitas.

A montagem experimental pode ser observada na Fig. 5.3. Basicamente, usamos uma objetiva de imersão a óleo (Nikon) de 100X de ganho e abertura numérica 1.3, de tal forma que uma pinça óptica possa ser associada a ela. A pinça-óptica é feita utilizando uma fonte laser infravermelha semiconductor (SDL



5280;  $\lambda = 0.832\mu m$ ) que fornece até 150mW de potência. Utilizamos uma câmera digital (DAGE MTI) acoplada a um vídeo cassete profissional Hi8 (EVO 9650 - SONY) e a um monitor de vídeo para visualização e filmagem do experimento.

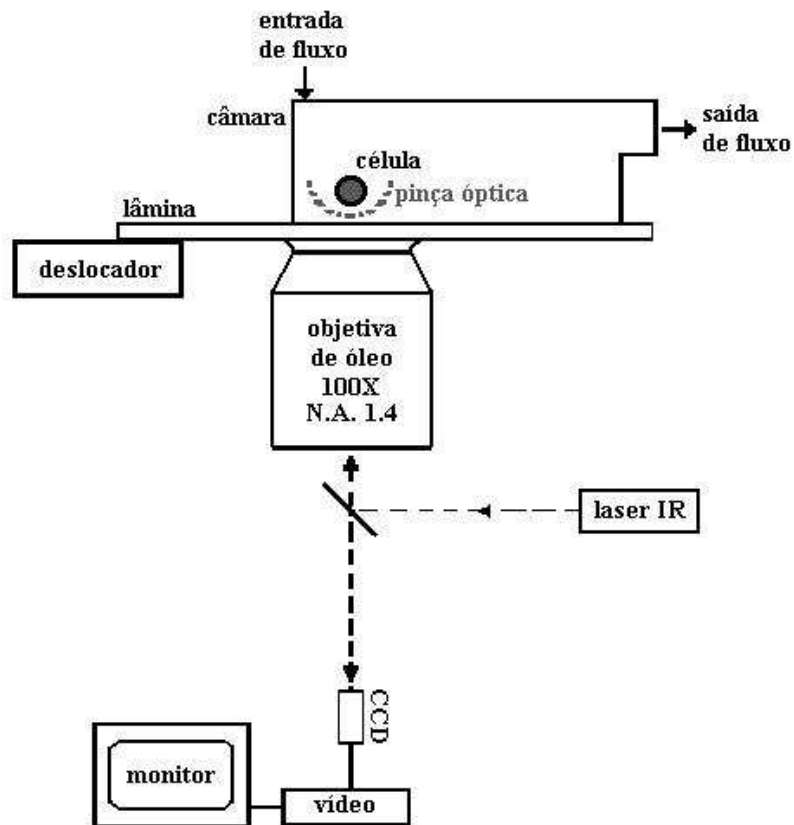


Figura 5.3: Esquema de nossa montagem experimental

Um deslocador xyz é utilizado para movimentarmos a lamínula do microscópio, e conseqüentemente a câmara com as células, e desta forma escolhermos, capturarmos e aprisionarmos uma célula. Como foi dito na seção anterior, a célula é aprisionada o mais próximo possível da entrada de fluxo da câmara.

# Capítulo 6

## Material e método de cultura celular

Células MDCKs (fornecidas por Dulce Cazarine - UNIFESP), passagens 28 a 35, são crescidas em garrafas próprias de cultura celular (Nalge Nunc International) em meio de cultura do tipo D-MEM/F-12 [Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (Ham) 1:1; com L-glutamina e hidrocloreto de piridoxina, sem tampão HEPES e sem bicarbonato de sódio - GIBCO] contendo 1 mM de HEPES e 10 ml de antibiótico-antimicótico (com 10.000 unidades/ml de sódio penicilina G, 10.000 microgramas/ml de sulfato de streptomina e 25 microgramas/ml de anfotericina B em 0,85% de salina - GIBCO), suplementado com 10% de soro do tipo Fetal Bovine Serum (FBS - GIBCO). A cultura é mantida em estufa a 37°C e em 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico.

O meio de cultura é trocado três vezes por semana. As células são usadas quando a confluência, dentro da garrafa, está em torno de 50% - 70% para facilitar o desprendimento de uma célula da outra para realização dos experimentos.

