CARLOS PEDRO FONTES OLIVEIRA

Transporte Iónico

em

Anodonta cygnea

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

UNIVERSIDADE DO PORTO

Porto, 2004

Transporte iónico em Anodonta cygnea

por

Carlos Pedro Fontes Oliveira

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, sob a orientação da Professora Doutora Augusta Maria Ferreira Rebelo da Costa .

O Decreto-Lei n.º 388/70, art. 8, § 2, refere:

"É admitido na elaboração da dissertação o aproveitamento, total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados, mesmo em colaboração, devendo, neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal".

Neste sentido, integram esta dissertação resultados nos trabalhos listados seguidamente, para os quais contribuímos pessoalmente, preparando todo o material experimental, procedendo às determinações analíticas, organização dos resultados e redacção do texto, em colaboração com os restantes autores.

Lista de trabalhos submetidos, publicados ou em preparação, cujos resultados integram esta Tese:

1- Trabalhos enviados para publicação:

Oliveira, P.F., Lopes, I.A., Barrias, C., Rebelo da Costa, A. (2004). H^+ ATPase of crude homogenate of the Outer Mantle Epithelium of Anodonta cygnea (Comp. Biochem. Physiol).

2 - Resumos publicados em revistas internacionais

Oliveira, P.F., Lopes, I.A., Barrias, C. e Rebelo da Costa, A.M. (1999). The proton pump of the outer mantle epithelium of Anodonta cygnea. Journal of Bioscience 24 (1): 133.

3- Trabalhos em preparação

Oliveira, P.F., Ferreira, H.G., Rebelo da Costa, A. (2004) Manganese effect on intracellular calcium measurements in cells of the OME of *Anodonta cygnea* using fluorescent probes.

Oliveira, P.F., Rebelo da Costa, A., Ferreira, H.G. (2004) Mathematical model of the ionic transport in the Outer Mantle Epithelium of *Anodonta cygnea.*

Oliveira, P.F., Ferreira, H.G., Rebelo da Costa, A.. (2004) Intracellular calcium regulation in cells of the Outer Mantle Epithelium of *Anodonta cygnea.*

Oliveira, P.F., Ferreira, H.G. Rebelo da Costa, A (2004) Intracellular pH regulation in cells of the Outer Mantle Epithelium of *Anodonta cygnea.*

4 - Foram ainda apresentadas comunicações sob a forma de painel em reuniões internacionais (3) e em reuniões nacionais (2).

A realização do trabalho experimental que conduziu à elaboração desta tese foi suportada financeiramente por uma bolsa de Doutoramento, com a referência PRAXIS XXI/BD/16260/98 atribuída pela **Fundação para a Ciência e a Tecnologia**, e pelo **FSE** no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

Resumo 11

Summary 13

Sommaire 15

1. Introdução 17

Biomineralização 19
Transporte transepitelial de cálcio 22
Mecanismos de regulação do pH intracelular 24
V-ATPases 28
Anodonta cygnea 30
Contexto, objectivos e plano geral do trabalho 33

2. A Técnica de Epi-fluorescência 37

Introdução 39
Fluorescência de rácio ("ratio fluorescence") 39
Carregamento e processamento de sondas iónicas fluorescentes. Princípios gerais. 40
Instrumentação utilizada e sua montagem 42
Calibrações do sistema de epifluorescência 45
Câmara de observação e Sistema de perfusão 49

3. Regulação do cálcio no EEM 51

Introdução 53
Material e Métodos 55
Material Biológico 55
Isolamento das células de EEM 55
Viabilidade das células 56
Determinação da [Ca^{2+}] intracelular utilizando a sonda Fura-2 56
Carregamento da sonda 57
Determinação da fluorescência de fundo 58
Calibração da Sonda 59
Determinação da [Ca^{2+}] intracelular utilizando a sonda Mag-fura-5 60
Protocolo utilizado 60
Técnica de Confocal 60
Instrumentação utilizada 61
Distribuição do Ca^{2+} intracelular. Carregamento da sonda. 61
Soluções utilizadas 61
Resultados 62
Determinação da [Ca^{2+}] intracelular com a sonda Fura-2 62
Constante de dissociação do Fura-2 62
Determinação da [Ca^{2+}] intracelular 62
Efeito da variação do cálcio livre extracelular na [Ca^{2+}]$_i$ 63
Efeito da Ionomicina na [Ca^{2+}] intracelular 63
Efeito do TPEN na determinação da [Ca^{2+}] intracelular 64
Efeito do TPEN na determinação da [Ca^{2+}] intracelular com a sonda Fura-2 65
Efeito do TPEN na determinação da [Ca^{2+}] intracelular com a sonda Mag-Fura-5 65
Distribuição do Ca^{2+} intracelular 66
Discussão 68

4. Regulação do pH_i no EEM 73

Introdução 75
Material e Métodos 77
Material Biológico 77
Isolamento e viabilidade das células de EEM 77
Determinação do pH intracelular em células isoladas do EEM 77
Carregamento da sonda 78
Calibração 78
Determinação da fluorescência de fundo 79
Protocolos utilizados 79
Soluções utilizadas 80
Resultados 81
Determinação da constante de dissociação da BCECF 81
Determinação do pH intracelular 81
Efeito do NH_4Cl no pH intracelular 82
Efeito de inibidores específicos no pH intracelular 83
Efeito da Bafilomicina A_1 e Concanamicina A 83
Efeito do Amiloride 84
Efeito do ião bicarbonato 85
Efeito da $[Ca^{2+}]$ extracelular no pH intracelular 85
Discussão 88

5. Caracterização Bioquímica da V-ATPase do EEM 93

Introdução 95
Material e Métodos 97
Isolamento e homogeneização do EEM 97
Actividade enzimática 97
Efeito do pH na actividade da V-ATPase 98
Estimulação com Succinato 98
Determinação do conteúdo em proteínas totais. 98
Experiências de voltagem controlada 99
Resultados 100
Efeito da Bafilomicina A_1 e da Concanamicina A na Ccc do EEM: Curva dose-efeito. 100
Caracterização da actividade da V-ATPase 101
Estimulação com succinato 102
Estimulação com ião sulfito 103
Curva dose-efeito da Bafilomicina A_1 e Concanamicina A 103
Efeito da temperatura, do ATP e do pH 104
Efeito de inibidores específicos e não-específicos 106
Discussão 108

6. Modelo Matemático 111

Introdução 113
Descrição do Modelo 116
Geometria 116
Compartimentos extracelulares 116
Compartimento intracelular 117
Sistemas de transporte 119
Princípios de conservação 121
Equações consideradas 122
Estado estacionário: atribuição de valores numéricos 124
O Modelo Dinâmico 127

O Significado do Modelo *128*
Simulações *129*
Efeito da Bafilomicina A_1 na Ccc *129*
Efeito do Diamox na Ccc *131*
Efeito do Amiloride na Ccc *133*
Efeito do DIDS e SITS na Ccc *135*
Efeito da Ubaína na Ccc *138*
Efeito do DIOA na Ccc *140*
Efeito da Bafilomicina A_1 e Amiloride no pHi *142*
Parâmetros e Fluxos *145*
Discussão *150*
Anexo *152*
Fluxos e parâmetros celulares do estádio estacionário *152*
Equações do Modelo *153*
Significado dos símbolos utilizados *168*

7. Conclusões 173

8. Abreviaturas 179

9. Bibliografia 183

Resumo

O principal objectivo deste trabalho é o esclarecimento de mecanismos de transporte iónico presentes no epitélio externo do manto (EEM) de *Anodonta cygnea*. O EEM de *Anodonta cygnea* e dos bivalves em geral é o órgão responsável pela formação e manutenção da concha nestes animais.

Usando a técnica de epi-fluorescência fizeram-se determinações da concentração intracelular do ião Ca^{2+}. A determinação da concentração intracelular desse ião, utilizando as sondas Fura-2 e Mag-fura-5, foi dificultada pela elevada quantidade intracelular de iões Mn^{2+} que se sabe existir neste epitélio. A utilização de um quelante de Mn^{2+} (TPEN) permitiu verificar que a concentração intracelular de Ca^{2+} livre é superior a 0,3 mM. Verificou-se igualmente que a concentração intracelular desse ião é sensível à variação da sua concentração extracelular.

O pH intracelular, determinado com a sonda BCECF, tem um valor de 6,8±0,1. Os inibidores específicos da bomba de protões Bafilomicina A_1 e Concanamicina A provocaram uma diminuição do pH_i, concordante com o efeito desses mesmos na Ccc, que é devida na sua quase totalidade ao funcionamento de uma bomba electrogénica de protões existente na membrana apical das células do EEM.

O Amiloride provocou um aumento da concentração intracelular de H^+. Atribuiu-se este efeito à inibição do trocador Na^+/H^+.

O pH intracelular é igualmente sensível a alterações na $[Ca^{2+}]$ extracelular, diminuindo para 6,35±0,06 quando a concentração varia de 1 para 0 mM e aumentando para 6,93±0,01 quando a concentração varia de 1 para 6 mM. Estes resultados permitem explicar o efeito da concentração de cálcio extracelular na Ccc. O aumento ou diminuição da concentração de H^+ intracelular estimula ou inibe a bomba electrogénica de protões.

A caracterização da V-ATPase presente no EEM permitiu determinar uma actividade máxima dessa bomba em homogeneizados do epitélio de 4,5±1,1 μmol Pi/mg proteína/hora, medida a 27°C, para pH 7,4 e na presença de 4,5-6 mM de ATP. A actividade desta bomba é altamente sensível à presença de ião sulfito, apresentando uma estimulação de cerca de 20 vezes (para Na_2SO_3 200 mM). Actividade desta bomba foi inibida na presença de Bafilomicina A_1 (10 μM), Concanamicina A (10 μM) e DCCD (100 μM). Os resultados obtidos com o ião sulfito e com os inibidores NEM e $NaNO_3$ sugerem a existência de

mecanismo de oxidação-redução responsável pela estimulação verificada. Este mecanismo poderá ocorrer igualmente *in vivo*, estando envolvido na regulação da actividade desta bomba.

O conjunto de resultados experimentais obtidos por Barrias (2003), Coimbra e col. (1988), Machado e col. (1990), Rebelo da Costa (1994) e por Rebelo da Costa e col. (1999a; 1999b), juntamente com alguns dos resultados descritos nesta tese, permitiu a elaboração de um modelo matemático, utilizando o software Berkeley Madonna, que pretende ser uma ferramenta de análise dos modelos para o transporte iónico no EEM propostos anteriormente.

Com este modelo, foi possível fazer a simulação dos resultados experimentais obtidos pelos diferentes autores, mediante a introdução de alguns sistemas de transporte ainda não descritos no epitélio, nomeadamente, canais específicos de Na^+, K^+ e HCO_3^- e o trocador Ácidos Não voláteis/Cl^-.

Summary

The main objective of this work is to contribute to the clarification of the ion transport mechanisms present in the cells of the Outer Mantle Epithelium (OME) of *Anodonta cygnea.* The OME of *Anodonta cygnea* and of bivalves in general is the organ responsible for the formation and maintenance of the shell of these animals.

Using the epi-fluorescence technique we measured the intracellular concentration of ionic calcium. The measurements, using the Fura-2 and Mag-fura-5 probes, were perturbed by the high quantities of intracellular Mn^{2+} known to exist in this epithelium. The use of a Mn^{2+} chelator (TPEN) allowed us to verify that the concentration of intracellular free Ca^{2+} is higher than 0,3 mM. We also verified that the intracellular concentration of that ion is sensitive to variations of its extracellular concentration.

The intracellular pH, measured with the BCECF probe, has a value of 6,8 ± 0,1. The specific inhibitors of the proton pump Bafilomycin A_1 and Concanamycin A, produced a decrease on the pH_i, in accordance with the effect of those compounds on the short-circuit current (Isc), that is mainly due to the operation of a proton pump (V-ATPase) present on the apical membrane of the cells of the OME.

Amiloride produced an increase on the intracellular concentration of H^+. This effect was attributed to the inhibition of the Na^+/H^+ exchanger.

The intracellular pH is also sensitive to changes of the extracellular $[Ca^{2+}]$, diminishing to 6,35±0,06 when the concentration varies from 1 to 0 mM and increasing to 6,93±0,01 when the concentration varies from 1 to 6 mM. These results allowed us to explain the effect of the concentration of extracellular calcium on the Isc. The increase or diminution of the concentration of intracellular H^+ stimulates or inhibits the electrogenic proton pump.

The characterization of the V-ATPASE present on the OME allowed us to determine a maximum activity of that pump in cell homogenates of the OME of 4,5±1,1 μmol Pi/mg protein/hour, measure at 27°C, pH 7,4 and in the presence of 4,5-6 mM of ATP. The activity of this bomb is highly sensitive to the presence of sulfide ion, exhibiting a 20 fold stimulation (for Na_2SO_3 200 mM). This activity was inhibited in the presence of Bafilomycin A_1 (10 μM), Concanamycin A (10 μM) and DCCD (100 μM). The results obtained with sulfide and the inhibitors NEM and $NaNO_3$ suggested the existence of redox mechanism

responsible for the stimulation observed. This mechanism could also occur *in vivo*, being involved in the regulation of the activity of this pump.

The assembly of experimental results obtained by Barrias (2003), Coimbra and col. (1988), Machado and col. (1990), Rebelo da Costa (1994) and Rebelo da Costa and col. (1999ab), jointly with some of the results described in this thesis, allowed us to the elaborate a mathematical model, using the software Berkeley Madonna, that intends be a tool of analysis of the previously proposed models for the ionic transport on the OME. With this model, it was possible to simulate all the experimental results obtained by the cited authors, by means of the introduction of some systems of transport not yet described in the epithelium, namely HCO_3^-, Na^+ and K^+ specific channels and a Non-volatile Acids/Cl^- transporter.

Sommaire

L'objectif principal de ce travail est de contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes de transport ioniques présents dans les cellules de l'Epithelium Externe du Manteau (EEM) de *Anodonta cygnea*. L'EEM de *Anodonta cygnea,* et des bivalves en général, est l'organe responsable de la formation de la coquille de ces animaux.

L'utilisation de la technique d'epi-fluorescence nous a permis de mesurer la concentration intracellulaire de calcium ionique. Les mesures, faites avec les sondes Fura-2 et Mag-fura-5, ont été perturbées par les quantités élevées de Mn^{2+} intracellulaire existantes dans cet epithelium. L'usage d'un chélateur de Mn^{2+} (TPEN) nous a permis de vérifier que la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre est supérieur à 0,3 mM. Nous avons aussi observé que la concentration intracellulaire de cet ion est sensible aux variations de sa concentration extracellulaire.

Le pH intracellulaire, mesuré avec la sonde BCECF, a une valeur de 6,8±0,1. Les inhibiteurs spécifiques de la pompe à protons, Bafilomicine A_1 et Concanamicine A, ont produit une diminution du pH_i. Cette observation est conforme à l'effet de ces composés sur le courant de court-circuit (Ccc), originée en raison de l'opération d'une pompe de proton (la V-ATPase) présente sur la membrane apicale des cellules du EEM.

L'Amiloride a produit une augmentation de la concentration intracellulaire de H^+. Cet effet a été attribué à l'inhibition du transporteur Na^+/H^+.

Le pH intracellulaire est aussi sensible aux changements de concentration de Ca^{2+} extracellulaire. Le pH diminue à 6,35±0,06 quand la concentration varie de 1 à 0 mM et augmente à 6,93±0,01 quand la concentration varie de 1 à 6 mM. Ces résultats nous ont permis d'expliquer l'effet de la concentration de calcium extracellulaire sur le Ccc. L'augmentation ou la diminution de la concentration de H^+ intracellulaire stimule ou inhibe la pompe électrogénique de protons.

La caractérisation de la V-ATPase, présente sur le EEM, nous a permis de déterminer une activité maximum pour cette pompe, dans les extraits de cellules du EEM, de 4,5±1,1 µmol Pi/mg protéine/heure, à 27°C, pH 7,4 et en présence de 4,5-6 mM de ATP. L'activité de cette pompe est extrêmement sensible à la présence d'ions sulfide, présentant une stimulation d'un facteur 20 (par Na_2SO_3 200 mM). Cette activité est inhibée dans la présence

de Bafilomicine A_1 (10 μM), Concanamicine A (10 μM) et DCCD (100 μM). Les résultats obtenus avec l'ion sulfide et les inhibiteurs NEM et $NaNO_3$ suggèrent l'existence d'un mécanisme redox responsable de la stimulation observée. Ce mécanisme aussi pourrait se produire *in vivo*, étant impliqué dans le règlement de l'activité de cette pompe.

Le regroupement des résultats expérimentaux obtenus par Barrias (2003), Coimbra et col. (1988), Machado et col. (1990), Rebelo da Costa (1994) et Rebelo da Costa et col. (1999ab), conjointement avec une partie des résultats décrits dans cette thèse, nous ont permis d'élaborer un modèle mathématique, utilisant le « software » Berkeley Madonna, un outil d'analyse des modèles précédemment proposés pour le transport ionique sur le OME. D'après ce modèle, il était possible de simuler tous les résultats expérimentaux obtenus par les auteurs cités, en introduisant quelques systèmes de transport qui ne sont pas encore décrits dans cet epithelium, à savoir les canaux spécifiques de HCO_3^-, de Na^+ et de K^+ et d'un transporteur Acides non-volatiles/Cl^-.

1. Introdução

A formação de estruturas calcificadas, como a concha dos bivalves, resulta da actividade de células que têm a seu cargo não só a secreção da matriz orgânica, onde se depositam os sais de cálcio, como o transporte de cálcio e outros iões até aos locais de formação dessas estruturas. São ainda responsáveis pela regulação local do pH, contribuindo assim para determinar o sentido dos movimentos de cálcio: do sangue ou hemolinfa para as lacunas onde se dá a precipitação, ou vice-versa.

Biomineralização

Por biomineralização entende-se o processo biológico através do qual um organismo regula a formação de uma estrutura composta por um alto teor de elementos inorgânicos, com funções variadas que vão desde a protecção e suporte mecânico, à locomoção e ao armazenamento de substâncias (Becker e col., 2000).