O processo de desprendimento das células para estudos é realizado alguns minutos antes do experimento de fato. Para isto, lavamos as células com 1ml de

Dulbecco's Phosphate - Buffered Saline (D-PBS; sem cloreto de cálcio e sem cloreto de magnésio - GIBCO BRL) e as expomos a uma solução de 0.2 ml de tripiscina (0,25% de tripiscina pura e 0,03% de EDTA) em 0,4ml de PBS, pH = 7.2, encubamos por 3 min a 37°C e em 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico. Células isoladas são suspensas e 50% da solução é imediatamente transferida para 5ml de meio de cultura contendo 0, 18, 36 ou 54 nM de ADH (*Arg*<sup>8</sup> Vasopressin - BACHEM); os 50% restantes são transferidos para uma nova garrafa de cultura contendo 5ml de meio de cultura.

Meios de cultura a 500mOsm contendo 0, 18, 36 ou 54 nM de ADH são usados para a perfusão hiperosmótica. Estas soluções são preparadas com D-MEM/F-12 ajustado para 500mOsm através da adição de 100mM de NaCl.

# Capítulo 7

## Protocolo de medida

O fluxo de água através da membrana celular é obtido pelo choque hiperosmótico de 300mOsm para 500mOsm imposto ao meio extracelular.

Primeiramente introduzimos a solução com as células MDCKs suspensas em seu meio de cultura D-MEM/F-12 (preparado como apresentado no Cap. 5) na câmara de fluxo e mantemos o sistema intacto por alguns instantes para que as células decantem e a seguir pinçamos aquela que se mostra mais saudável (sem sinais evidentes de ruptura ou deformação).

Filmamos então por alguns minutos a célula apenas pinçada para ser utilizada como referência durante as análises.

A seguir, introduzimos, na câmara de fluxo, D-MEM/F-12 acrescido de NaCl (500mOsm), tornando o meio extracelular hiperosmótico. O tempo de resposta para o equilíbrio da osmolaridade externa em torno da célula em nossa câmara de fluxo é da ordem de um a dois segundos. A osmolaridade externa final é mantida constante devido à contínua circulação de meio com a nova osmolaridade (500mOsm) através da câmara com as células.

O tempo de medida é de aproximadamente 10 minutos, o suficiente para que

ocorra a diminuição do volume celular e a subsequente regulação do volume celular (RVI).

Realizamos também experimentos, com o mesmo protocolo apresentado acima, porém com a adição do hormônio antidiurético (ADH). O ADH é utilizado na concentração de 18, 36 ou 54 nM. A concentração de ADH é mantida constante durante cada experimento através da contínua circulação de meio com a devida concentração através da câmara de fluxo.

# Capítulo 8

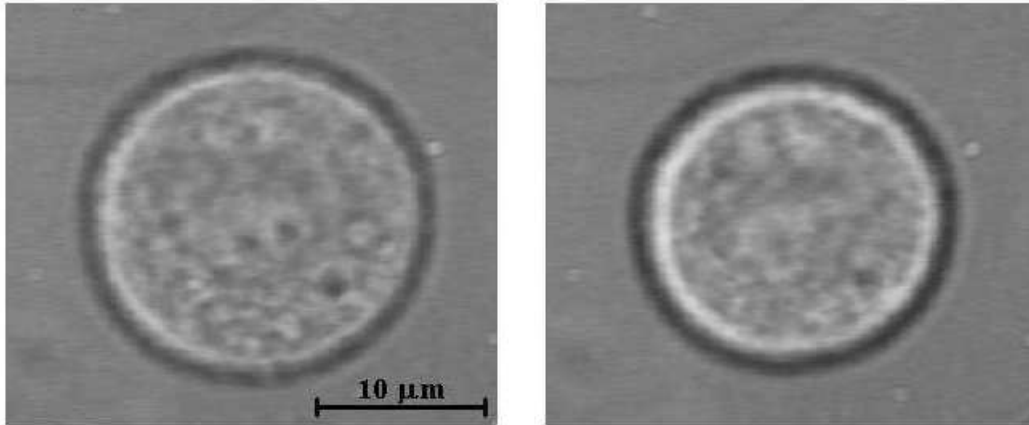
## Aquisição e análise de imagem

Todo o processo descrito no "Protocolo de Medidas" (Cap. 6) é filmado e gravado em fitas de vídeo. Nas figs. 8.1a e 8.1b, podemos observar a imagem de uma célula MDCK pinçada quando esta é banhada por meio isoosmótico e hiperosmótico, respectivamente. As imagens gravadas são digitalizadas como filmes com níveis de cinza de 8-bits, usando um "frame-grabber" Data-Translation e armazenado em um microcomputador Powerpc.

O filme das células é analisado com o programa NIH-ImageJ que identifica e isola os limites externos da célula.

Após este processo, utilizamos um programa desenvolvido pelo ex-aluno de Doutorado Orlando A. Gomes, que adaptamos às nossas necessidades com a colaboração do Dr. Nathan Bessa Viana. Este programa é capaz de calcular a área da seção reta da célula filmada (em  $pixels^2$ ) em função do tempo de filmagem (em frames).

Para encontrarmos o valor da área em centímetros<sup>2</sup>, calibramos nosso sistema com o auxílio de uma régua micrométrica. Esta régua é colocada sobre a lâmina e focalizada. A seguir filmamos a régua em várias posições. Analisamos então o



**Figura 8.1:** Imagens obtidas através de uma câmera CCD da célula MDCK pinçada quando esta estava sendo banhada por a) meio isoosmótico e b) meio hiperosmótico.

filme com a régua de calibração com o programa NIH-ImageJ e obtemos o valor, em pixels, do intervalo entre cada marcação da régua (que equivale a  $10\mu m$ ). Obtemos uma relação 9.8 pixels por micrômetro para nosso sistema. Utilizando esta relação e o fato de que 1 frame equivale a  $1/30$  segundos, podemos calcular a área da seção reta da célula filmada em centímetros<sup>2</sup> em função do tempo em segundos.

Como nossa célula permanece suspensa através do pinçamento-óptico e, conseqüentemente, mantém um formato esférico, podemos enfim obter o valor do volume da célula (em  $cm^3$ ) em função do tempo (em segundos) e conseqüentemente, construir as curvas de volume versus tempo para nossos experimentos.

As curvas de volume versus tempo foram ajustadas com o auxílio das equações 4.20 e 4.21 apresentadas no capítulo 4. Destes ajustes nós obtivemos a permeabilidade à água, a taxa de influxo de soluto e o volume regulatório, volume osmoticamente inativo da célula analisada.

# Capítulo 9

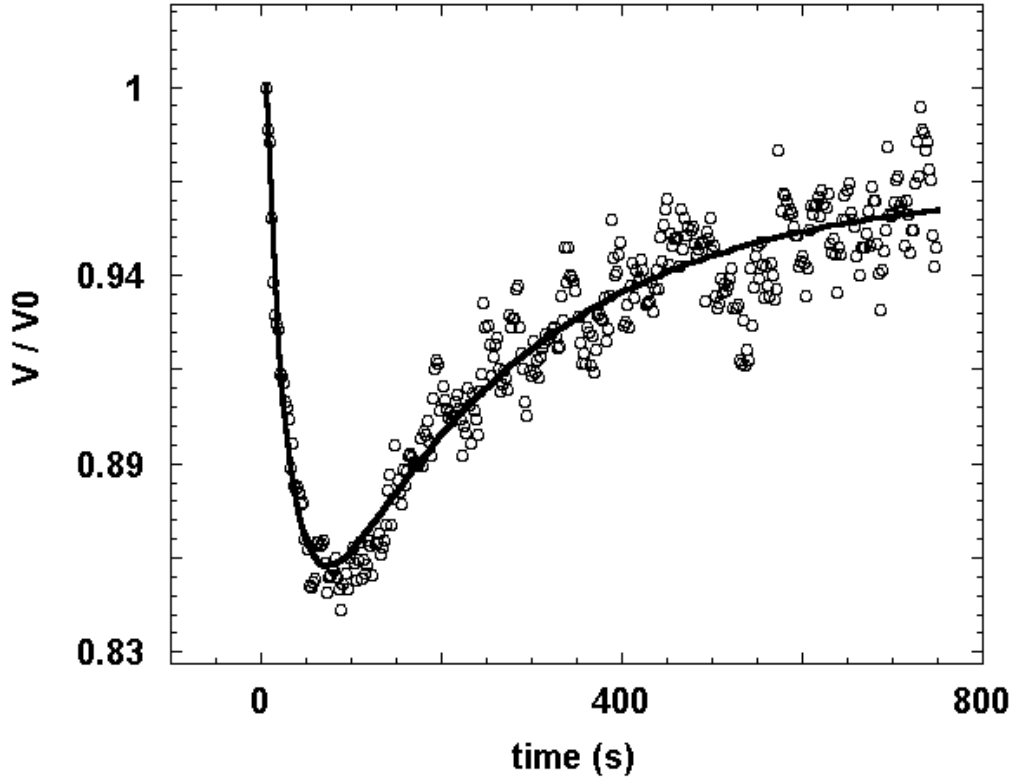
## Resultados e discussão

### 9.1 Células do tipo MDCK submetidas a choque hiperosmótico sem adição do hormônio anti-diurético (ADH)

A fig.9.1 mostra uma curva obtida por nosso método quando a célula MDCK, inicialmente banhada por um meio isoosmótico (300mOsm), sofre um choque hiperosmótico promovido pelo fluxo de meio com adição de NaCl a 500mOsm de osmolaridade, à temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}C$ ).