Existe uma grande diversidade na composição química das estruturas biominerais formadas pelos diferentes organismos, sendo o cálcio o elemento químico mais abundante nessas estruturas. É o constituinte das estruturas ósseas, sob a forma de fosfato de cálcio, e das conchas dos moluscos, sob a forma de carbonato de cálcio (Hasse e col., 2000). Existe ainda sob a forma de oxalatos e sulfatos hidratados em algumas estruturas menos abundantes (Lowenstam e Weiner, 1989).

As duas formas mais abundantes do cálcio nas estruturas biominerais, fosfatos e carbonatos, apresentam baixas solubilidades e energia de malha elevada, o que as torna termodinamicamente estáveis nos sistemas biológicos e por isso tão amplamente distribuídas (Lowenstam e Weiner, 1989; Mann, 2001).

O carbonato de cálcio ($CaCO_3$) pode encontrar-se sob seis formas distintas, com a mesma estequiometria química e estruturas tridimensionais distintas, sendo a calcite e a aragonite as formas mais estáveis. Um biomineral pode ser composto por uma ou mais destas estruturas diferentes. Por exemplo, as conchas dos moluscos são formadas essencialmente de aragonite na parte interna (ou nácar) e de calcite na camada exterior (ou camada prismática) (Mann, 2001; Weiner, 1986).

Para além dos constituintes inorgânicos, as estruturas biominerais são em geral compostas por uma matriz de material orgânico. A matriz é constituída por macromoléculas que desempenham funções na regulação e iniciação dos processos que conduzem à

formação dos biominerais e nas suas propriedades biomecânicas (Hasse e col., 2000; Lowenstam e Weiner, 1989).

São maioritariamente de natureza proteica, podendo ser divididas em dois grupos. Um grupo denominado de macromoléculas acídicas (ou funcionais), composto por proteínas ricas em resíduos de ácido aspártico e glutâmico e aminoácidos fosforilados. Estas proteínas estão frequentemente associadas covalentemente a polissacarídeos, também acídicos (ricos em grupos carbonato ou sulfatos), como por exemplo, proteoglicanos (Marxen e Becker, 2000; Marxen e col., 1998). O segundo grupo são as denominadas macromoléculas de estrutura e possui uma composição mais heterogénea entre os biominerais de diferentes organismos. Entre as características mais comuns dos seus constituintes estão a alta hidrofobicidade e o facto de estabelecerem ligações "cross-linked" entre si. No nácar das conchas de alguns moluscos esta fracção é essencialmente constituída por moléculas de quitina (Lowenstam e Weiner, 1989; Marxen e Becker, 2000; Marxen e col., 1998).

Em resumo, a matriz orgânica é constituída por uma malha de macromoléculas estruturais de natureza hidrofóbica associada a macromoléculas acídicas, que funciona como uma superfície de precipitação (ou nucleação), baixando a energia necessária para que ocorram os processos de biomineralização e mantendo-os sob um controle celular mais efectivo (Marxen e Becker, 2000; Marxen e col., 1998; Weiner, 1986).

Uma vez que a maioria dos organismos que desenvolveram estruturas biominerais evoluiu no sentido da utilização de constituintes inorgânicos e de uma matriz de carácter orgânico com propriedades semelhantes, pode supor-se que desenvolveram estratégias similares na regulação da formação dos biominerais.

Relativamente a esse ponto, a mineralização pode ser classificada como *biologicamente induzida* ou *biologicamente controlada.*

Na *mineralização biologicamente induzida*, os constituintes inorgânicos são precipitados por introdução de perturbações secundárias, como a libertação de produtos finais do metabolismo e de certos iões pelas células para o ambiente que as circunda, ou ainda a elaboração de uma superfície celular adequadamente composta. Uma das características deste tipo de biomineralização é o facto de os biominerais, uma vez formados, se manterem firmemente ligados à superfície celular.

Como estes biominerais são produzidos por deposição adventícia, não se encontram sob controle celular estrito, fazendo com que a sua composição, tamanho, estrutura e organização sejam altamente heterogéneos (Mann, 2001).

Pelo contrário, na *mineralização biologicamente controlada*, os processos que organizam os biominerais são finamente regulados pelas células, de modo a originarem estruturas com partículas de composição e tamanhos idênticos e com uma organização tridimensional definida e complexa. O controle biológico exercido neste tipo de biomineralização é composto por uma série de mecanismos distintos que funcionam conjuntamente para que se origine um determinado produto final.

A delimitação espacial é o processo que ocorre inicialmente, sendo fundamental na determinação da forma e tamanho do biomineral. A formação de um espaço fechado (intra ou extracelular) impede a difusão livre dos componentes do biomineral. Propicia, por isso, a formação da matriz orgânica e o controle da composição do fluido em contacto com o biomineral que se forma (Lowenstam e Weiner, 1989; Mann, 2001).

Para além disso, uma das pré-condições essenciais para que ocorra a mineralização é a de que o fluido, no qual o mineral vai precipitar, se encontre sobre-saturado relativamente aos constituintes inorgânicos do mineral (Lowenstam e Weiner, 1989; Mann, 2001; Rebelo da Costa, 1994).

Por definição, uma solução encontra-se sobre-saturada em determinados componentes quando o produtos das suas actividades (AP) for superior ao produto de solubilidade (K_{ps}) desses mesmos componentes na solução. Nesse caso, a precipitação vai ocorrer até AP ser igual a K_{ps}.

No entanto, a sobre-saturação da solução não é condição suficiente para que se forme uma fase mineral sólida estável. Só quando a energia libertada pela formação da ligação de uma molécula ao agregado (ΔG_L) for superior à energia gasta na criação de uma nova interface sólido-líquido (ΔG_I) é que se forma um agregado estável, ou seja, quando:

$$\Delta G_N = \Delta G_I - \Delta G_L \leq 0.$$

À medida que diminui ΔG_N, aumenta a velocidade de formação do agregado molecular, ou taxa de nucleação. A taxa de nucleação é então dependente de dois factores: o nível de sobre-saturação relativo da solução e da energia interfacial do agregado molecular que se forma.

Com a introdução da matriz orgânica, contendo partículas que estabelecem ligações específicas com os componentes inorgânicos em solução, as células são capazes de fornecer núcleos de precipitação com uma energia interfacial reduzida, promovendo a formação de uma dada conformação cristalina em detrimento de outra. Para além disso, certos

componentes da matriz, quando em solução, podem funcionar como inibidores do processo de nucleação, evitando a formação de núcleos inorgânicos livres em solução e promovendo, assim, a deposição mineral sobre uma superfície sólida específica (Weiner, 1986).

O controlo da composição inorgânica do fluido onde ocorre a mineralização envolve o transporte das espécies iónicas, necessárias à formação do mineral, através da estrutura que faz a delimitação do espaço onde este se forma. Esse processo, embora ocorra de modo distinto quer se trate de vesículas intracelulares ou de estruturas extracelulares, vai envolver sempre, numa visão simplificada, a absorção das espécies iónicas do meio externo e subsequente transporte para o compartimento de mineralização. Uma vez que as membranas fosfolipídicas são praticamente impermeáveis à passagem de espécies iónicas, terão de existir transportadores específicos para que a passagem transcelular dos iões possa ocorrer. Os transportadores membranares, que activa ou passivamente, movimentam os diferentes iões para o compartimento de mineralização estão sob regulação celular, estabelecendo assim um mecanismo de controle directo sobre a composição química do fluido de mineralização (Mann, 2001).

Outros mecanismos de regulação directa da composição química do fluido de mineralização envolvem a acção de enzimas (como a anidrase carbónica) (Boer e Witteveen, 1980; Holm e col., 2001) e a acção de ligandos (como o citrato e o pirofosfato) que podem alterar o nível de sobre-saturação do fluido (Cheng e Pritzker, 1988; van der Houwen e Vaisami-Jones, 2001).

Entre os mecanismos de acção indirecta sobre o nível de sobre-saturação do fluido estão a alteração da força iónica (por alteração da composição iónica em espécies não envolvidas directamente na mineralização, como o Na^+ e o K^+), a extrusão de H_2O do compartimento (com o consequente aumento das actividades iónicas) e o bombeamento de iões H^+ (promovendo alterações no pH do meio, que por sua vez influenciam o estado de equilíbrio ácido base dos aniões do mineral, tais como HCO_3^-/ CO_3^{2-} e HPO_4^{2-}/ PO_4^{3-}, ou ainda alterações do poder complexante de ligandos como o citrato) (Blair, 1998; Dacke e col., 1993; Rebelo da Costa, 1994).

Transporte transepitelial de cálcio

O transporte transepitelial de ião cálcio pode ocorrer por duas vias distintas: a via paracelular e a via transcelular.

A via paracelular envolve a movimentação do Ca^{2+} através das junções intercelulares. É um processo de transporte pouco selectivo, sendo, apesar disso, a via mais importante de transporte do cálcio no epitélio intestinal e renal de alguns animais (Bronner, 1989; Bronner, 1998). O ião Ca^{2+} pode movimentar-se bidireccionalmente, sendo o fluxo líquido determinado pelo gradiente electroquímico que se estabelece entre os diferentes compartimentos ou pelo fluxo em massa de solvente, originado por um gradiente osmótico. Embora esta via seja pouco selectiva, existem evidências que apontam para algum tipo de controle celular, nomeadamente no epitélio intestinal, não estando esse mecanismo todavia esclarecido (Wasserman e Fullmer, 1995).

Ao contrário da via paracelular, o transporte da Ca^{2+} pela via transcelular apresenta grande especificidade, estando sujeito a um controle estrito pela célula. Pode ser realizado a favor ou contra um gradiente electroquímico, implicando este último o gasto de energia metabólica.

Os três passos no transporte transcelular de cálcio são a entrada na célula, a passagem pelo citosol e a saída da célula. A entrada do Ca^{2+}, devido ao gradiente que normalmente se estabelece entre o exterior e o interior das células, é passiva podendo processar-se por meio de canais ou trocadores membranares específicos. Foi descrita a existência de canais de Ca^{2+} no epitélio formador da carapaça de crustáceos (Wheatly e col., 1999) e no manto de bivalves (Barrias, 2003; Beirão, 1989) e de trocadores iónicos membranares no epitélio intestinal de peixes (Flik e col., 1990). Foi igualmente descrita a presença de canais de cálcio em osteoclastos que, não sendo células epiteliais, transportam transcelularmente o cálcio resultante da remodelação do tecido ósseo (Li e col., 2002; Ritchie e col., 1994).

A passagem do Ca^{2+} através do citosol é a etapa que potencialmente apresenta maiores dificuldades para a célula pois esta tem que lidar com o problema da potencial toxicidade intracelular do cálcio. O ião cálcio é o mensageiro intracelular por excelência e é responsável pelo controlo de muitas funções celulares (Greenaway e Farrelly, 1991). Por este motivo a sua concentração intracelular é usualmente mantida dentro de limites estreitos, podendo um aumento perturbar seriamente o normal funcionamento da célula. Na maioria das células a concentração de Ca^{2+} livre no citosol é da ordem de 10^{-7} M.

O transporte de cálcio através da célula pode ser feito sob a forma não ionizada (em agregados calcários) (Ziegler, 1996) ou ligado a proteínas citoplasmáticas com afinidade para este ião (Bawden, 1989; Feher e col., 1992). Pode ainda ocorrer através da internalização em vesículas membranares (Akins e Tuan, 1993a; Akins e Tuan, 1993b; Bielefeld e col., 1992;

Jones e Davis, 1982; Tambutte e col., 1996). Neste tipo de transporte, o cálcio acumula-se na superfície da célula, sendo sequestrado em vesículas membranares. Por um processo denominado de endocitose, as vesículas atravessam então a célula, sendo posteriormente excretadas por exocitose. Está descrito que proteínas do muco produzidas por algum epitélios, por serem carregadas negativamente, podem funcionar como sequestradores de iões Ca^{2+}, produzindo uma interface que propicia este tipo de transporte (Hattan e col., 2001; Marin e col., 2000).

A saída do ião Ca^{2+} da célula, devido ao gradiente electroquímico que normalmente se estabelece entre o meio intra e extracelular, necessita da acção de mecanismos de transporte activos, como a Ca-ATPase (Wasserman e col., 1992; Wasserman e col., 1991), ou facilitados, como o trocador catiónico Na^{+}/Ca^{2+} (Blaustein e Lederer, 1999; Schoenmakers e col., 1993).

Mecanismos de regulação do pH intracelular

O pH intracelular influencia directamente um grande número de processos celulares essenciais para o crescimento e diferenciação das células, como a actividade enzimática, o transporte membranar, a síntese proteica, a comunicação intercelular, entre outros. Não é pois de estranhar que a concentração hidrogeniónica intracelular seja mantida dentro de limites estreitos.

A regulação do pH intracelular é um fenómeno concertado que envolve a acção de tampões intracelulares e proteínas membranares de transporte. Os processos que contribuem para a sua manutenção dentro de limites compatíveis com a vida podem ser divididos em dois tipos distintos: processos de acção rápida e processos de acção lenta (Boron e col., 1981).

Os processos de acção rápida são requeridos em situações de alterações súbitas de pH. Aí, as células recrutam toda uma série de constituintes celulares, que formam os chamados mecanismos de tamponamento celular. Estes mecanismos são constituídos por dois componentes: (1) mecanismos de tamponamento químico e (2) mecanismos de conversão celular de metabolitos (Boron e col., 1981).

Certas proteínas e certos componentes celulares (como o CO_2) podem comportar-se como tampões químicos, contrariando rapidamente as alterações do pH intracelular. O tamponamento químico é uma propriedade de ácidos e bases fracos que podem captar ou libertar iões H^{+} do meio, quando surgem alterações no pH, segundo a reacção:

$$M^n + H^+ \leftrightarrow MH^{n+1}$$

em que M^n é a base fraca de valência n e MH^{n+1} é o ácido fraco conjugado. O poder tampão de uma substância é máximo quando o valor da sua constante de dissociação se iguala à concentração de iões H^+ do meio.

Para além disso, a célula possui também a capacidade de modular certas vias metabólicas, quando em face a alterações súbitas do pH_i. Essas reacções implicam normalmente o gasto ou produção de iões H^+. Convertendo determinados metabolitos ácidos (ex., ácido láctico) em produtos neutros (ex., glucose ou CO_2) ou promovendo reacções como a hidrólise de ATP (com produção de H^+) ou de fosfocreatina (com gasto de H^+), algumas células são capazes de contrariar as variações do pH_i (Folbergrova e col., 1972).

No entanto, estes mecanismos de tamponamento celular fornecem uma solução para minimizar as alterações súbitas do pH_i que, embora rápida, é apenas temporária. São geralmente mais eficazes em situações de sobrecarga ácida e, como seria de prever, têm um poder tampão limitado (Boron e col., 1981).

Para que os valores de pH_i retornem aos verificados em situações de homeostasia celular, é necessária a acção de mecanismos de extrusão das partículas ácidas/básicas, os denominados processos de acção lenta. São processos que envolvem a acção de transportadores de membrana e que são responsáveis igualmente pela manutenção do pH_i nas situações de homeostasia. Os transportadores membranares envolvidos neste tipo de regulação variam entre os diferentes organismos e num mesmo organismo podem variar de tecido para tecido.

Está descrita a participação directa nos processos de regulação do pH_i das seguintes famílias de transportadores:

1. ***H^+-ATPases tipo V*** – Serão objecto de uma descrição detalhado mais à frente. Transportam iões H^+, à custa do consumo de energia metabólica, para o exterior da célula. São inibidos especificamente por Bafilomicina A_1 e Concanamicina A (Drose e Altendorf, 1997).

2. ***H^+/K^+-ATPases*** - Este tipo de P-ATPases foi inicialmente descrito em células gástricas (Im e col., 1985) tendo-se posteriormente verificado a sua existência em células intestinais e renais de mamíferos (Jaisser e Beggah, 1999; Vagin e col., 2002). Actualmente encontram-se divididas em duas subfamílias: H^+/K^+-ATPases gástricas (sensíveis a inibição

por SCH28080 e Omeprazole) e H^+/K^+-ATPases não-gástricas (sensíveis a inibição por Ubaína e altas concentrações de SCH28080).

Ambas apresentam uma estequiometria de transporte de $1K^+:1H^+$, transportando iões K^+ para o citoplasma e iões H^+ para o meio extracelular.

3. ***Trocadores Na^+/H^+*** - Estão descritas duas subfamílias deste tipo de translocador: Trocadores Na^+/H^+ electroneutros e trocadores Na^+/H^+ electrogénicos (Ahearn e col., 1994; Duerr e Ahearn, 1996).

O trocador Na^+/H^+ electroneutro foi inicialmente descrito em oócitos de ouriço do mar (Johnson e Epel, 1976) e em células do epitélio intestinal de rato (Murer e col., 1976), estando actualmente descrito na maioria das células eucariotas (Furimsky e col., 2000). É sensível a inibição por Amiloride (com local de ligação no domínio extracelular). Os mecanismos comuns de regulação desta subfamília envolvem a interacção de moduladores com locais de ligação existentes no domínio citoplasmático do transportador, como iões H^+, iões Ca^{2+} e mensageiros secundários desencadeados pela presença de certas hormonas (Counillon e Pouyssegur, 2000).

Por sua vez, um antiporte electrogénico $2Na^+/1H^+$, envolvido nos processos de calcificação do exosqueleto de crustáceos e equinodermes foi identificado na membrana apical de vários epitélios (intestino, rim, brânquia) de invertebrados (Ahearn e col., 1994; Ahearn e Clay, 1989; Ahearn e Franco, 1990). Apresenta uma estequiometria de transporte de $2Na^+:1H^+$, possuindo igualmente uma afinidade de ligação ao Ca^{2+} que age como inibidor competitivo do transporte de Na^+ (Ahearn e Franco, 1990; Zhuang e col., 1995). Os trocadores desta subfamília são igualmente sensíveis a inibição pelo Amiloride (com local de ligação no domínio extracelular) (Ahearn e col., 1999; Ahearn e col., 1994).

4. ***Transportadores HCO_3^-*** - Esta família de transportadores é constituída por quatro subfamílias distintas: trocadores HCO_3^-/Cl^- dependentes de Na^+, trocadores HCO_3^-/Cl^- independentes de Na^+, transportadores Na^+/HCO_3^- e transportadores K^+/HCO_3^-.

a. ***Trocadores HCO_3^-/Cl^- dependentes de Na^+*** - foram inicialmente descritos em neurónios de invertebrados (Russell e Boron, 1976), sendo posteriormente identificada a sua presença numa variedade de células de vertebrados e invertebrados (Wang e col., 2000). São translocadores sensíveis a inibição por DIDS, SITS e APS (Boron, 2001; Madshus e Olsnes, 1987). Estão usualmente envolvidos na extrusão de ácido das células de animais (Boron, 2001).

b. ***Trocadores HCO_3^-/Cl independentes de Na^+*** - foram inicialmente descritos na membrana citoplasmática de glóbulos vermelhos (Kopito e Lodish, 1985), sendo posteriormente identificados em células renais e gliais (Boyarsky e col., 1988; Grassl e col., 1987). São translocadores sensíveis a inibição por SITS e DIDS. Estão usualmente envolvidos na extrusão de HCO_3^- das células de animais (Boron, 2001).

c. ***Transportadores Na^+/HCO_3^-*** - Estão descritas três classes distintas deste tipo de translocador, todas elas sensíveis a inibição por DIDS, que diferem na estequiometria de transporte.

c.1. ***Na^+/HCO_3^- (1:3)*** - foram inicialmente descritos em células do túbulo renal (Boron e Boulpaep, 1983), estando usualmente envolvidos na extrusão de HCO_3^- das células animais (Boron, 2001; Boron e col., 1997).

c.2. ***Na^+/HCO_3^- (1:2)*** - foram inicialmente descritos em células gliais (Deitmer e Schlue, 1989) e estão usualmente envolvidos na entrada de HCO_3^- para células animais (Boron, 2001; Boron e col., 1997).

c.3. ***Na^+/HCO_3^- (1:1)*** - foram inicialmente descritos em oligodendrócitos (Kettenmann e Schlue, 1988). São transportadores electroneutros que estão usualmente envolvidos na entrada de Na^+ e HCO_3^- para células animais. Ao contrário dos dois transportadores anteriores, são pouco sensíveis a inibição por DIDS (Boron, 2001; Boron e col., 1997).

d. ***Transportadores K^+/HCO_3^-*** - foram inicialmente descritos em células renais (Soleimani e col., 1992), sendo posteriormente identificados em axónios (Hogan e col., 1995). São transportadores sensíveis a inibição por aminas quaternárias (Boron, 2001). Estão usualmente envolvidos na extrusão de HCO_3^- das células animais (Boron, 2001; Boron e col., 1997).

Em suma, as diferentes células são capazes de regular o pH intracelular, modulando a actividade dos diferentes transportadores membranares. Por exemplo, em miócitos do bivalve *Mercenaria campechiensis* a regulação do pH_i é realizada através da participação do trocador HCO_3^-/Cl^- (Ellington, 1993), em hepatócitos de truta através da participação dos transportadores HCO_3^-/Cl^- e Na^+/H^+ (Fossat e col., 1997) e em macrófagos de carneiro através da participação de uma V-ATPase e do trocador Na^+/H^+ (Swallow e col., 1990).

V-ATPases

As H^+-ATPases desempenham um papel fundamental na natureza. Estão presentes nas membranas de todas as células vivas e funcionam na conversão de energia biológica e na homeostasia do pH celular (Gruber e col., 2001; Nelson, 1992).

Existem três classes de H^+-ATPases: P-ATPases, F-ATPases e V-ATPases. As primeiras são bombas que funcionam formando um intermediário fosforilado e são geralmente sensíveis a concentrações baixas de Ortovanadato (Gruber e col., 2001), ao contrário do que acontece com as F e V-ATPases.

As F-ATPases estão presentes em membranas de mitocôndrias, cloroplastos e membranas plasmáticas bacterianas. São bombas que funcionam, geralmente, como ATP-sintetases, sendo inibidas por concentrações baixas de Azida (Gruber e col., 2001; Pedersen e Carafoli, 1987).

As V-ATPases constituem uma família de bombas amplamente distribuídas, tendo sido originalmente sugeridas em membranas de grânulos de cromafina (Kirshner, 1962; Njus e Radda, 1978) e membranas vacuolares de fungos (Bowman e col., 1989; Bowman e Bowman, 1982). Mais recentemente, foi descrita a sua existência na membrana plasmática apical de células epiteliais, de osteoclastos e de células fagocíticas (Ehrenfeld e Klein, 1997; Harvey, 1992a; Martinez-Zaguilan e col., 1993; Rebelo da Costa e col., 1999b).

Estruturalmente as V-ATPases (ou "Vacuolar type ATPases") são descritas como um complexo proteico composto por dois domínios funcionais: um domínio citoplasmático (V_1), onde se dá a hidrólise de ATP, e um domínio transmembranar (V_0), responsável pela translocação dos protões através da membrana (Forgac, 1999; Nelson, 1992; Supek e col., 1992; Zhang e col., 1994).

Parece haver um padrão comum no que diz respeito à composição peptídica dos dois domínios de diferentes V-ATPases, embora existam algumas discrepâncias (Forgac, 1999; Nelson e Harvey, 1999; Supek e col., 1992). O domínio V_1 é composto por 8 subunidades distintas (A-H) apresentando uma estequiometria $\mathbf{A_3B_3C_1D_1E_1F_xG_yH_z}$. O domínio V_0 composto por 5 subunidades distintas (a, d, c, c' e c") apresentando uma estequiometria $\mathbf{a_1d_1c"_1(c,c')_6}$ (Figura 1).

Embora V-ATPases e F-ATPases tenham uma composição estrutural semelhante (no que diz respeito a domínios e subunidades proteicas) diferem sobretudo no que diz respeito

às suas funções e regulação (Fillingame, 1997; Weber e Senior, 1997). Por exemplo, ao contrário do que sucede com as F, as V-ATPases não são capazes de sintetizar ATP, limitando-se a transportar protões, sempre num mesmo sentido, à custa da sua hidrólise (Forgac, 1999; Gruber e col., 2001).

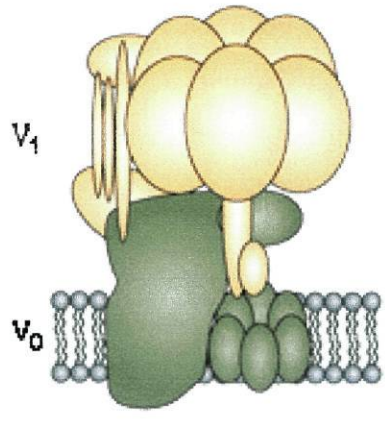


Figura 1. Representação esquemática duma V-ATPase.

As funções das V-ATPases são diversificadas (Harvey, 1992b), sendo responsáveis pela acidificação/alcalinização de compartimentos intra ou extracelulares envolvidos em processos de endocitose, exocitose e armazenamento de solutos (Forgac, 1999); pela energização de membranas (via criação de um gradiente electroquímico) (Sumner e col., 1995), possibilitando o funcionamento de outras proteínas transportadoras, responsáveis pela regulação salina e balanço osmótico (Harvey, 1992a).

Uma vez que as V-ATPases transportam iões H^+, é obvio que têm um papel importante na determinação do pH dos compartimentos de e para onde transportam esses iões. Para o funcionamento normal dos processos celulares que influenciam é determinante que as células mantenham a actividade destas ATPases sob um controlo estrito.

Estão descritos dois mecanismos de regulação directa da actividade das V-ATPases. Um que envolve a dissociação reversível do complexo V_0-V_1, em complexos V_0 e V_1 livres, tornando a bomba incapaz de hidrolizar ATP e de transportar hidrogeniões (Forgac, 1999; Nelson, 1992; Sumner e col., 1995). Esta dissociação é rapidamente revertida, sendo os complexo livres reutilizados. Está descrita a ocorrência *in vitro* deste mecanismo por tratamento das células com agentes caotrópicos ou por "cold-inactivation" na presença de

ATP (Nelson, 1992). A ocorrência *in vivo* deste último mecanismo está descrita em células epiteliais renais (Forgac, 1998).

O outro mecanismo envolve a formação reversível de uma ponte dissulfureto entre resíduos de cisteína específicos presentes no domínio catalítico V_1 (Forgac, 1999). A formação desta ligação torna as V-ATPases incapazes de hidrolizarem ATP e por isso inactivas. O mecanismo de inibição do nitrato sobre estas ATPases é explicado pelo seu poder oxidante que promove especificamente a formação da ponte dissulfureto (Dschida e Bowman, 1995). Verificou-se *in vivo* que uma mutação, na V-ATPase de leveduras, nos resíduos de cisteína envolvidos nessa ligação tornava a bomba resistente a inibição por oxidação (Liu e col., 1996).

Como as V-ATPases são transportadores electrogénicos, para que possa ocorrer o transporte de H^+ sem que se origine um potencial transmembranar elevado é necessária a presença de uma condutância iónica membranar paralela para que haja dissipação desse potencial. *In vivo*, o ião envolvido neste mecanismo é geralmente o ião Cl^-, transportado através de canais específicos (Forgac, 1998; Forgac, 1999). A regulação da actividade destes canais iónicos poderá representar um mecanismo adicional de regulação da actividade das V-ATPases.

Anodonta cygnea

A *Anodonta cygnea* é um bivalve de água doce da família Unionidae. Os membros desta família encontram-se amplamente distribuidos em lagoas e estuários de águas pouco profundas de todo o mundo, constituindo uma significativa parcela da fauna dos fundos lodosos. São animais sedentários que filtram a água através das brânquias em busca de microorganismos e partículas orgânicas em suspensão. Os grandes volumes de água filtrados colectivamente por estes animais contribuem significativamente para a redução da quantidade de matéria em suspensão nas massas de água onde habitam (Aldridge, 1999).

Como filtradores sedentários, são susceptíveis à presença de poluentes na hidrosfera, sendo frequentemente usados como biomarcadores da qualidade das águas (Riffeser e Hock, 2002; Robillard e col., 2003). Ao contrário do que possa parecer são animais resistentes a condições desfavoráveis, como a anóxia ou a presença de poluentes (Kadar e col., 2001; Kadar e col., 2002; Nagy, 1973; Ortmann e Grieshaber, 2003), adoptando estratégias que lhes permitem a diminuição da taxa de filtração de água ou mesmo o fecho hermético das valvas por períodos que podem ir até aos cinco dias (Pynnonen, 1990).

Anatomicamente, a *Anodonta cygnea* é constituida por concha composta por duas valvas simétricas (Figura 2) mantidas unidas por músculos adutores (anteriores e posteriores). A face interna de ambas as valvas encontra-se revestida por uma estrutura epitelial denominada manto. Esta estrutura, com o auxílio dos músculos retractores e da concha delimita duas cavidades internas distintas: a cavidade intrapaleal e a cavidade extrapaleal.

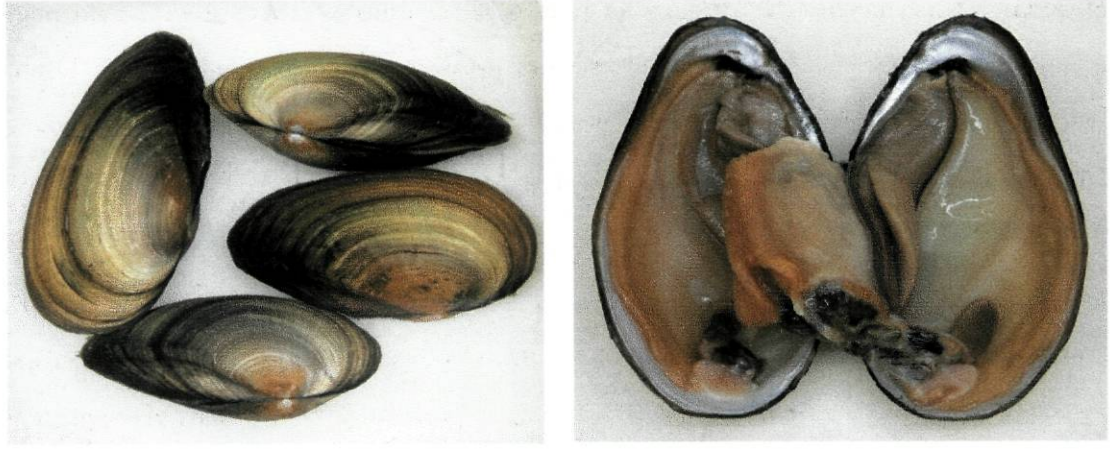


Figura 2. *Anodonta cygnea.* Vistas das faces externas da concha e vista dos principais órgãos internos.

Na cavidade intrapaleal (Figura 3) encontram-se a maioria dos órgãos do animal, nomeadamente o coração, o pé (onde se situam as gónadas, uma parte do tecido intestinal e os restantes órgãos internos), constituído por tecido muscular, e os dois pares de brânquias (um par de cada lado do pé), constituidas por lamelas branquiais. Os órgãos desta cavidade comunicam com o meio externo através de dois canais (sifões) formados pelos bordos do manto, sendo um de entrada e um de saída.

A cavidade extrapaleal é delimitada pela face interna de cada uma das valvas do animal e pelo manto, sendo preenchida pelo líquido extrapaleal (LEP), de composição inorgânica semelhante à do sangue do animal, denominado hemolinfa. Ambos os fluidos têm uma composição inorgânica e uma osmolalidade distinta da água da lagoa ou do estuário daí que haja necessidade de uma osmorregulação efectiva da sua composição.

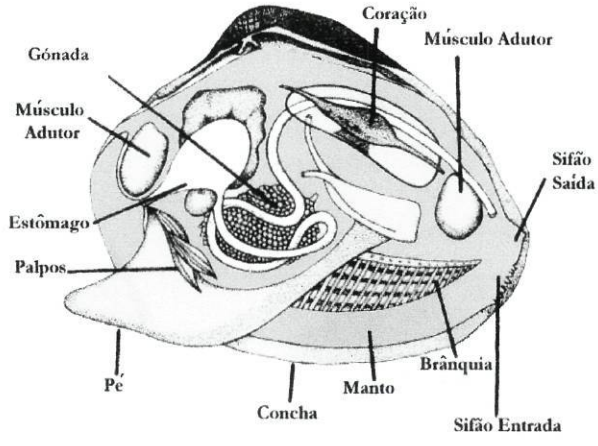


Figura 3. Representação esquemática das principais estruturas internas de *Anodonta cygnea* (corte longitudinal), segundo www.*ManandMollusc.com, 2003.*

De modo a manter estas concentrações iónicas nos diversos fluidos corporais, a *Anodonta cygnea*, assim como a generalidade dos bivalves de água doce, tem que transportar activamente os iões a partir de um meio diluído. Estes animais têm igualmente de lidar com o problema da entrada de água por osmose, que resolvem mantendo uma elevada produção de urina (Dietz, 1985). Todavia, esse mecanismo, juntamente com a permeabilidade iónica de alguns sistemas epiteliais, levam a que ocorra saída de iões para o meio externo. Assim, para balançar essas perdas, o animal mantém uma reabsorção iónica elevada.

O manto de *Anodonta cygnea* é uma estrutura com cerca de 15 a 45 μm de espessura (Beedham, 1958), sendo constituído por dois epitélios: o epitélio cavitário do manto (ECM), que está em contacto com a cavidade intrapaleal, e o epitélio externo do manto (EEM) (Machado e col., 1988a; Wilbur e Saleudin, 1983). Os dois epitélios encontram-se ligados por tecido conjuntivo, por onde circula a hemolinfa (Massaubau e col., 1991).

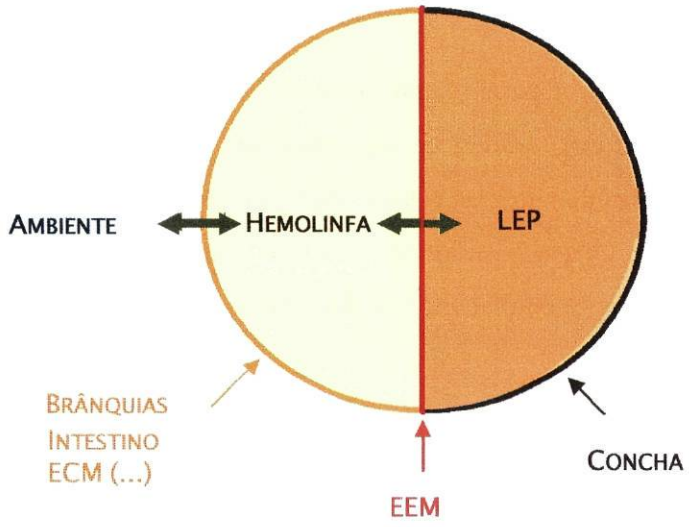


Figura 4. Representação esquemática das principais estruturas de *Anodonta cygnea* .

Esquematicamente podemos descrever o sistema como sendo composto por 3 compartimentos distintos (compartimento intrapaleal ou ambiente, hemolinfa, compartimento extrapaleal), uma barreira impermeável (concha), uma barreira que regula as trocas entre a hemolinfa e o compartimento extrapaleal (EEM) e um conjunto de barreiras que controlam as trocas entre o animal e o meio ambiente (intestino, brânquias, ECM,...) (Figura 4).

A composição deste sistema evidencia o papel que o manto tem, através do EEM, na regulação da composição do líquido extrapaleal e, portanto, no microambiente em que os processos de mineralização/desmineralização da concha ocorrem. É, provavelmente, a principal fonte de macromoléculas orgânicas deste compartimento, pelo que deverá desempenhar o papel principal na geração, crescimento e reparação da concha, controlando as concentrações de cálcio, bicarbonato, protões e componentes da matriz do LEP.

Contexto, objectivos e plano geral do trabalho

O "Transporte Iónico em *Anodonta cygnea*" insere-se numa área mais vasta, a da Biomineralização.

Os biominerais resultam da associação entre componentes orgânicos e sais minerais e são estruturas rígidas que podem desempenhar funções de suporte, protecção e outras. A

participação das células na formação dessas estruturas está patente na geometria altamente reprodutível das conchas dos moluscos.