Podemos observar claramente na Fig. 9.1 que há dois processos bastante distintos durante a evolução temporal do volume celular. Num primeiro instante, observamos que o volume celular diminui devido à diferença de concentração entre o meio externo ( $\sim 500\text{mOsm}$ ) e o meio interno ( $\sim 300\text{mOsm}$ ) à célula. Porém, após alguns minutos ( $\sim 2$  minutos) observamos que o volume celular volta a aumentar, apesar de não modificarmos a concentração externa de soluto. Como vimos nos capítulos 3 e 4 desta tese, este último evento ocorre devido a um processo conhecido como RVI (regulatory volume increase) que é um tipo de regulação do volume celular responsável por criar mecanismos responsáveis pelo aumento do volume celular até





**Figura 9.1:** Evolução temporal do volume normalizado da célula MDCK da Fig.8.1, após choque hiperosmótico de 300 mOsm para 500 mOsm. Os círculos são os pontos experimentais e a curva contínua é o ajuste usando a equação 4.37. Com o ajuste desta curva obtivemos os seguintes parâmetros  $P = 6.6\mu m/s$ ,  $\alpha = 8.5 \times 10^{-10} mol/s.cm^2$ ,  $V_R/V_0 = 0.95$  e  $b/V_0 = 0.52$ .

um novo volume de equilíbrio, que denominamos volume regulatório [10, 11], numa tentativa de manter o volume da célula aproximadamente constante, para condições externas diversas.

Ajustamos a curva da Fig.9.1 utilizando a equação 4.37 (ver Capítulo 4). Os círculos, na figura, representam nossos dados experimentais e a curva contínua representa o ajuste usando a equação 4.37. Com este ajuste, nós obtivemos  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ , A, B e  $V_R$  e, usando as equações 4.38, 4.39, 4.40 e 4.41, obtivemos os valores para

a permeabilidade, a constante  $\alpha$ , o volume regulatório e o volume osmoticamente inativo. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 9.1. Para o experimento representado na figura 9.1 obtivemos os seguintes parâmetros  $P = 6.6\mu m/s$ ,  $\alpha = 8.5 \times 10^{-10} mol/s.cm^2$ ,  $V_R/V_0 = 0.95$  e  $b/V_0 = 0.52$ . Zelenina et al. [19] obtiveram os seguintes parâmetros  $P = 2.7\mu m/s$  e  $b/V_0 = 0.57$  (valor estimado) e Farinas et al. [18] obtiveram  $P = 7.5\mu m/s$  a  $P = 24\mu m/s$ , dependendo de qual lado da célula na monocamada (apical ou basolateral) a medida foi realizada (uma distinção que nós não podemos fazer já que estamos trabalhando com células individuais isoladas). Não encontramos na literatura outro modelo matemático onde o volume regulatório ou a constante  $\alpha$  tenham sido analisados quantitativamente. Porém, podemos observar claramente que o último parâmetro ( $\alpha$ ) está relacionado com o transporte (fluxo) de osmólitos através da membrana para a regulação do volume celular.

Nossa célula apresenta semelhança com células do túbulo distal do rim (ver capítulo 2 e 3), e por isto, sem a presença do ADH, ela não possui muitas aquaporinas em sua membrana apical. Por isto, na ausência de ADH, haverá apenas uma pequena permeabilidade à água através da membrana (permeabilidade basal).

No Capítulo 4, obtivemos uma equação, que nos fornece uma estimativa para o número de canais existentes na membrana celular (Eq. 9.1), da forma

$$N \approx 10^{18} P_m A_m, \quad (9.1)$$

onde  $N$  é o número de canais na membrana,  $P_m$  e  $A_m$  são a permeabilidade e área da membrana, respectivamente.

Para o experimento representado na figura 9.1 teremos

$$N \approx 10^{18}(6,6 \times 10^{-6})(1,3 \times 10^{-9}) \approx 9 \times 10^3 \text{ canais.} \quad (9.2)$$

O número médio de canais existentes na membrana quando não há adição de ADH pode ser observado na Tabela 9.1.