No ponto Biomineralização ficou patente que a compreensão do modo como são formadas as estruturas calcificadas exige a identificação das células ou tecidos responsáveis pela sua formação, o conhecimento de como as células segregam os componentes da matriz orgânica e do modo como fazem chegar os minerais (cálcio e outros iões) aos locais onde ocorre a calcificação. Exige ainda o conhecimento dos mecanismos de controlo desse processo.

O objectivo geral desta Tese consiste na contribuição para o esclarecimento de mecanismos de transporte iónico responsáveis pela mineralização da concha de *Anodonta cygnea.*

A hipótese de que a concentração de cálcio iónico no epitélio externo do manto devia estar perto do equilíbrio com as concentrações de cálcio dos compartimentos extracelulares (hemolinfa e líquido extrapaleal) foi em parte confirmada com medições de cálcio feitas com microeléctrodos ionossensíveis (Coimbra e col., 1992). Eram, no entanto, necessárias novas provas devido às limitações desta técnica (Orchard e col., 1991).

Foi descrita a presença de uma V-ATPase na membrana apical do EEM, responsável pela génese da corrente através do EEM em condições de curto-circuito. Esta bomba transporta protões para o fluido extrapaleal a uma taxa elevada e não estava caracterizada do ponto de vista bioquímico. Também não era conhecida a relação entre a taxa de transporte de protões e o pH intracelular.

Os objectivos específicos deste trabalho são:

- Medição do cálcio intracelular em células do EEM usando sondas fluorescentes, com o intuito de confirmar resultados obtidos por outros autores com microeléctrodos sensíveis a iões;
- Medição do pH intracelular das células do EEM. Influência de inibidores de sistemas membranares de transporte e do cálcio extracelular no pH intracelular;
- Caracterização bioquímica da V-ATPase presente na membrana apical do EEM;
- Construção de um modelo matemático dos mecanismos de transporte do EEM.

Para atingir os objectivos propostos utilizaram-se várias técnicas experimentais: técnica de voltagem controlada, técnicas de medição de concentrações iónicas intracelulares utilizando sondas fluorescentes, técnicas bioquímicas de caracterização enzimática e utilização de software Berkeley Madonna para a construção do modelo matemático.

A Tese é constituída por 9 capítulos. No primeiro capítulo (Introdução) referem-se os processos de biomineralização, o transporte de cálcio em epitélios e os mecanismos de regulação do pH intracelular. É também descrito o animal utilizado como modelo experimental – *Anodonta cygnea.*

O Capítulo 2 é reservado ao tratamento detalhado da técnica de epi-fluorescência bem como ao modo como se procedeu à montagem e calibração do "set up" que tornou possível, no nosso laboratório, a medição de concentrações intracelulares de iões utilizando sondas fluorescentes ionossensíveis.

Nos capítulos 3 e 4 apresentam-se e discutem-se os resultados relativos à regulação do cálcio e pH intracelulares em células do EEM. No capítulo 5 apresentam-se os resultados que permitiram a caracterização da V-ATPase presente nas células EEM um dos mecanismos que participam na regulação do pH destas células.

No capítulo 6 está descrita a construção de um modelo matemático dos mecanismos de transporte do EEM. Para além do interesse puramente científico desse modelo, prevê-se a sua futura utilização no *design* de fármacos com acção sobre os sistemas de transporte e na interpretação de resultados experimentais (Fernandes e Ferreira, 1991), em particular os relativos à acção de agentes farmacológicos e substâncias tóxicas.

A discussão dos resultados obtidos é feita separadamente nos capítulos 3, 4, 5 e 6 evidenciando a investigação descrita em cada um deles.

As conclusões e a Bibliografia são apresentadas, respectivamente, no capítulo 7 e 9.

2. A Técnica de Epi-fluorescência

Introdução

A fluorescência juntamente com a fosforescência constituem o que se denomina por fenómenos de luminescência. São fenómenos em que à absorção de luz por uma molécula, a um dado comprimento de onda, se segue a emissão de luz a um comprimento de onda mais elevado. A emissão de luz resulta da passagem da molécula de um estado excitado ao estado fundamental. O tempo necessário a esta transição é denominado Tempo de Vida (τ). Moléculas fluorescentes e fosforescentes diferem em τ. Substâncias fluorescentes apresentam um tempo de vida médio de 10^{-8} s, enquanto que as fosforescentes apresentam um τ médio de 10^{-3} a 10^{0} s.

O fenómeno da fluorescência está na base do desenvolvimento de técnicas com uma série ampla de aplicações que vão desde a sequenciação de DNA, à monitorização ambiental, hibridização *in situ*, identificação celular, etc.

Os métodos baseados na fluorescência apresentam três vantagens principais sobre métodos que se baseiam na detecção de outros fenómenos luminosos: sensibilidade elevada, rapidez e inocuidade. No que se refere à sensibilidade, permitem detectar variações rápidas na concentração da substância fluorescente da ordem do pico e até do fentomolar, uma vez que estes métodos detectam alterações de intensidade de fluorescência que ocorrem em intervalos de tempo da ordem dos pico segundos. No que se refere à inocuidade, na grande maioria dos métodos utilizados nos procedimentos envolvidos nas técnicas de fluorescência, as amostras não são afectadas ou destruídas e, por isso, células e tecidos vivos podem ser estudados sem que haja alteração da sua fisiologia normal.

Contudo, estes métodos estão igualmente sujeitos a interferências que têm origem sobretudo em dois processos: "photo-bleaching" e "quenching". Ambos os mecanismos resultam numa diminuição da intensidade de fluorescência. O "photo-bleaching" é a decomposição da sonda por acção da luz incidente. O "quenching" pode ocorrer por uma série de mecanismos, tais como atenuação da luz incidente por moléculas presentes em solução, colisão da molécula fluorescente excitada com outras moléculas, formação de complexos não fluorescentes com outras moléculas,...(Takahashi e col., 1999)

Fluorescência de rácio ("ratio fluorescence")

A técnica de fluorescência de rácio foi desenvolvida para minimizar os problemas relacionados com os processos de "photo-bleaching" e "quenching". Nesta técnica utilizam-

se sondas fluorescentes ionossensíveis e específicas, que quando se ligam ao ião, alteram as suas propriedades fluorescentes permitindo determinar concentrações iónicas em células vivas. Estas sondas são utilizadas em concentrações da ordem do micromolar de modo que, quando se ligam ao ião, não alteram significativamente a sua quantidade total livre na célula. Quando a concentração do ião muda, o equilíbrio entre a forma livre e a ligada também muda. Uma vez que a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração da substância fluorescente e que a forma ligada e a forma livre da sonda têm propriedades fluorescentes distintas, é possível quantificar cada uma delas. A razão entre a intensidade de fluorescência de cada uma das formas da sonda (rácio), para cada instante, é uma medida mais fidedigna da concentração do ião. Os erros causados por variações do percurso óptico, da concentração e pela fotodegradação da sonda fluorescente são assim minimizados (Lakowicz, 1999).

Carregamento e processamento de sondas iónicas fluorescentes. Princípios gerais.

A grande maioria das sondas iónicas fluorescentes não conseguem atravessar a membrana plasmática, não sendo possível fazê-las entrar na célula por difusão simples. Por isso, muitas delas existem numa forma quimicamente alterada, usualmente sob a forma de um derivado éster, que as torna solúveis na membrana da célula. Como estes derivados éster apresentam baixa solubilidade em soluções aquosas, adicionam-se à solução com a sonda, agentes dispersantes, como o Pluronic F-127 ou a Albumina Bovina Sérica (ABS), para evitar a agregação das moléculas do derivado da sonda em micelas e assim facilitar a sua difusão pra o interior da célula (MP_5, 2003).

Uma vez no interior da célula, por acção de enzimas celulares, o grupo éster (Acetoximetil na maioria das sondas) é clivado, obtendo-se assim a forma fluorescente ionossensível, incapaz de difundir para fora da célula. Este processo de clivagem intracelular denomina-se processamento da sonda (MP_1, 2002).

Embora a utilização de derivados éster seja a forma mais amplamente utilizada, existem uma série de outros métodos de incorporação da sonda na célula. Utilizam-se, entre outras, técnicas como a microinjecção, a permeabilização da membrana por agentes químicos, o choque osmótico e a fusão celular. São técnicas mais invasivas, havendo por isso um maior risco de perturbação da homeostasia celular.

De qualquer modo, a inserção de sondas fluorescentes na célula, qualquer que seja o processo utilizado para o fazer, não está isenta de causar perturbações ao normal

funcionamento celular. Por exemplo, está descrito que algumas sondas potenciométricas são citotóxicas para alguns tipos de células (Smith e col., 1981), e que a sonda Fluo-3 impede o normal desenvolvimento em algumas células (Stricker e col., 1992). Para além dos problemas de citotoxicidade, surgem por vezes problemas na utilização de uma dada sonda devido ao sobrecarregamento. Como as sondas funcionam como agentes sequestrantes dos substratos para que são específicas, a formação dessa ligação faz diminuir a concentração livre do substrato na célula, podendo-se igualmente alterar o normal funcionamento celular. Logo, é necessário ter em atenção não só que a quantidade de sonda fluorescente introduzida na célula seja suficiente para se obter um sinal forte (em relação ao "ruído de fundo"), mas que simultaneamente não seja demasiadamente alta e funcione como agente quelante, transtornado a homeostasia celular (Lakowicz, 1999).

Outros problemas a evitar são o "photo-bleaching" e a compartimentalização da sonda em organelos intracelulares. No "photo-bleaching", devido a uma exposição excessiva à radiação excitante, a sonda forma derivados químicos não excitáveis. É necessário, por isso, que a intensidade do feixe de luz seja ajustada de modo a que se obtenha um ratio *sinal de fluorescência/ruído de fundo* adequado por forma a minimizar esse fenómeno.

Para além destes problemas técnicos, pode acontecer por vezes que as células apresentem valores de autofluorescência elevados. Em certas situações, os comprimentos de onda de excitação e de emissão de uma dada sonda coincidem com os de determinados componentes celulares. Em células musculares, por exemplo, em que as concentrações de FAD e NADH são elevadas a utilização da sonda ionossensível Fura-2 é dificultada (Paddle, 1985).

Assim, a escolha de uma sonda fluorescente implica a ponderação de uma série de parâmetros de modo a evitar potenciais problemas.

Instrumentação utilizada e sua montagem

O sistema de epi-fluorescência utilizado é constituído por cinco módulos principais: fonte de luz, monocromador, microscópio, fotomultiplicador e sistema de aquisição de dados. Todos estes componentes estavam montados segundo o esquema da Figura 5.

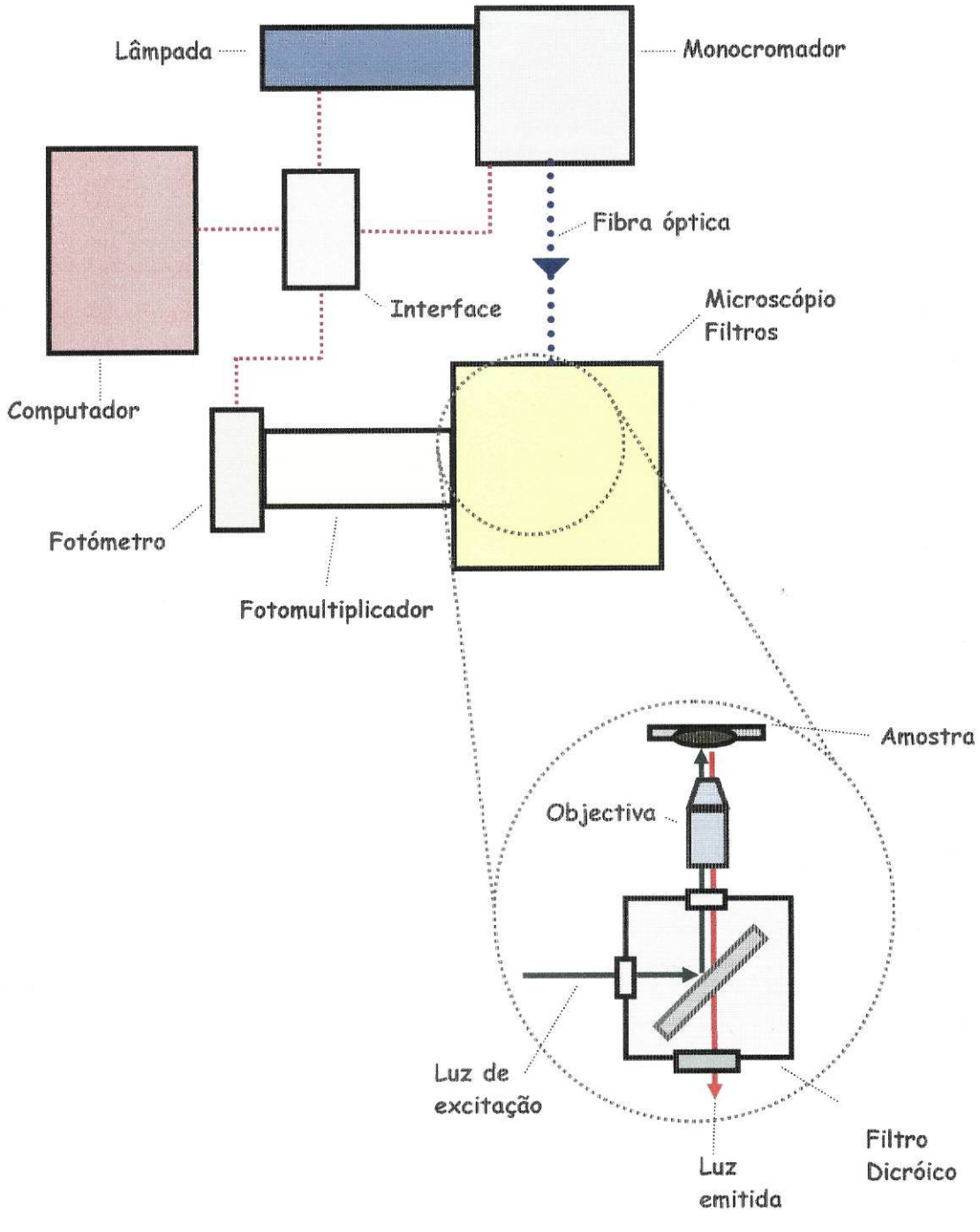


Figura 5. Representação esquemática dos componentes do sistema de epi-fluorescência e sua montagem.

Fonte de luz: utilizou-se uma lâmpada de xénon de 75 W (USHIO). Este tipo de lâmpada emite luz com uma gama contínua de comprimentos de onda entre 250 e 700 nm.

A lâmpada estava colocada num compartimento especialmente concebido para o efeito (PTI model A-1010 Arc Lamp Housing) que tinha como função não só proteger o utilizador de eventuais perigos (exposição intensa ao feixe luminoso, perigo de explosão devido à alta pressão da lâmpada), como proporcionar um modo de refrigeração para a lâmpada e colimar o feixe luminoso, que podia então ser focado. A ignição da lâmpada era feita directamente na fonte de alimentação (PTI model LPS-220 Power Supply).

Monocromador: utilizou-se um monocromador de excitação (PTI Monochromator model 102) para fazer a selecção do comprimento de onda da radiação incidente. A selecção dos comprimentos de onda é feita através de grelhas de difracção que são controladas pelo sistema de aquisição de dados, via uma interface. A intensidade do feixe de luz que entra no monocromador (aproximadamente proporcional ao quadrado da largura da fenda) e o intervalo de comprimentos de onda da radiação que sai do monocromador (comprimento de onda de excitação ± largura da fenda) podiam igualmente ser regulados através da variação da largura de fendas aí existentes. O feixe de luz é transmitido do monocromador ao microscópio por meio de um cabo de fibra óptica.

Microscópio invertido de fluorescência: O microscópio (Nikon Eclipse TE200) foi montado numa sala escura e encerrava toda uma série de componentes (lentes, filtros e espelhos) adequados.

A técnica utilizada envolve a utilização de um filtro dicróico e um filtro de emissão (Chroma Filter Set 455-0068). O filtro dicróico tem a particularidade de transmitir radiação com comprimentos de onda superiores a um determinado valor, denominado comprimento de onda de corte, reflectindo todas as radiações com comprimentos de onda inferiores. O espectro dos filtros utilizados está representado na Figura 6.

Fotomultiplicador. o fotomultiplicador (PTI model 814 PMT) detecta a radiação emitida pela amostra em "single photon counting".

O fotomultiplicador era precedido por um fotómetro (PTI model D-104 Photometer) que permitia ajustar o campo de medição do sinal através do controle da abertura de uma íris. Permitia igualmente a inserção de filtros adicionais no sistema, caso fosse necessário.

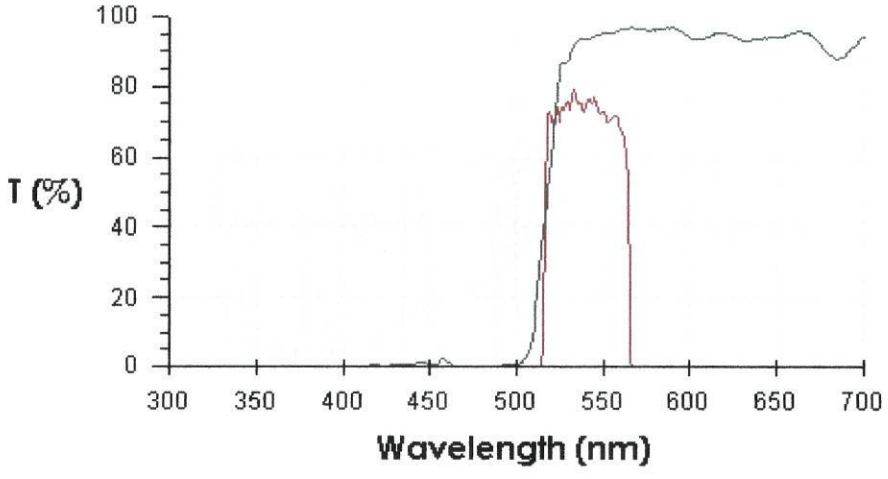


Figura 6. Espectro de transmissão do conjunto de filtros Chroma Filter Set 455-0068 (Legenda: ▬ filtro de emissão; ▬ filtro dicróico)

Sistema de aquisição de dados. o sistema de aquisição de dados era composto por um computador, onde foi instalado o software fornecido pela PTI (Felix 3.1), ligado aos outros componentes do sistema via uma interface.