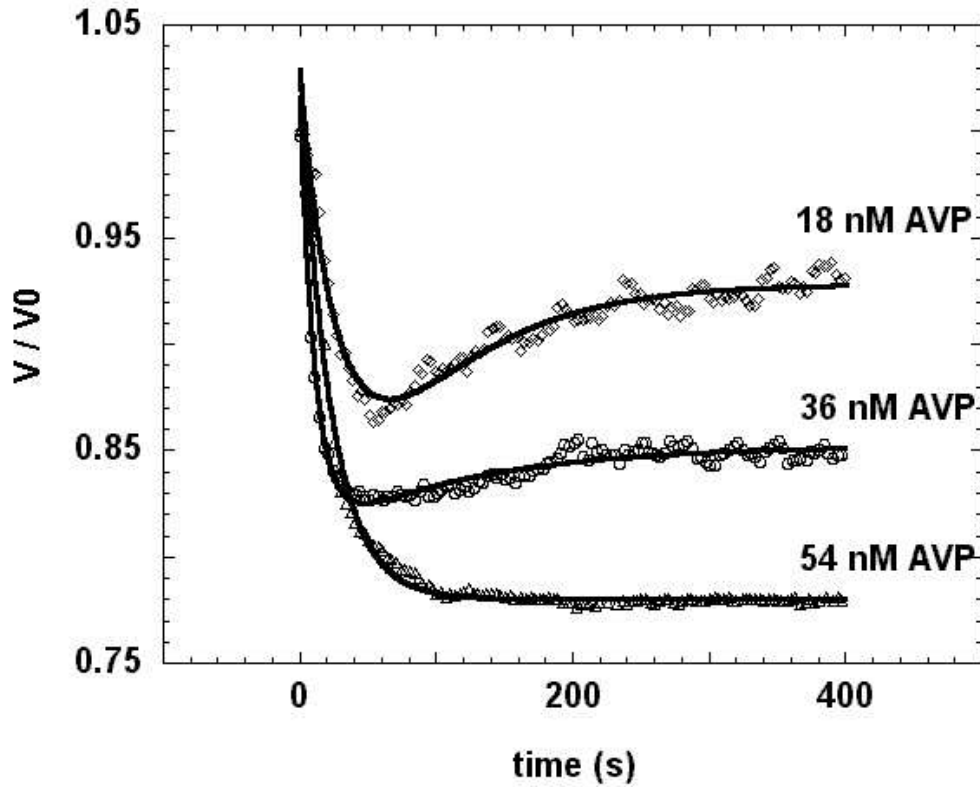
## 9.2 Células do tipo MDCK submetidas a um choque hiperosmótico com adição do hormônio antidiurético (ADH)

Realizamos experimentos com adição do ADH. O ADH como foi mostrado no capítulo 3 é conhecido por ativar mecanismos intracelulares capazes de aumentar a produção, estocagem e transporte, até à membrana apical das células, de aquaporinas do tipo AQP-2. Este processo aumenta a permeabilidade celular à água [24, 25, 30, 53].

Os dados apresentados na Fig. 9.2 foram obtidos quando a célula MDCK, inicialmente banhada por um meio isoosmótico (300mOsm), sofre um choque hiperosmótico promovido pelo fluxo de meio com adição de NaCl a 500mOsm de osmolaridade, juntamente com a adição de 18, 36 e 54nM de ADH, à temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ C$ ). Observamos que concentrações de ADH acima de 54nM fazem com que a célula fique muito fraca e em poucos minutos, provoca a ruptura da membrana celular.

Cada concentração de ADH foi mantida constante durante cada experimento, já que o meio circulava continuamente através da câmara de fluxo.

Podemos observar claramente, da curva representada na Fig.9.2, que durante os primeiros instantes de experimento, o volume celular diminui devido ao choque osmótico. Para pequenas concentrações de ADH observamos que após a diminuição inicial do volume, a célula passa pelo processo de regulação do volume celular (RVI),



**Figura 9.2:** Evolução temporal do volume normalizado de uma célula MDCK após um choque hiperosmótico de 300 mOsm a 500 mOsm: os losângulos representam os dados relativos às medidas realizadas com concentração de 18nM, os círculos para concentração de 36 nM e triângulos para 54 nM de ADH. As curvas contínuas foram ajustadas utilizando a Eq. 4.37

porém observa-se que o volume regulatório é menor que o observado para medidas sem ADH. Com o aumento da concentração de ADH, o volume regulatório diminui até que deixamos de observar o RVI.

As curvas obtidas com adição de ADH foram ajustadas usando a Eq. 4.37 e com o auxílio das equações 4.38, 4.39, 4.40 e 4.41, encontramos os valores de perme-

abilidade à água, volume osmoticamente inativo, volume regulatório e constante  $\alpha$ . O número de canais por onde há fluxo de água na membrana foi estimado utilizando a Eq. 9.1. Na tabela 9.1 podemos observar um sumário dos resultados obtidos com e sem a adição da ADH no meio extracelular.