Calibrações do sistema de epifluorescência

Procedeu-se à calibração do monocromador, à optimização da largura da fenda óptica e elaboração de curvas de calibração de Ca^{2+} livre usando Fura-2, de modo a optimizar a performance do equipamento (seguindo as instruções do fabricante) e a eliminar perturbações verificadas na selecção do comprimento de onda pelo monocromador.

No processo de calibração do monocromador realizaram-se dois tipos de medições: "scan" de excitação e medições de rácios.

Foram realizados "scans" de excitação de uma amostra de Fura-2 (1 μM) saturada de Ca^{2+} (300-400 nm, incrementos 1,0 nm, 2 nm de largura da fenda). Observou-se uma boa reprodutibilidade a comprimentos de onda baixos que diminuía progressivamente à medida que aumentava o comprimento de onda (Figura 7). Este facto sugeriu um erro incremental no controle do monocromador pelo computador.

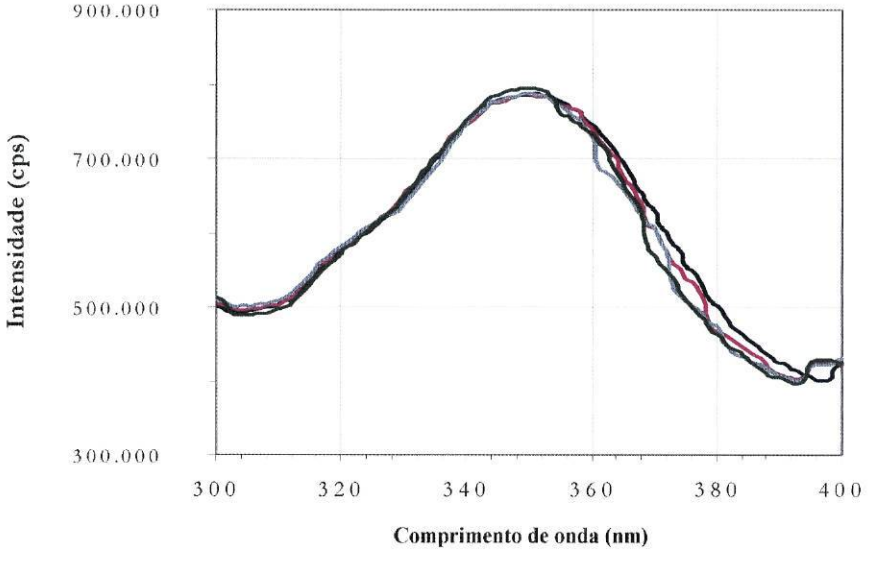


Figura 7. "Scans" de excitação de uma amostra de Fura-2 (1 μM) saturada de Ca^{2+} (300-400 nm, incrementos 1,0 nm, 2 nm de largura da fenda).

Utilizou-se então um espectrofotómetro para medir o espectro de luz emitida pelo monocromador (4 medições após "scans" de excitação de 300-380 nm, incrementos de 1,0

nm, 2 nm de largura da fenda). O espectro apresentou variações no valor final de comprimento de onda de cerca de 3 nm (Figura 8). Repetiu-se este procedimento com incrementos de 0,1 nm e o valor final de comprimento de onda apresentou uma variação similar.

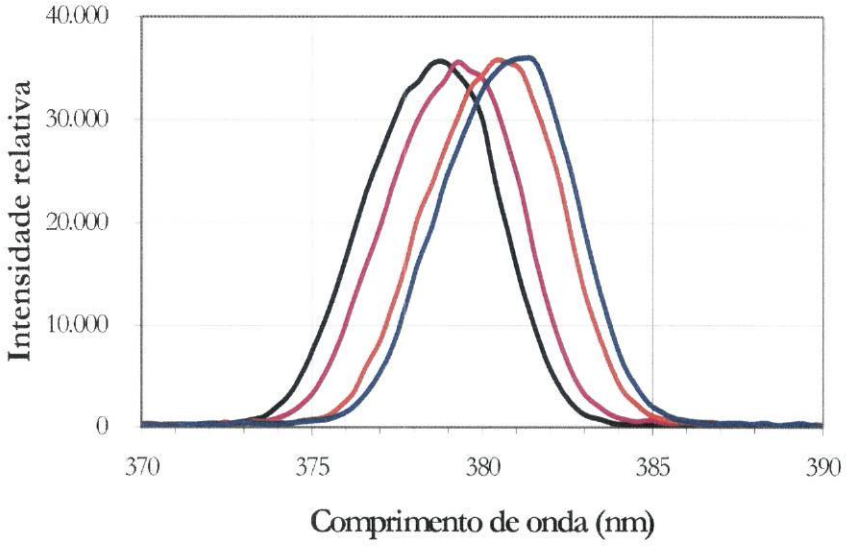


Figura 8. Medição do espectro de luz emitida pelo monocromador utilizando um espectrofotómetro. As medições foram realizadas após "scans" de excitação de 300-380 nm, incrementos 1,0 nm, 2 nm de largura da fenda.

O monocromador do sistema de epi-fluorescência foi então ajustado manualmente a 380 nm. O valor de comprimento de onda registado após cada medição apresentou uma boa reprodutibilidade.

Monitorizou-se com o espectrofotómetro o valor de comprimento de onda mais elevado (380 nm) durante uma medição de rácios a 340/380 nm. Os resultados mostraram a ocorrência de "saltos" durante a aquisição dos valores de rácio (Figura 9 - painel A) que eram acompanhados por alterações no valor registado no monocromador (Figura 9 - painel B). Note-se que, como os valores de intensidade medidos a 340 nm também apresentaram variações (Figura 9 - painel A), eram de esperar alterações no valor do monocromador a esse comprimento de onda.

As medições de rácios foram realizadas fixando o comprimento de onda de emissão a 510 nm e fazendo leituras consecutivas a 340 e 380 nm. Utilizaram-se os valores de

intensidade de fluorescência obtidos a 340 nm (F340) e a 380 nm (F380) para se obter um valor de rácio representativo de uma medida mais fidedigna da concentração de Ca^{2+}.

Depois de resolvidos os problemas que levaram à ocorrência do erro no controle do monocromador pelo computador realizaram-se experiências com vista à calibração do sistema.

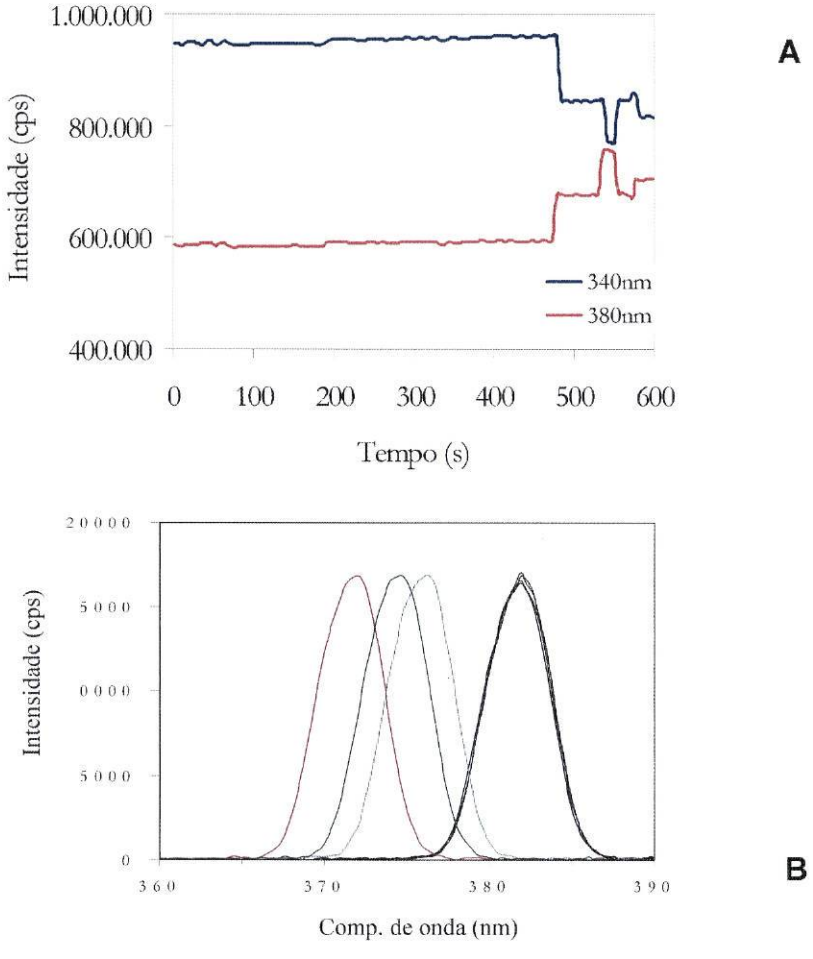


Figura 9. Painel A - Medição de rácios a 340/380 nm (tempo de integração 2 s, 2 nm de largura da fenda). Painel B – Medição do espectro de luz emitida durante as medições de rácios 340/380 para o valor de comprimento de onda mais elevado (380 nm).

Foram efectuadas medições de "scan" de excitação fixando o comprimento de onda de emissão (λ_{em}) a 510 nm e variando o comprimento de onda de excitação(λ_{ex}) entre 300 e 400 nm. A intensidade de fluorescência de soluções padrão de Ca^{2+} livre às quais se adicionou Fura-2 foi então registada (Figura 10).

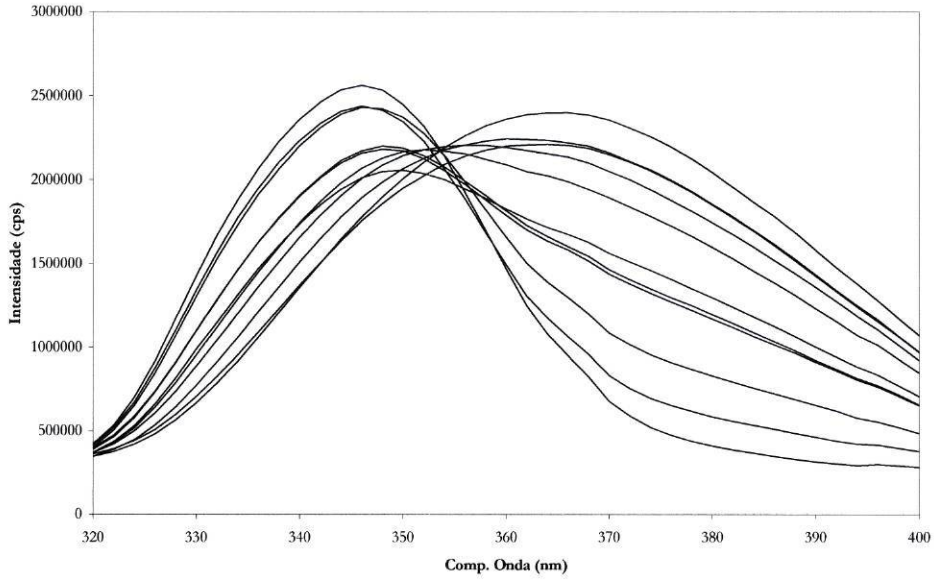


Figura 10. "Scan" de excitação de diversas soluções padrão de Ca^{2+} livre realizado no sistema de epi-fluorescência. λ_{em}=510 nm.

De modo a validar os resultados obtidos nesta medição, utilizou-se um protocolo muito semelhante para se registar a fluorescência das mesmas soluções num espectrofluorímetro Jasco (Figura 11), rotineiramente utilizado.

Após terem sido realizados todas as calibrações e eliminadas todas as perturbações encontradas, foi realizada uma série de pequenos testes de rotina indicados pelo fabricante (PTI, 1997), nos quais se verificou o bom funcionamento do equipamento. Acertou-se então a largura das fendas do monocromador a 2 nm.

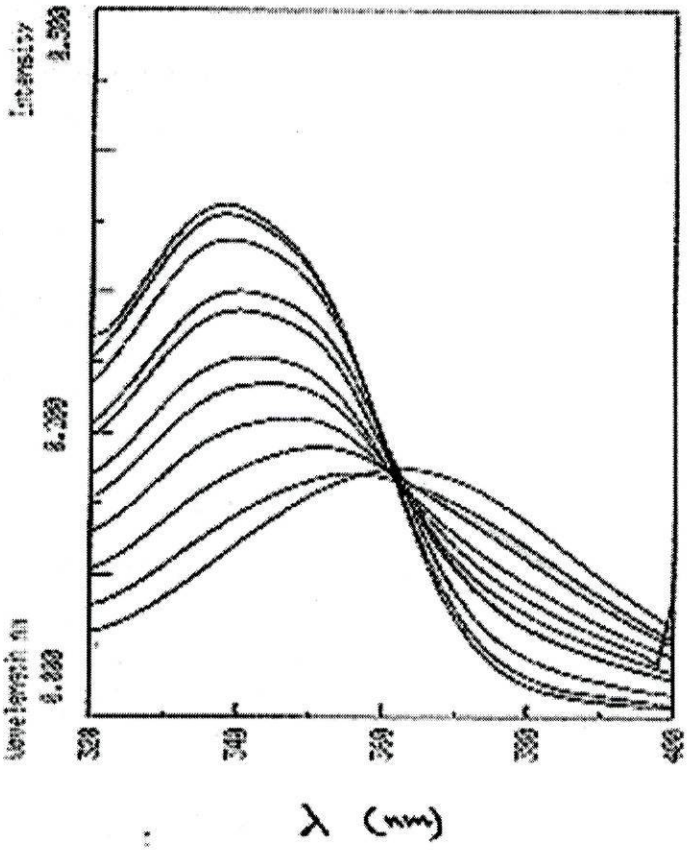


Figura 11. "Scan" de excitação de diversas soluções padrão de Ca^{2+} livre. λ_{em}=510 nm. As medições foram realizadas num espectrofluorímetro Jasco.

Câmara de observação e Sistema de perfusão

As células, cuja fluorescência se queria medir, foram visualizadas numa câmara de perfusão fechada (Harvard Apparatus modelo RC-20 H small volume imaging chamber), por duas lamelas de vidro (15 mm ∅) coladas com vedante de silicone. A lamela inferior foi revestida com poli-L-lisina para se conseguir uma melhor aderência das células. A solução de poli-L-lisina 0,01% foi preparada dissolvendo 5 mL de solução stock de poli-L-lisina 0,1% em 50 mL de água desionizada. Desta solução eram pipetados 100 µL para cada lamela. Após 10 minutos em repouso à temperatura ambiente, o excesso de poli-L-lisina foi retirado e as lamelas eram postas a secar durante a noite.

A perfusão das células foi feita por gravidade-aspiração, por intermédio de um sistema de torneiras que permitia comutar o fluxo proveniente dos diferentes reservatórios contendo

as diferentes soluções através de tubos de polietileno que se reuniam numa estrutura em forma de aranha fixa na platina do microscópio. O sistema de aspiração do banho era constituído por um tubo de polietileno ligado a um matraz que, por sua vez, estava ligado a uma bomba de vácuo.

3. Regulação do cálcio no EEM

Introdução

O crescimento da concha em *Anodonta cygnea* resulta da deposição de carbonato de cálcio sobre uma matriz orgânica. O local onde se dá a formação da concha é o compartimento extrapaleal que, como foi referido no capítulo 1, encontra-se preenchido com o líquido extrapaleal. O EEM reveste a face da concha metabolicamente activa e desempenha um papel preponderante na sua génese, crescimento e reparação, através do controlo que exerce na concentração de cálcio, protões (Coimbra e col., 1992; Coimbra e col., 1993) e componentes orgânicos no fluido extrapaleal.

Em *Anodonta cygnea* (Coimbra e col., 1993), este controlo resulta da combinação de três processos distintos: (1) secreção de moléculas orgânicas capazes de, baixando a energia de activação da reacção de precipitação, formar centros de nucleação ou inibir a precipitação por um processo inverso (2) manutenção da concentração de cálcio acima da saturação no compartimento que está em contacto com a concha, e (3) a regulação local do pH que pode forçar termodinamicamente a reacção abaixo indicada numa direcção ou na outra:

$$Ca^{2+}{}_{(aq)} + HCO_{3\,(aq)}^{-} \leftrightarrow CaCO_{3(s)} + H^{+}{}_{(aq)}$$

Neste sistema, a manutenção de uma concentração de cálcio elevada no fluido extrapaleal é essencial. Em *Anodonta* isto é conseguido pela difusão de cálcio da hemolinfa para o fluido extrapaleal.

É o EEM que controla a passagem do cálcio da hemolinfa para o líquido extrapaleal e em sentido contrário (Coimbra e col., 1992; Machado e col., 1988a). Com os seus diversos tipos celulares (Beedham, 1958; Bevelander e Nakahara, 1966; Machado e col., 1988a), este epitélio parece desempenhar um papel equivalente ao dos dois tipos de células do tecido ósseo (osteoblastos e osteoclastos). Neste tecido, os osteoclastos induzem a mobilização do cálcio principalmente bombeando protões para o microambiente que rodeia as lacunas de reabsorção (Blair, 1998; Blair e col., 1992) ainda que também possam estar envolvidos na degradação de componentes da matriz. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese de matriz orgânica e pela deposição de cálcio (Delaissé e col., 1993; Delaissé e Vaes, 1992).

A determinação da concentração de cálcio intracelular pode ser feita usando fotoproteínas sensíveis a cálcio, microeléctrodos ionossensíveis, proteínas fluorescentes quelantes ou indicadores metalocrómicos (Takahashi e col., 1999). Nenhum destes métodos utilizados obedece simultaneamente aos seguintes requisitos: conservação da integridade

anatómica e funcional das membranas celulares; medições dinâmicas contínuas com uma resolução de tempo inferior ao segundo e identificação exacta de célula cuja concentração está a ser medida. O uso de microeléctrodos ionossensíveis como os que foram usados por Coimbra e col. (1992) são um método expedito mas possuem uma inclinação de Nernst inferior a 30 mV por década, o que significa que, um erro de 5 mV para os potenciais eléctricos medidos usualmente, pode levar a estimativas da concentração de cálcio intracelular erradas em 50 a 100 % (Coimbra e col., 1992). Um outro problema com o uso dos microeléctrodos advém do tamanho das células do EEM (Orchard e col., 1991). Para células tão pequenas, a lesão causada pela introdução de um microeléctrodo duplo pode provocar um "shunt" no potencial de membrana das células.

Por estes motivos, e com o objectivo de confirmar os resultados obtidos por Coimbra e col. (1992), foram utilizadas neste trabalho sondas fluorescentes para medir a concentração de cálcio nas células do EEM.

Material e Métodos

Material Biológico

Este trabalho foi realizado utilizando como modelo biológico o bivalve de água doce *Anodonta cygnea*. Os animais, obtidos na lagoa de Mira, foram transferidos para tanques de plástico, onde foram mantidos com uma coluna de água desclorada com cerca de 20 cm. O fundo dos tanques foi coberto com sedimento retirado do fundo da lagoa de forma a proporcionar-lhes algum tipo de alimento. A água dos tanques era arejada continuamente, por intermédio de uma bomba de ar, e foi substituída semanalmente ou sempre que se apresentava turva.

Os animais foram aclimatados pelo menos uma semana antes de serem utilizados nas diversas experiências. Consideraram-se saudáveis os animais que expeliam água vigorosamente quando manipulados e cujas valvas tinham uma superfície interna brilhante e nacarada.

Isolamento das células de EEM

Para que as duas valvas do animal permanecessem abertas, cortaram-se cuidadosamente os músculos adutores e retractores anteriores e posteriores, com o auxílio de uma faca, evitando danificar o manto.

Em cada uma das valvas, para separar o EEM do ECM, foi feita uma incisão ao longo do canal branquial com o auxílio de uma tesoura oftálmica de pontas curvas. O ECM era destacado com o auxílio de uma pinça e desprezado. Deste modo, o EEM ficou exposto e foi cortado com o auxílio de uma tesoura, e processado segundo as diferentes necessidades experimentais.

O isolamento das células do EEM colocou alguns problemas relacionados com a produção abundante de muco por estas células, o qual pode dificultar grandemente a entrada da sonda fluorescente na célula. Por este motivo foram experimentadas substâncias mucolíticas (DTT 3 mM e $KMnO_4$ 1 mM) no isolamento das células. Foram igualmente experimentados métodos enzimáticos de isolamento das células (com Tripsina 1% e Colagenase 1%) e a adição de glucose 1 mM às soluções de isolamento com o mesmo propósito. O método de isolamento seleccionado descreve-se a seguir.

Após a dissecção do EEM, este foi lavado duas vezes em *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}* com 3 mM de DTT e uma vez em *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}* (Tabela 1). Com o auxílio de um bisturi, raspou-se o epitélio até à obtenção de uma suspensão de células. Essa suspensão celular foi centrifugada a 500.*g* durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em *Ringer Anodonta 0 Ca^{2+}* (Tabela 1). A suspensão foi novamente centrifugada a 500.*g* durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de *Ringer Anodonta 0 Ca^{2+}*. As células foram mantidas a 4°C até serem utilizadas.

Viabilidade das células

Foram feitos estudos preliminares sobre a viabilidade destas células, observando a incorporação (ou não) de Azul de Tripano (0,1% p/v em *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*). Este corante é comummente usado para distinguir células viáveis de células não-viáveis. Só as células não-viáveis absorvem o corante e coram de azul, podendo também parecer assimétricas. Contrariamente, células vivas e saudáveis mantêm-se incolores e redondas. O uso deste corante é sensível ao tempo, uma vez que células viáveis, se incubadas prolongadamente, absorvem o Azul de Tripano, podendo isso afectar as contagens e logo os resultados de viabilidade. Por esse motivo a adição do corante foi feita imediatamente antes da contagem das células.

Verificou-se que, pelo menos durante as primeiras 2 horas após a obtenção das células (com observações de 15 em 15 minutos), apenas uma minoria desprezável (cerca de 10% das células) incorporou o corante.

Determinação da [Ca^{2+}] intracelular utilizando a sonda Fura-2

A concentração de Ca^{2+} livre intracelular foi medida utilizando a sonda fluorescente Fura-2, derivada do quelante EGTA (Figura 12).

Quando o Fura-2 se liga ao Ca^{2+}, o espectro de excitação da sonda sofre um desvio para valores mais baixos de comprimento de onda. Esta propriedade permite medir a concentração de Ca^{2+} livre intracelular determinando a intensidade de fluorescência a 340 nm (F340), que corresponde à forma ligada da sonda, e a 380 nm (F380), que corresponde à forma livre e calculando a razão F340/F380.

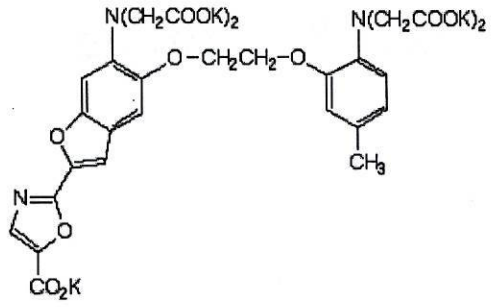


Figura 12. Estrutura da sonda Fura-2 (MP_3, 2003).

A membrana plasmática é praticamente impermeável ao Fura-2 para valores de pH fisiológico (7,2-7,5). A inserção de um grupo acetoximetil (AM) na sonda resolveu o problema de incorporação no interior da célula. O derivado AM introduz-se facilmente na célula e uma vez no interior é hidrolizado por esterases não específicas à forma Fura-2, que ao contrário da forma esterificada é altamente sensível ao Ca^{2+}. A remoção do grupo éster (geralmente denominada processamento da sonda) traduz-se igualmente na retenção de moléculas de Fura-2 no citosol, que estabelecem ligação com os iões cálcio, causando a emissão de um sinal de fluorescência com as características referidas anteriormente.

Carregamento da sonda

Como descrito anteriormente a sonda utilizada para medir a concentração de Ca^{2+} livre intracelular foi o Fura-2. Apesar desta sonda ser amplamente utilizada, a optimização do método de carregamento da sonda revelou-se uma tarefa morosa.

A grande maioria dos protocolos para o carregamento e processamento de sondas fluorescente foram estabelecidos para células de mamíferos e de alguns invertebrados (sobretudo insectos). Utilizando como ponto de partida esses protocolos, foram introduzidas sucessivas alterações nos nossos protocolos de carregamento e processamento da sonda Fura-2 até se conseguir obter um sinal de fluorescência optimizado. Em condições óptimas a intensidade do sinal de fluorescência da sonda, para os grupos de células (5 a 10 células por grupo) estudados, deve situar-se entre as 500.000 e as 1.500.000 contagens por segundo (cps). Nestas condições, indicadas pelo fabricante do equipamento de epi-fluorescência (PTI, 1997), consegue evitar-se que as alterações de intensidade de fluorescência que viessem a decorrer durante os protocolos realizados levassem, por um lado, à saturação do fotomultiplicador

(que ocorre para valores acima de 3.000.000 cps) e, por outro lado, a valores tão baixos que se confundissem com os valores de fluorescência de fundo características do sistema.

No que diz respeito ao carregamento da sonda foram alterados consecutivamente factores como a temperatura (37°C ou Temperatura Ambiente) e o tempo de incubação (15, 30, 60 ou 120 minutos). Alterou-se igualmente a composição do meio de carregamento aumentando nomeadamente a concentração da sonda Fura-2, adicionando agentes dispersantes, como o Pluronic F-127 e ABS (Albumina Sérica Bovina) e removendo completamente o ião Ca^{2+} da solução de carregamento (com a adição do quelante de cálcio, EGTA 10 mM). Neste trabalho a alteração que produziu um efeito mais significativo e conduziu aos resultados pretendidos foi efectivamente a remoção do ião cálcio da solução de carregamento.

Quanto ao processamento da sonda, foram optimizados factores como a temperatura e tempo de processamento.

Descreve-se o procedimento com que se obtiveram os melhores resultados. As células de EEM foram incubadas numa solução de *Ringer Anodonta 0 Ca^{2+}* (500 µL) contendo 10 µM de Fura-2-AM e Pluronic 0,03%, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão celular foi centrifugada a 500.*g*, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*. O processamento da sonda foi feito durante 15 minutos, à temperatura ambiente. As células foram então transferidas para a câmara de observação.

Determinação da fluorescência de fundo

Após realizadas as medições para determinação da concentração de cálcio intracelular, fez-se a medição da fluorescência de fundo. Para tal, perfundiu-se a preparação com *Ringer Anodonta 0 Ca^{2+}* contendo o ionóforo 4-Br-A23187 10 µM e $MnCl_2$ 10 mM, durante 10 minutos. Fez-se então a medição da intensidade de fluorescência de fundo para cada comprimento de onda.

A substância 4-Br-A23187 é um ionóforo com elevada afinidade para os iões de Mn^{2+}, que se insere na membrana plasmática, permitindo a difusão do Mn^{2+} para o interior da célula. Deste modo os iões de Mn^{2+} vão estabelecer ligação com o Fura-2, desalojando os iões Ca^{2+}. Quando se forma o complexo Fura-2-Mn^{2+} (Kd=2,8 nM) (MP_2, 2002), a sonda

perde a capacidade de ser excitada a 340 nm e 380 nm, deixando de emitir fluorescência a 510 nm.

A intensidade de fluorescência citosólica proporcional à concentração de cálcio no citosol resulta da diferença entre a intensidade de fluorescência total e a intensidade de fluorescência de fundo, para cada comprimento de onda de excitação.

Calibração da Sonda

A calibração da sonda Fura-2 foi realizada utilizando o método descrito por Tsien (Grynkiewicz e col., 1985).

De modo a poder converter os sinais de fluorescência em valores de concentração de cálcio intracelulares, no fim de cada protocolo, procedia-se a uma calibração *in situ* em que foi medida a fluorescência de soluções cuja concentração de cálcio livre era conhecida (0 ou 40 μM), às quais era adicionado Fura-2 (1 μM). Mediram-se as intensidades de fluorescência em cada situação.

Para converter a fluorescência medida (razão F340/F380) em concentração de cálcio no citosol, utilizou-se a seguinte equação:

$$\left[Ca^{2+}\right]_i = K_d \cdot \frac{(R - R_{min})}{(R_{máx} - R)} \cdot \frac{F^0_{380}}{F^{sat}_{380}}$$

em que:

K_d - constante de dissociação para o Fura-2;

R - rácio da intensidade de fluorescência (F340/F380) da amostra;

R_{min} - rácio da intensidade de fluorescência (F340/F380) da solução padrão zero de cálcio;

$R_{máx}$ - rácio da intensidade de fluorescência (F340/F380) da solução padrão saturada de cálcio (40 μM);

F^0_{380} - intensidade de fluorescência a 380 nm da solução padrão zero de cálcio;

F^{sat}_{380} - intensidade de fluorescência a 380 nm da solução padrão saturada de cálcio.

Para determinar o valor da constante de dissociação foram efectuadas medições fixando o comprimento de onda de emissão a 510 nm e registando os valores de intensidade de fluorescência obtidos para os comprimentos de onda de excitação 340 nm e 380 nm, para uma série de 11 soluções de concentração crescente de cálcio livre (0–39 μM) (MP_2, 2002), às quais foi adicionado Fura-2 na concentração de 1 μM. Mediu-se a intensidade de

fluorescência de cada solução a cada um dos comprimentos de onda referidos (340 e 380 nm). Fazendo a representação gráfica da função:

$$\left\{\frac{(R-R_{\min})}{[Ca^{2+}]} = f(R-R_{\min})\right\}$$

foi possível determinar o valor da constante K_d ($K_d = (-1).\text{declive}$).

Determinação da [Ca^{2+}] intracelular utilizando a sonda Mag-fura-5

A sonda Mag-fura-5, um composto derivado da sonda Fura-2, foi originalmente desenvolvida para determinar os níveis de Mg^{2+} intracelulares. No entanto, este composto tem uma afinidade muito mais elevada para o ião Ca^{2+} (Kd = 28 μM) do que para o ião Mg^{2+} (Kd = 2,3 mM). As propriedades espectrofotométricas desta sonda são muito similares às do Fura-2 (MP_4, 2003), apresentando apenas uma afinidade para o ião Ca^{2+} distinta.

Os procedimentos utilizados para medir a concentração intracelular de cálcio utilizando a sonda Mag-fura-5 foram idênticos aos descritos para a sonda Fura-2 com excepção de algumas alterações pontuais que serão referidas sempre que necessário.

Protocolo utilizado

O protocolo utilizado para determinar a concentração intracelular de cálcio nas células do EEM consistiu sequencialmente: na dissecção do EEM, isolamento das células, carregamento da sonda, transferência das células para a câmara de perfusão, perfusão das células com Ringers de composição conhecida e leitura simultânea da intensidade de fluorescência, determinação da fluorescência de fundo e calibração da sonda.

Técnica de Confocal

Esta técnica, que se baseia no mesmo princípio da epi-fluorescência, permitiu verificar tanto a distribuição espacial do cálcio nas diversas células epiteliais, como no citoplasma dessas células.

Instrumentação utilizada

O sistema de confocal consistia num de módulo de imaging Bio-Rad MRC 600 ligado a um microscópio Diaphot Nikon. As imagens foram obtidas com uma objectiva de imersão x60 plan-apochromat Nikon CFN (abertura numérica, 1,2). As imagens foram visualizadas usando o software IDL (Sistemas de Pesquisa, Inc.).

As imagens de fluorescência foram adquiridas à temperatura ambiente. A fluorescência foi excitada com a linha 488 nm de um laser de argôn-krypton. O sinal foi direccionado para um fotomultiplicador passando através de um filtro dicróico de 560 nm (35 nm bandpass) e de um filtro de emissão (522 nm).

As imagens foram pseudocoloridas usando o software Photoshop 7.0 (Adobe Systems).

Distribuição do Ca^{2+} intracelular. Carregamento da sonda.

As células de EEM foram incubadas numa solução de *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}* (500 µL) contendo 10 µM de Fluo-3 durante 60 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão celular foi centrifugada a 500 *g* durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*.

Soluções utilizadas

Na Tabela 1 está descrita a composição das diferentes soluções utilizadas nos procedimentos experimentais.

	Ringer Anodonta 0 Ca^{2+}	Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}	Ringer Anodonta 6 Ca^{2+}
NaCl	5	5	5
KCl	1	1	1
$MgCl_2$	0,5	0,5	0,5
$CaCl_2$	0	1	6
HEPES	10	10	10
Manitol	19	18	8
pH	7,4 (NaHO)	7,4 (NaHO)	7,4 (NaHO)

Tabela 1. Composição dos diversos ringers utilizados (em mM).

Resultados

Determinação da $[Ca^{2+}]$ intracelular com a sonda Fura-2

Constante de dissociação do Fura-2

Como referido, modo a transformar os sinais de fluorescência obtidos com o Fura-2 em valores de concentração intracelular de cálcio livre foi necessário determinar o valor da constante de dissociação para esta sonda.

Obteve-se um valor médio para o Kd_{FURA-2} de 358 ± 52 nM (n=5).

Determinação da $[Ca^{2+}]$ intracelular

Depois de optimizado o protocolo de carregamento do Fura-2, fez-se uma série de determinações do valor da concentração intracelular de Ca^{2+} livre.

A distribuição da concentração de Ca^{2+} livre está ilustrada na Figura 13 e permite verificar que essa concentração se situa entre os valores 75 e 425 nM, com um valor médio de 216 ± 64 nM.

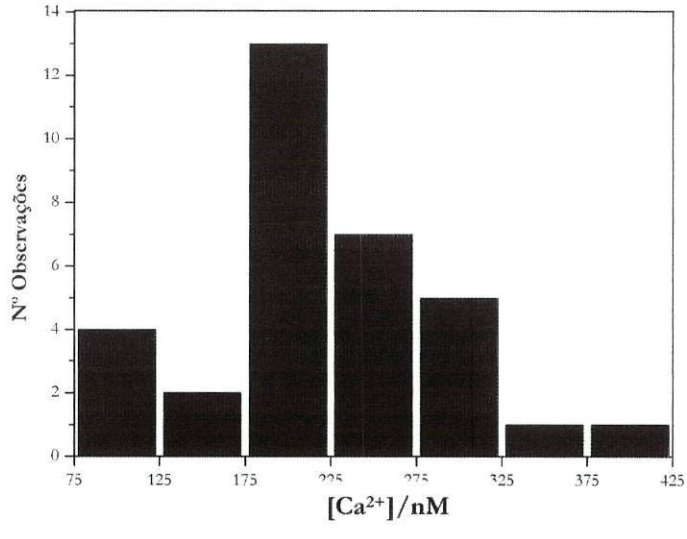


Figura 13. Distribuição da $[Ca^{2+}]_i$ em células isoladas de EEM, obtida usando a sonda Fura-2 (n=33).

Efeito da variação do cálcio livre extracelular na $[Ca^{2+}]_i$

Após incubação com a sonda fluorescente Fura-2 as células foram perfundidas sequencialmente com *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*, *Ringer Anodonta 6 Ca^{2+}* ou *Ringer Anodonta 0 Ca^{2+}* e *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*, de modo a verificar o efeito da alteração da $[Ca^{2+}]$ extracelular na $[Ca^{2+}]_i$. Como se pode observar na Figura 14, quando a concentração extracelular de cálcio em contacto com as células de EEM diminuía de 1 mM para 0 mM, o valor da concentração intracelular desse ião diminui cerca de 45%, de 179 ± 10 nM para 97 ± 3 nM. Pelo contrário, quando a concentração extracelular de cálcio aumentou de 1 para 6 mM, verificou-se igualmente um aumento de 193 ± 14 nM para 266 ± 16 nM (cerca de 32%) no valor intracelular .