**Tabela 9.1 - Valores para permeabilidade à água, constante  $\alpha$ , volume regulatório, volume osmoticamente inativo e número de canais na membrana.**

AVP (nM)	$\alpha$ ( $\times 10^{-10} mol/s.cm^2$ )	$V_R$ % $V_0$	$P$ $\mu m/s$	$b$ % $V_0$	$N^*$ $\times 10^3$ canais
0	$8.0 \pm 1.5$	$94 \pm 6$	$5.2 \pm 2.1$	$63 \pm 6$	7
18	$6.1 \pm 5.2$	$90 \pm 3$	$9.4 \pm 3.5$	$56 \pm 15$	13
36	$13 \pm 3$	$85 \pm 3$	$15.1 \pm 4.5$	$68 \pm 4$	21
54	NR	NR	$16.6 \pm 6.1$	$57 \pm 12$	23

NR - Nenhuma ou pouca osmorregulação (RVI) que não pode ser medida durante o nosso intervalo de análise (em torno de 10 minutos). As médias foram realizadas sobre os resultados de pelo menos 10 células distintas para as concentrações de zero e 54 nM e para 5 células distintas para as outras concentrações.

\*  $N$  é apenas uma estimativa do número de canais na membrana.

Vemos que, para altas concentrações de ADH, devido ao fato de não haver, ou ser muito pequeno, o processo de osmorregulação, não foi possível encontrarmos valores relacionados com os parâmetros  $V_R$  e  $\alpha$ . Isto é de se esperar, já que estes parâmetros estão intimamente relacionados com o RVI.

Como era esperado, o aumento da concentração de ADH, aumenta a permeabilidade à água e o número de canais para transporte de água através da membrana. Não encontramos na literatura nenhum estudo sobre a influência do ADH sobre o processo de RVI. Porém, nossos dados indicam que a presença deste hormônio do meio externo à célula inibe o processo de regulação do volume celular.

# Capítulo 10

## Conclusão

Um dos objetivos mais importantes deste trabalho foi o desenvolvimento de uma técnica experimental, onde unimos a pinça-óptica e a videomicroscopia, para estudos de transporte de água em células individuais, isoladas e suspensas. Acreditamos que esta técnica pode ser de grande utilidade no estudo da influência de certas substâncias no transporte de água através de uma célula sem a interferência de outras células vizinhas ou do substrato. Esta técnica também possui a vantagem de fornecer dados diretos da variação do volume celular em função do tempo de medida, sem a necessidade da introdução de substâncias fluorescentes e/ou radioativas para obtenção destes resultados.

Estudos sobre a permeabilidade celular à água e a influência do hormônio anti-diurético (ADH) vem sendo feitos na literatura através de outras técnicas tais como a microscopia de filtragem espacial, confocal e fluorescência [17–19]. Porém, a maior parte destes estudos analisam monocamadas de células, obtendo, de forma indireta, valores estatísticos para as grandezas analisadas.

Neste trabalho, estudamos o transporte de água através da membrana de células MDCK, devido à variação osmótica do meio extracelular e a variação da

permeabilidade com a adição de um hormônio anti-diurético (ADH).

Analizamos a influência da variação osmótica, com e sem a adição de ADH na permeabilidade à água da célula MDCK. Observamos que durante o processo a célula inicialmente retrai o volume, devido à perda passiva de água e, a seguir, volta a aumentar de volume devido a um processo de regulação de volume conhecido como RVI.

Um modelo teórico para a análise de permeabilidade celular à água foi proposto por Farinas et al. [16] e é utilizando este modelo que outros grupos vem ajustando seus dados [16–20]. Este modelo possui apenas um tempo característico, relacionado com o transporte passivo de água.

Propusemos neste trabalho um modelo fenomenológico simplificado onde levamos em conta, além do transporte passivo de água, o processo de RVI, introduzindo assim uma nova escala de tempo no problema.

O estudo da influência do ADH na permeabilidade mostrou que, além do aumento da permeabilidade da membrana celular à água, este hormônio inibe o processo de RVI da linhagem celular com a qual trabalhamos.

Estamos iniciando novos estudos, relacionados com a variação na permeabilidade celular à água, utilizando um peptídeo conhecido como Ang-(1-7). Este peptídeo é uma subsequência biologicamente ativa do sistema renina-angiotensina (ver Capítulo 2) [30,32,54]. Sabe-se que a Ang-(1-7), além de outras funções, possui atividade anti-diurética potente em ratos submetidos a sobrecarga hídrica e aumenta a reabsorção de água em túbulos proximais e ductos coletores intramedulares. Como proposta de trabalho futuro, será analisado como a Ang-(1-7) pode agir sobre a célula no sentido de mudar sua permeabilidade, tanto agindo individualmente ou juntamente com o ADH.