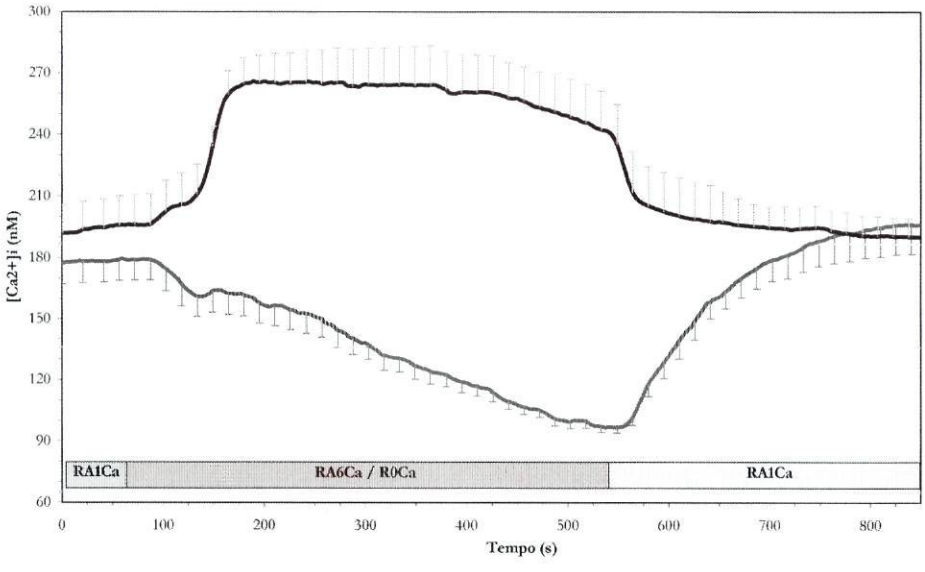


Figura 14. Efeito da alteração da $[Ca^{2+}]$ extracelular na concentração intracelular de cálcio nas células de EEM de *Anodonta cygnea* perfundidas com soluções de diferente concentração desse ião (RA1Ca – 1 mM Ca^{2+}; RA0Ca - 0 mM Ca^{2+}; RA6Ca - 6 mM Ca^{2+}) (média ± e.p.m.; n=9).

Efeito da Ionomicina na $[Ca^{2+}]$ intracelular

Para estudar o efeito da Ionomicina 10 μM na $[Ca^{2+}]_i$ as células isoladas foram perfundidas sequencialmente com: *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*, *Ringer Anodonta 6 Ca^{2+}*, *Ringer Anodonta 6 Ca^{2+}* com Ionomicina 10 μM e *Ringer Anodonta 0 Ca^{2+}*. Ao adicionar-se

Ionomicina à solução extracelular com 6 mM de cálcio, verificou-se uma aumento da [Ca^{2+}] intracelular de 314 ± 13 nM para 522 ± 28 nM, diminuído novamente este valor (184 ± 2 nM) quando se perfundiam as células com uma solução sem cálcio (Figura 15).

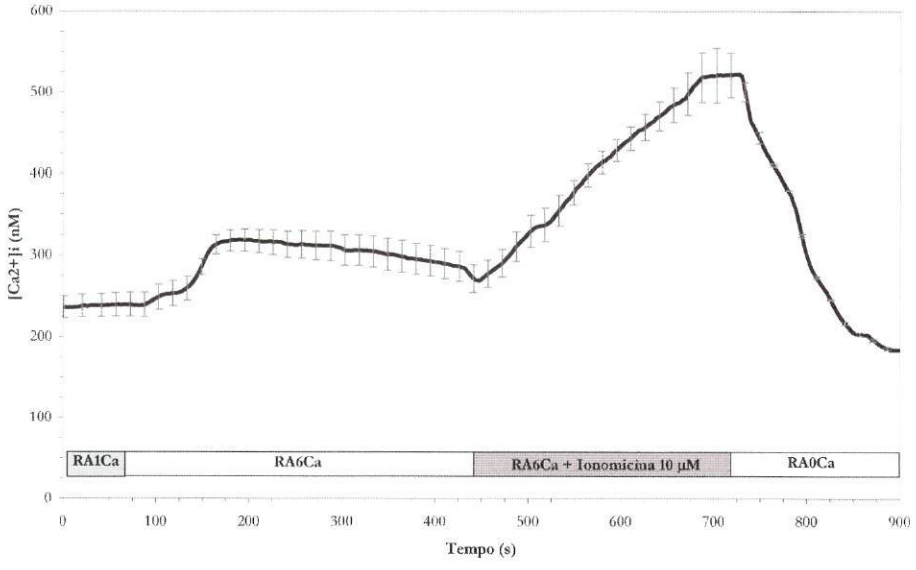


Figura 15. Efeito do ionóforo Ionomicina 10 µM na concentração intracelular de cálcio livre nas células de EEM de *Anodonta cygnea* perfundidas com soluções de diferente concentração de Ca^{2+}. (RA1Ca – 1 mM Ca^{2+}; RA0Ca - 0 mM Ca^{2+}; RA6Ca - 6 mM Ca^{2+} e adição de ionóforo) (média ± e.p.m.; n=8).

Efeito do TPEN na determinação da [Ca^{2+}] intracelular

O TPEN (*tetrakis-(2-piridilmetil)etilenodiamina*) é um quelante lipossolúvel selectivo para catiões metálicos como o Mn^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} e Fe^{2+}, com muito baixa afinidade para os iões Ca^{2+} e Mg^{2+} (Arslan e col., 1985; McCabe Jr e col., 1993). As sondas fluorescentes derivadas do Fura-2 apresentam afinidades mais elevadas para muitos desses iões do que para o ião Ca^{2+}. Por exemplo, para o ião Mn^{2+} a afinidade do Fura-2 é cerca de 100 vezes mais elevada do que para o ião Ca^{2+} (Arslan e col., 1985; Takahashi e col., 1999). A utilização do TPEN permite eliminar a interferência na medição da [Ca^{2+}] devida à presença desses iões.

De modo a poder verificar a interferência do ião Mn^{2+} nas medições da concentração de Ca^{2+} intracelular, mediu-se a fluorescência de células perfundidas com *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}* e, após um período controlo, adicionou-se o quelante TPEN, na concentração de 100 µM.

Efeito do TPEN na determinação da [Ca^{2+}] intracelular com a sonda Fura-2

Como se pode ver na Figura 16, a adição do quelante TPEN (100 μM) à solução de perfusão externa (*Ringer Anodonta 1* Ca^{2+}) levou a que o sinal fluorescente exibido pela sonda atingisse um patamar de saturação. Uma vez que as sondas fluorescentes do tipo Fura-2 apresentam um intervalo de detecção entre 0,1.Kd e 10.Kd (MP_3, 2003) foi possível concluir que a concentração de Ca^{2+} intracelular se encontra acima de 3,6 μM.

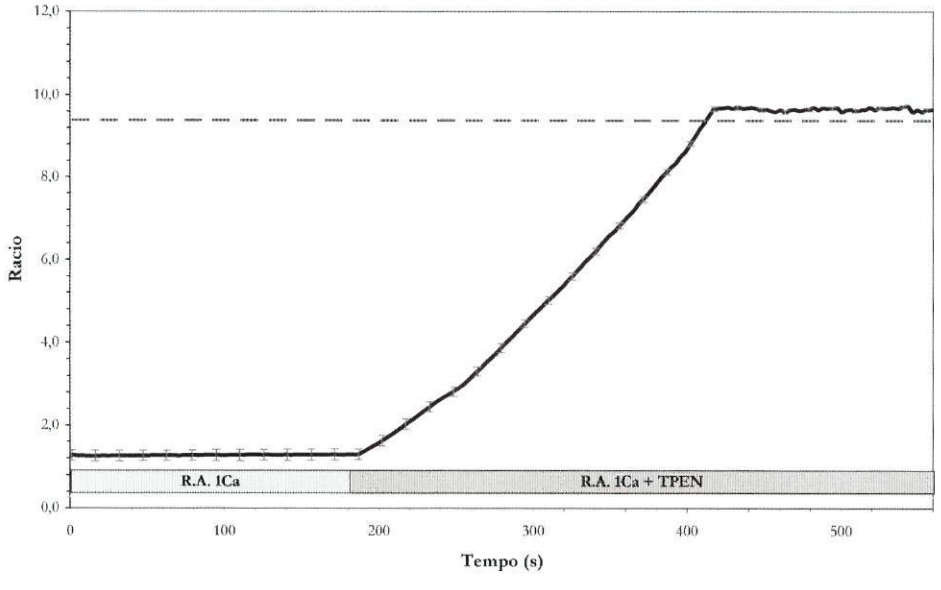


Figura 16. Efeito do quelante TPEN (100 μM) na medição da concentração intracelular de cálcio livre nas células de EEM de *Anodonta cygnea* carregadas com a sonda Fura-2 e perfundidas com *Ringer Anodonta 1* Ca^{2+} (média ± e.p.m.; n=3).

Efeito do TPEN na determinação da [Ca^{2+}] intracelular com a sonda Mag-Fura-5

A utilização da sonda Mag-fura-5 permite determinar concentrações intracelulares de cálcio que se situem aproximadamente entre 3 e 300 μM. A perfusão das células, previamente carregadas com esta sonda fluorescente, com o quelante TPEN 100 μM conduziu a uma conclusão semelhante à obtida com a sonda Fura-2. Como se pode verificar na Figura 17, a sonda atingiu o patamar de saturação, indicando que a concentração de Ca^{2+} intracelular se situa acima de 300 μM.

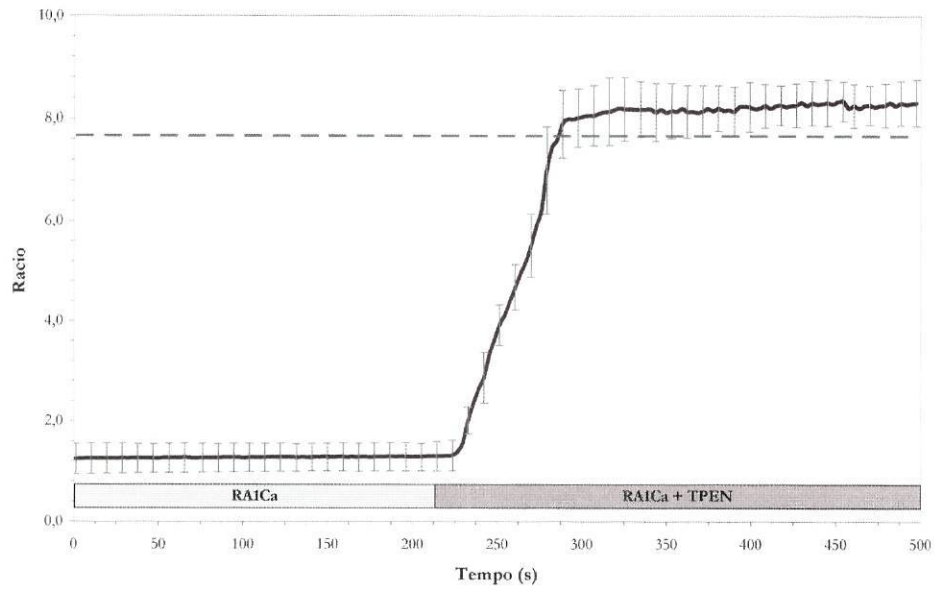


Figura 17. Efeito do quelante TPEN (100 μM) na medição da concentração intracelular de cálcio livre nas células de EEM de *Anodonta cygnea* carregadas com a sonda Mag-fura-5 e perfundidas com *Ringer Anodonta 1 Ca* $^{2+}$ (média ± e.p.m.; n=3).

Distribuição do Ca^{2+} intracelular

Para tentar identificar se existiam populações de células no EEM com concentrações intracelulares de cálcio livre distintas, utlizou-se a sonda Fluo 3, observando as células com um microscópico de confocal. Apenas podemos verificar a existência de algumas células com acumulações pontuais de cálcio que deverão corresponder à presença intracelular de micropérolas, já anteriormente descrita (Barrias, 2003).

Como podemos verificar na Figura 18, existe uma localização pontual no citoplasma de algumas células deste epitélio de grandes quantidades de cálcio (associadas às regiões de brilho mais intenso). Aparte estas zonas de brilho intenso o citoplasma da quase totalidade das células observadas apresentava uma intensidade de fluorescência idêntica.

Estas acumulações de cálcio não ocorrem em todas as células do epitélio (Figura 19), podendo observar-se células com várias destas zonas de brilho intenso e outras em que essas zonas estão ausentes.

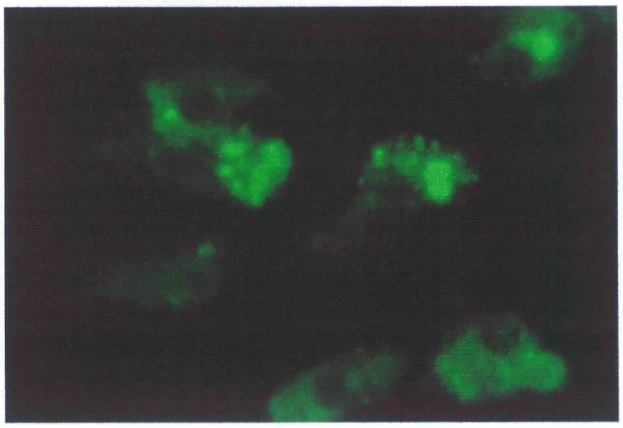


Figura 18. Células do EEM incubadas com Fluo-3 visualizadas no microscópio de confocal (x600)

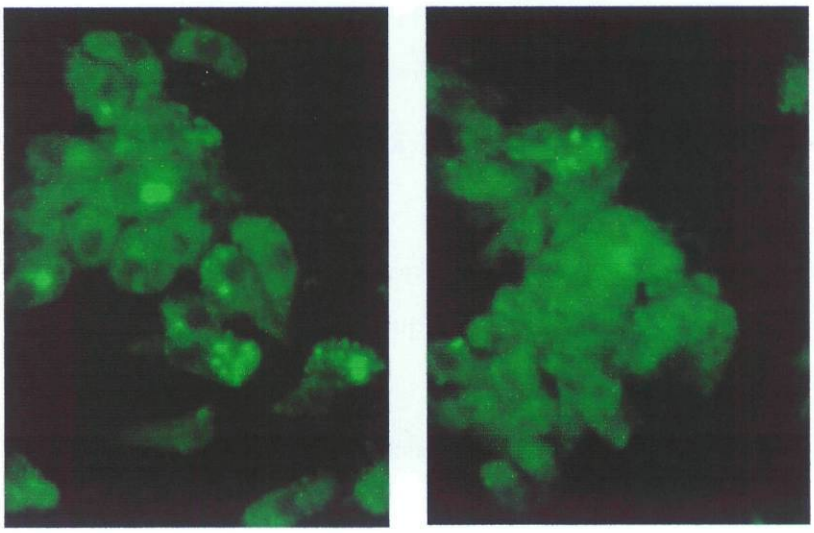


Figura 19. Células do EEM incubadas com Fluo-3 visualizadas no microscópio de confocal (x600)

Discussão

Dos trabalhos de Coimbra e col. (1988)e de Coimbra e col. (1992) pode concluir-se que os iões cálcio atravessam passivamente as células do EEM. Esta conclusão baseia-se nas seguintes observações feitas por aqueles autores:

a. o EEM é altamente permeável a cálcio uma vez que a condutância transepitelial é principalmente determinada pela concentração daquele ião nos líquidos externos;

b. os fluxos transepiteliais unidireccionais de cálcio são muito elevados;

c. em curto-circuito, não é possível determinar fluxos líquidos transepiteliais deste ião;

d. ambas as barreiras (hemolinfática e extrapaleal) são altamente permeáveis a cálcio, uma vez que o potencial intracelular é altamente sensível à alteração da concentração desse ião em qualquer dos banhos externos;

e. um aumento da concentração de cálcio nos banhos externos inibe a corrente de curto-circuito;

f. a concentração intracelular de cálcio, medida com eléctrodos ionossensíveis específicos para cálcio, está em equilíbrio electroquímico com o cálcio dos compartimentos externos;

g. as concentrações intracelulares de cálcio, medidas com eléctrodos ionossensíveis específicos para este ião, seguem as concentrações deste ião nos compartimentos externos;

h. as concentrações intracelulares de sódio, medidas com eléctrodos ionossensíveis específicos para este ião, ultrapassam largamente a osmolalidade dos líquidos externos o que corresponde seguramente a um artefacto grosseiro só explicável pelo efeito do ião cálcio sobre as resinas específicas para sódio.

Em condições de curto-circuito e na ausência de um fluxo líquido transepitelial somos forçados a postular que o cálcio intracelular está em equilíbrio electroquímico com o cálcio externo. As medições da concentração de cálcio medidas nesta situação situavam-se todas (n=41) entre 1 e 15 mmol/ L (Coimbra e col., 1992).

Neste trabalho, os primeiros resultados obtidos com a sonda Fura-2, a mais utilizada para medições do Ca^{2+} intracelular, pareciam indicar que a concentração de Ca^{2+}

intracelular se situava dentro dos limites de detecção da sonda. De início, obtiveram-se sinais de fluorescência com intensidades muito baixas mas que não produziam um valor de rácio saturado. Por este motivo foi então melhorado o protocolo de carregamento da sonda.

Optimizadas as condições experimentais, mediu-se a concentração de cálcio intracelular, tendo-se obtido um valor de 216 ± 64 nM (n=33), bem abaixo do valor reportado por Coimbra e col. (1992).

O estudo do efeito do cálcio extracelular na sua concentração intracelular permitiu verificar que, quando a concentração extracelular diminuiu de 1 para 0 mM, o valor da concentração intracelular desse ião diminui cerca de 45% (Figura 14). Pelo contrário, quando a concentração extracelular de cálcio aumentava de 1 para 6 mM, verificou-se um aumento de cerca de 32% (Figura 14) Esta resposta das células do EEM às alterações do cálcio externo é semelhante à observada por Coimbra e col. (1992) pois, embora a concentração de cálcio intracelular medida por estes autores fosse muito mais elevada, também eles verificaram que o aumento da concentração de cálcio extracelular provocava um aumento do cálcio intracelular e vice-versa.

Estudou-se então o efeito da Ionomicina na concentração intracelular deste ião. A Ionomicina é um ionóforo de cálcio e devido à sua presença na solução de perfusão, a concentração de cálcio intracelular deveria ficar em equilíbrio com a do meio extracelular. É frequentemente utilizada nos protocolos de calibração *in vivo* da sonda fluorescentes sensíveis a cálcio (MP_3, 2003). Nesses protocolos, a sonda é calibrada dentro das células, uma vez finda a experiência, através da sua resposta à perfusão das células em soluções externas contendo Ionomicina e concentrações diferentes de ião Ca^{2+} (Williams e Fay, 1990).