# Referências Bibliográficas

- [1] Imagem obtida na página [www.sbn.org.br/rim.htm](http://www.sbn.org.br/rim.htm).
- [2] Imagem obtida na página [www.biomania.com.br/corpo\\_humano/excrecao.php](http://www.biomania.com.br/corpo_humano/excrecao.php).
- [3] G.M. Preston, T. P. Carrol, and P. Agre W. P. Guggino. Appearance of water channels in xenopus oocytes expressing red cell chip28 protein. *Science*, 256:385, 1992.
- [4] A. S. Verkman and A. K. Mitra. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278(1):F13–F28, 2000.
- [5] P. Agre. Aquaporin water channels in kidney. *J Am Soc Nephrol*, 11(4):764–777, April 2000.
- [6] M. L. Zeidel. Recents advances in water transport. *Semin. Nephrol*, 18:167–177, March 1998.
- [7] A. G. Lopes and W. B. Guggino. Volume regulation in the early proximal of the necturus kidney. *J. Membrane Biol.*, 97:117–125, 1987.
- [8] M. A. Linshaw. Selected aspects of cell volume control in renal cortical and medullary tissue. *Pediatr. Nephrol.*, 5:653–665, 1991.



- [9] L. F. Onuchic I. R. Arenstein, C. Caruso-Neves and A. G. Lopes. Mechanisms of cell volume regulation in the proximal segment of the malpighian tubule of *Rhodnius neglectus*. *J. Membrane Biol.*, 146:47–57, 1995.
- [10] M. Ritter, M. Steidl, and F. Lang. Inhibition of ion conductances by osmotic shrinkage of madin-darby canine kidney cells. *Am. J. Physiol*, 261(Cell Physiol. 30):C602–C607, 1991.
- [11] S. Borgmann and A. Dörge. Adaptation of madin-darby canine kidney cells to hypertonic medium: An electron microprobe analysis. *Kidney Int*, 54(Suppl. 67):S133–S135, 1998.
- [12] L. N. Csonka and W. Epstein. *Osmoregulation, em: Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, volume 1. ASM Press, Washington, D. C, 2nd edition, 1985. editor-in-chief Frederick C. Neidhardt.
- [13] A. Ashikin and J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235:1517–1520, 1987.
- [14] K. Svoboda and S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:247–285, 1994.
- [15] N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita. Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere. *Phys. Rev. E*, (65):041921, 2002.
- [16] J. Farinas, V. Simanek, and A. S. Verkman. Cell volume measured by total internal reflection microfluorimetry: Application to water and solute transport in cells transfected with water channel homologs. *Biophys. J.*, 68:1613–1620, April 1995.

- [17] M. M. Timbs and K. R. Spring. Hydraulic properties of mdck cell epithelium. *J Membrane Biol*, 153:1–11, 1996.
- [18] J. Farinas, M. Kneen, M. Moore, and A. S. Verkman. Plasma membrane water permeability of cultured cells and epithelia measured by light microscopy with spatial filtering. *J Gen Physiol*, 110:283–296, September 1997.
- [19] M. Zelenina and H. Brismar. Osmotic water permeability measurements using confocal laser scanning microscopy. *Eur Biophys J*, 29:165–171, 2000.
- [20] K. Maric, B. Wiesner, D. Lorenz, E. Klussmann, and W. Rosenthal. Cell volume kinetics of adherent epithelia cells measured by laser scanning reflection microscopy: determination of water permeability changes of renal principal cells. *Biophys. J.*, 80:1783–1790, 2001.
- [21] H. H. Ussing. Relationship between osmotic reactions and active sodium transport in the frog skin epithelium. *Acta Physiol. Scand.*, 63:141–155, 1965.
- [22] S. C. Herbert. Hypertonic cell volume regulation in mouse thick limbs: Adh dependency and nephron heterogeity. *Am. J. Physiol.*, 250:C907–C919, 1986.
- [23] T. Zeuthen. General models for water transport across leaky epithelia. *Int. Rev. Cytol.*, 215:285–317, 2002.
- [24] S. Nielsen, C-L. Chou, D. Marples, E. I. Christensen, B. K. Kishore, and M. A. Knepper. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-cd water channels to plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92:1013–1017, 1995.

- [25] P. M. T. Deen, J. P. L. Rijss, S. M. Mulders, R. J. Errington, J. VanBaal, and C. H. VanOs. Aquaporin-2 transfection of madin-darby canine kidney cells reconstitutes vasopressin-regulated transcellular osmotic water transport. *J. Am. Soc. Nephrology*, 8:1493–1501, 1997.
- [26] J. F. Laycock and J. Hanoune. From vasopressin receptor to water channel: intracellular traffic, constraint and by-pass. *J. Endocrinol.*, 159:361–372, 1998.
- [27] J. Rutishauser and P. Kopp. Aquaporin-2 water channel mutations and nephrogenic diabetes insipidus: new variations on a theme. *Eur. J. Endocrinol.*, 149:137–139, 1999.
- [28] S. H. Madin and N. B. Darby. Madin-darby canine kidney cells. *American Type Culture Collection Catalogue os Strains*, 2:574–576, 1958.
- [29] M. M. Aires. *Fisiologia Básica*. Ed. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1985.
- [30] M. M. Aires. *Fisiologia*. Ed. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 2nd edition, 1999.
- [31] D. W. Seldin and G. Giebisch. *The Kidney: physiology and pathophysiology*, volume 1. Raven Press, 2th edition, 1992.
- [32] R. A. S. Santos and M. J. Campagnole-Santos. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27:1033–47, 1994.
- [33] M. A. Knepper. The aquaporin family of molecular water channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:6255–6258, July 1994.

- [34] M. A. Knepper, J. B. Wade, J. Terris, C. A. Ecelbarger, D. Marples, B. Mandon, C. Chou, B. K. Kishore, and S. Nielsen. Renal aquaporins. *Kidney Int*, 49:1712–1717, 1996.
- [35] D. Brown, T. Katsura, and C. E. Gustafson. Cellular mechanisms of aquaporin trafficking. *Am J Physiol*, 275(3Pt2):595–600, September 1998.
- [36] M. Giocondi and C. Le Grimellec. Water permeation in madin-darby canine kidney cells is modulated by membrane fluidity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1064:315–320, 1991.
- [37] D. T. Ward, T. G. Hammond, and H. W. Harris. Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin-2 containing vesicles. *Annu Rev Physiol*, 61:683–687, 1999.
- [38] F. Martinez and J. L. Reyes. Prostaglandin receptors and hormonal actions on water fluxes in cultured canine renal cells (mdck line). *J Physiol*, 347:533–543, 1984.
- [39] D. L. Connolly, C. M. Shanahan, and P. L. Weissberg. The aquaporins. a family of water channel proteins. *The Int J Bioch and Cell Biol*, 30:169–172, 1998.
- [40] W. R. Paulino. *Biologia Atual*, volume 2. Editora Ática S.A, São Paulo, 4nd edition, 1990.
- [41] R. Ray et al. *ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, volume 21. 7th edition, 1992.
- [42] J. Liu, J. R. Han, C. C. Liu, M. Suiko, and M. C. Liu. Identification of a putative tyrosine-o-sulphate (tyrs) receptor possibly functioning in the biosynthetic

- transport of tyrosine-sulphated proteins in madin-darby canine kidney cells. *Biochem. J.*, 294:407–417, 1993.
- [43] G. van Meer and W. van't Hof. Epithelial sphingolipid sorting is insensitive to reorganizations of the golgi by nocodazole, but is abolished by monensin in mdck cell by brefeldin a in caco-1 cells. *J. Cell Sci*, 104(Pt3):833–842, 1993.
- [44] A. S. Verkman, L. Shi, A. Frigeri, H. Hasegawa, J. Farinas, A. Mitra, W. Skach, D. Brown, A. N. van Hoek, and T. Ma. Structure and function of kidney water channels. *Kidney Int*, 48:1069–1081, 1995.
- [45] D. Marples. Aquaporins: roles in renal function and peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 21(2):212–218, 2001.
- [46] T.H. Kwon, H. Hager, L. N. Nejsun, M. L. Andersen, J. Frokiaer, and S. Nielsen. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin Nephrol*, 21(3):231–238, 2001.
- [47] J. B. Heymann, P. Agre, and A. Engel. Progress on the structure and function of aquaporin 1. *J Struct Biol*, 121:191–206, 1998.
- [48] R. K. Hobbie. *Intermediate Physics for Medicine and biology*. Biological Physics. AIP Press, New York, 3 edition, 1997.
- [49] D. Halliday, R. Resnick, and K. S. Krane. *Física*, volume 2. LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., Rio Janeiro, 4th edition, 1996.
- [50] S. P. Smith, S. R. Bhalotra, A. L. Brody, E. K. Boyda B. L. Brown, and M. Prentiss. Inexpensive optical tweezers for undergraduate laboratories. *Am J Phys*, 67(1):26–35, 1999.

- [51] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys Rev Lett*, 24:156, 1970.
- [52] U. Agero, C. H. Monken, C. Ropert, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita. Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy. *Phys Rev E*, 67(5):051904, 2003.
- [53] D. T. Ward, T. G. Hammond, and H. W. Harris. Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin2-containing vesicles. *Annu Rev Physiol*, 61:683–87, 1999.
- [54] A. C. Simoes e Silva, N. C. Baracho, K. T. Passaglio, and R. A. S. Santos. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*, 30(4):503–513, April 1997.