Tendo em conta estes dados, seria de esperar que o aumento do cálcio extracelular de 1 para 6 mM provocasse um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ superior ao que se verificou o que levaria certamente a uma saturação da sonda Fura-2.

Não foi, no entanto, isso que observámos nas células do EEM. A adição de Ionomicina 10 μM ao Ringer de perfusão que continha já 6 mM de cálcio, provocou um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} de 314 ± 13 nM para 522 ± 28 nM. Foi ainda estudado o efeito na $[Ca^{2+}]_i$, de outras concentrações de Ionomicina (1 e 100 μM), assim como de outro ionóforo de Ca^{2+} (A-23187). O aumento da concentração de cálcio intracelular observado foi semelhante (dados não apresentados).

Surgiu a hipótese de existirem populações de células no EEM com concentrações intracelulares de cálcio livre distintas. Os resultados obtidos utilizando a sonda Fluo 3, observando as células num microscópico de confocal, não nos permitem confirmar essa hipótese. Apenas podemos verificar a existência de algumas células com acumulações pontuais de cálcio que deverão corresponder à presença intracelular de micropérolas, já anteriormente descrita (Machado e col., 1988a).

Por outro lado, as dificuldades encontradas no carregamento da sonda nestas células e os valores elevados da fluorescência de fundo frequentemente obtidos levaram-nos a pôr a hipótese da existência de interferências nas medições com a sonda Fura-2, diminuindo assim a amplitude dos sinais obtidos.

Ravera e col. (2003) quantificaram uma série de catiões divalentes em vários tecidos de alguns bivalves (entre eles, a *Anodonta cygnea*) e plantas aquáticas, doseando a sua massa por grama de peso seco. Entre os catiões que dosearam verificaram que, no manto de *Anodonta cygnea*, o ião Mn^{2+} é o ião mais abundante logo a seguir ao ião Ca^{2+}, apresentando uma relação de massas de 3 Ca^{2+}:1Mn^{2+} (aproximadamente 6:1 em relação de moles) (Ravera e col., 2003).

Sendo assim, qualquer que seja a concentração intracelular efectiva destes dois iões no EEM, e como o Fura-2 possui uma afinidade cerca de 100 vezes superior para o Mn^{2+} do que para o Ca^{2+} ($Kd_{Mn} \cong 10^{-9}$ M, $Kd_{Ca} \cong 10^{-7}$ M), a sonda intracelular encontrar-se-á quase exclusivamente ligada a Mn^{2+}, emitindo um sinal fluorescente com uma intensidade muitíssimo reduzida ou mesmo nula.

Decidiu-se, por isso, estudar o efeito de um quelante do Mn^{2+} (TPEN) na determinação da concentração intracelular de cálcio. Este composto apresenta três vantagens: é um quelante com afinidade elevada para os iões Mn^{2+} (Kd $\cong 10^{-11}$ M) e baixa para Ca^{2+} (Kd $\cong 10^{-5}$ M), e penetra facilmente no interior das células (Arslan e col., 1985).

Se de facto o Mn^{2+} intracelular fosse a causa das interferências verificadas nas medições com o Fura-2, a sonda deveria saturar após a adição do TPEN. Os resultados, representados na Figura 16, não deixam margem para dúvidas. A sonda saturou e uma vez que sondas deste tipo apresentam um intervalo de detecção entre 1.KD e 10.Kd (MP_3, 2003), fomos levados a concluir que a $[Ca^{2+}]_i$ se encontra acima de 3,6 μM.

Mediu-se ainda a concentração intracelular de cálcio utilizando a sonda Mag-fura-5. Esta sonda apresenta propriedades espectrofluorimétricas semelhantes às do Fura-2, permitindo a

utilização do mesmo conjunto de filtros. É utilizada para medir concentrações intracelulares de cálcio iónico situadas entre 3 e 300 μM (MP_4, 2003).

Os resultados são semelhantes aos obtidos com Fura-2. A adição do TPEN ao meio de perfusão leva a uma saturação da sonda Mag-fura-5, o que permite concluir que a concentração de Ca^{2+} intracelular se situa acima de 0,3 mM.

Não existem, actualmente, sondas fluorescentes capazes de medir concentrações de cálcio iónico tão elevadas como as encontradas por Coimbra e col. (1992). Para concentrações acima do milimolar, é recomendado o uso de microeléctrodos ionossensíveis que foi o método utilizado por aqueles autores.

Os nossos resultados parecem confirmar que a concentração de Ca^{2+} intracelular se situa acima de 0,3 mM. Este valor, ainda que inferior ao medido por Coimbra e col. (1992), é o mais elevado reportado para a generalidade das células.

Os resultados então obtidos e os que aqui se apresentam têm uma enorme relevância pois é a primeira vez que se descrevem concentrações de cálcio livre intracelulares tão elevadas.

Tendo em conta que os dados disponíveis na literatura apontam para uma elevada toxicidade do ião Ca^{2+} quando presente livre no citosol em concentrações da ordem do micromolar (Dong e col., 1998; Lee e col., 1995; Orrenius e Nicotera, 1994), é possível postular que as células do EEM possuam uma adaptação especial que lhes permita sobreviver com uma concentração tão elevada daquele ião. A caracterização dessas adaptações está, no entanto, para além do âmbito desta tese.

4. Regulação do pH_i no EEM

Introdução

O pH intracelular de todas as células necessita de ser mantido dentro de limites estreitos pois a concentração hidrogeniónica influencia um grande número de processos celulares vitais, de que são exemplos a síntese proteica e a função mitocondrial (Capuano e Capasso, 2003; Roos e Boron, 1981). A determinação do pH intracelular é assim um parâmetro de grande importância para a manutenção da função celular (Capuano e Capasso, 2003).

Os mecanismos de regulação do pH celular são muito semelhantes em todas as espécies (Roos e Boron, 1981). Em todas elas o pH intracelular é mantido à custa do balanço entre a produção e a eliminação de protões.

A composição do fluido extracelular, que preenche o compartimento onde se dá a formação da concha em *Anodonta cygnea*, está sob o controlo da actividade das células do EEM. É através deste epitélio que passam os constituintes da concha: carbonato, cálcio e moléculas de matriz orgânica. São as células do EEM que controlam o pH do fluido extrapaleal determinando a cada momento a formação ou a reabsorção da concha (Coimbra e col., 1993).

São razoavelmente bem conhecidos os mecanismos de transporte de H^+ e HCO_3^- existentes no EEM (Barrias, 2003; Coimbra e col., 1988; Machado e col., 1990; Rebelo da Costa e col., 1999b).

Utilizando inibidores selectivos de sistemas de transporte membranares e estudando o seu efeito na corrente de curto-circuito (Ccc) gerada pelo EEM, foi identificada a presença de transportadores de membrana directamente envolvidos na translocação de iões H^+ e HCO_3^-, de e para o compartimento intracelular. Este epitélio transporta protões para o compartimento extrapaleal a uma taxa muito elevada, que é igual à taxa de transporte de HCO_3^- para a hemolinfa (Coimbra e col., 1988; Machado e col., 1990). Observações idênticas foram feitas na bexiga urinária da tartaruga (Husted e col., 1979) e no epitélio externo do manto de *Unio complanatus* (Hudson, 1992; 1993). O transporte de protões através da barreira apical das células do EEM é devido à operação de uma bomba de protões (V-ATPase) aí localizada e inibida pela Bafilomicina A_1 e Concanamicina A (Rebelo da Costa, 1994; Rebelo da Costa e col., 1999b). Bombas de protões deste tipo foram também identificadas na barreira apical do epitélio da bexiga urinária da tartaruga (Steinmetz e Andersen, 1982) e do sapo Bufo marinus (Ludens e Fanestil, 1972), na pele da rã (Ehrenfeld e col., 1985) e no manto de *Unio complanatus* (Hudson, 1992; Hudson, 1993).

Foi ainda identificada a presença na barreira basolateral do EEM, de um transportador HCO_3^-/Cl^-, inibido por SITS e DIDS (Coimbra e col., 1988), de um trocador Na^+/H^+, sensível a Amiloride (Coimbra e col., 1988) e de um transportador HCO_3^-/Cl^- dependente de Na^+, inibido de um modo específico por TNBS (Barrias, 2003).

O estudo da sensibilidade da Ccc ao inibidor específico da anidrase carbónica Diamox, feito por Coimbra e col. (1988) e Machado e col. (1990), levou estes autores a concluirem que aquela enzima desempenha um papel importante no fornecimento de iões H^+ e HCO_3^- essenciais para a génese da corrente de curto-circuito. Na presença de Diamox, a Ccc é inibida (Coimbra e col., 1988), assim como a taxa de secreção de ácido para o compartimento extrapaleal e a taxa de secreção de base para a hemolinfa (Machado e col., 1990).

Este trabalho foi realizado com o objectivo de medir o pH intracelular das células do epitélio externo do manto, utilizando sondas fluorescentes ionossensíveis, e estudar o efeito de inibidores de sistemas de transporte membranares e do cálcio extracelular no pH intracelular.

Material e Métodos

Material Biológico

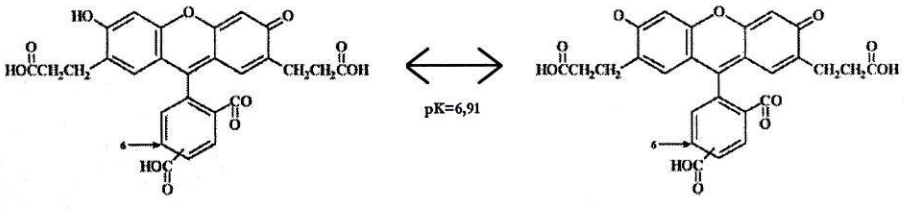
O material biológico utilizado para este trabalho foi o bivalve de água doce Anodonta cygnea, colhido e mantido no laboratório nas condições descritas na secção equivalente do capítulo 3.

Isolamento e viabilidade das células de EEM

O isolamento das células do EEM assim como o estudo da sua viabilidade está descrito no capítulo 3.

Determinação do pH intracelular em células isoladas do EEM

Para as determinações de pH intracelular foi utilizada a sonda BCECF (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-carboxifluoresceína), desenvolvida por Rink e col. (1982). Esta sonda, derivada da fluoresceína, quando introduzida dentro das células pode estar sob uma de duas formas distintas, monoaniónica ou dianiónica, que apresentam espectros de excitação igualmente distintos (Figura 20). Esta propriedade permite que seja determinada uma razão entre a emissão do sinal de fluorescência (λ_{em}=535 nm) a cada um dos comprimentos de onda de excitação, que será proporcional à concentração hidrogeniónica dentro da célula (F490/F440).



Forma monoaniónica
λ_{exc}=440 nm

Forma dianiónica
λ_{exc}=490 nm

Figura 20. Estrutura das formas iónicas da sonda BCECF e respectivos comprimentos de onda de excitação máximos (Rink e col., 1982).

Tal como para a sonda Fura-2, foi utilizado um derivado AM da BCECF que, ao contrário da forma não-estereficada, não apresenta fluorescência, introduz-se facilmente nas células e uma vez no interior é hidrolizado por estereases não específicas à forma fluorescente BCECF.

Carregamento da sonda

As células de EEM foram incubadas numa solução de *Ringer Anodonta 1* Ca^{2+} (500 µL) contendo 10 µM de BCECF-AM e Pluronic 0,03% durante 60 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão celular foi centrifugada a 500.*g*, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em *Ringer Anodonta 1* Ca^{2+}. O processamento da sonda foi feito durante 15 minutos, à temperatura ambiente. As células foram então transferidas para a câmara de observação.

Calibração

A calibração da sonda BCECF foi realizada utilizando o método *in vivo* (Thomas, 1986).

De modo a poder converter os sinais de fluorescência em valores de pH citosólico, no fim de cada protocolo, procedia-se a uma calibração *in vivo* em que as células eram perfundidas com soluções de valor de pH conhecido (5,5 e 9,0) às quais foi adicionado o ionóforo Nigericina (10 µM). Mediram-se as intensidades de fluorescência em cada situação.

Para converter a fluorescência medida (razão F490/F440) em valores de pH no citosol, utiliza-se a seguinte equação:

$$pH = pK + \log\frac{(R - R_A)}{(R_B - R)} x \frac{F^{Ac}{}_{440}}{F^{Bas}{}_{440}}$$

em que:

pK - logaritmo da constante de dissociação para a BCECF;

R - rácio da intensidade de fluorescência (F490/F440) da amostra;

$\mathbf{R_A}$ - rácio da intensidade de fluorescência (F490/F440) da solução padrão pH 5,5;

$\mathbf{R_B}$ - rácio da intensidade de fluorescência (F490/F440) da solução padrão pH 9,0;

$\mathbf{F^{Ac}{}_{440}}$ - intensidade de fluorescência a 440 nm da solução padrão pH 5,5;

$\mathbf{F^{Bas}{}_{440}}$ - intensidade de fluorescência a 440 nm da solução padrão pH 9,0.

Para determinarmos o valor da constante de dissociação foram efectuadas medições fixando o comprimento de onda de emissão a 510 nm e registando os valores de intensidade de fluorescência obtidos para os comprimentos de onda de excitação, em células perfundidas com soluções de valor de pH crescente (5,5, 6,5, 7,4, 8,0 e 9,0) às quais foi adicionado o ionóforo Nigericina (10 μM). Mediram-se as intensidades de fluorescência em cada situação e fazendo a representação gráfica da função

$$\left\{ pH = f\left(\log \frac{(R - R_A)}{(R_B - R)} \right) \right\}$$

o valor de **pK** é dado pelo valor da abcissa na origem.

Determinação da fluorescência de fundo

Após realizadas as medições do pH intracelular, assim como as calibrações necessárias, removeram-se as células da câmara de observação e perfundiu-se *Ringer Anodonta 1* Ca^{2+}. Nestas condições, fez-se a medição da intensidade de fluorescência de fundo.

A intensidade de fluorescência citosólica proporcional à concentração hidrogeniónica no citosol resulta da diferença entre a intensidade de fluorescência total e a intensidade de fluorescência de fundo, para cada comprimento de onda de excitação.

Protocolos utilizados

O protocolo utilizado para medir o pH intracelular nas células do EEM consistiu sequencialmente: na dissecção do EEM, isolamento das células, carregamento da sonda, transferência das células para a câmara de perfusão, perfusão das células com Ringers de composição conhecida e leitura simultânea da intensidade de fluorescência, determinação da fluorescência de fundo e calibração da sonda.

Estudou-se o efeito de uma sobrecarga ácida das células do EEM no pH intracelular, perfundindo as células com NH_4Cl 50 mM.

Estudou-se o efeito de substâncias inibidoras de sistemas de transporte membranares no pH intracelular de células do EEM. Os inibidores utilizados foram a Bafilomicina A_1 10 μM, a Concanamicina A 10 μM e o Amiloride 1 mM.

Foram igualmente realizadas determinações do pH intracelular em que se alteraram as concentrações do ião cálcio na solução exrracelular (de 1 mM para 0 ou 6 mM) e em que

simultaneamente se alteraram as concentrações do ião cálcio extracelulares e se adicionou Amiloride 1 mM.

Foi ainda estudado o efeito do ião HCO_3^- no pH intracelular.

Soluções utilizadas

	Ringer Bicarbonato	Ringer NH_4Cl
NaCl	5	5
KCl	1	1
$MgCl_2$	0,5	0,5
$CaCl_2$	1	1
HEPES	10	10
$NaHCO_3$	10	-
NH_4Cl	-	10
pH	7,4 (NaHO)	7,4 (NaHO)

Tabela 2. Composição das diversas soluções utilizadas (em mM).

Nas Tabela 1 (Capítulo 3) e 2 estão descritas as composições das diferentes soluções utilizadas nos procedimentos experimentais.

Resultados

Determinação da constante de dissociação da BCECF

Para podermos transformar os sinais de fluorescência obtidos com a BCECF em valores de pH intracelular foi necessário determinar o valor da constante de dissociação para esta sonda.

Obteve-se um valor médio para o pK_{BCECF} de 6,92 ± 0,2 (n=6).

Determinação do pH intracelular

Depois de determinado o pK da BCECF, fez-se uma série de determinações do valor pH intracelular em grupos de células de EEM (5 a 10 células por grupo). Nas experiências realizadas obteve-se uma distribuição de resultados ilustrada na Figura 21. Como se pode verificar o pH intracelular situa-se entre os valores 6,5 e 7,1, com um valor médio de 6,8 ± 0,1.

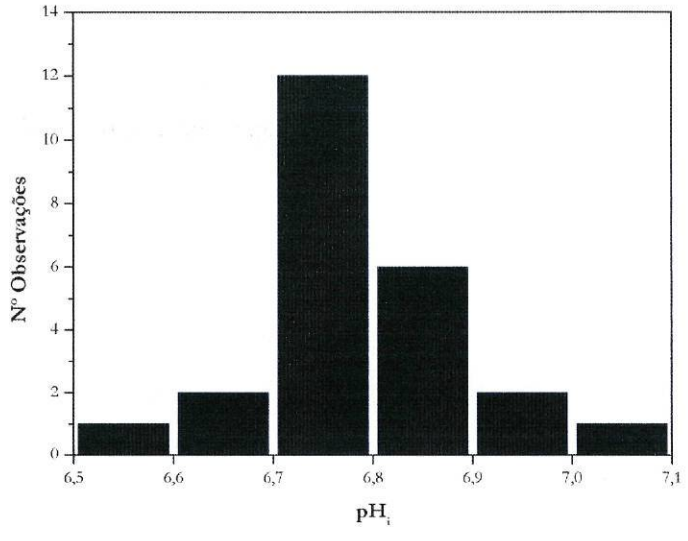


Figura 21. Distribuição das medições de pH_i em células isoladas de EEM (n=24).

Efeito do NH_4Cl no pH intracelular

De modo a obter uma situação de acidose intracelular, perfundiram-se as células do EEM com ringer contendo NH_4Cl 50 mM. A perfusão de células com este composto tem sido utilizada para estudar os mecanismos de regulação do pH em várias espécies de vertebrados e invertebrados (Boron, 1977; Lagadic-Gossmann e col., 1992; Thomas, 1976).

O propósito das nossas experiências era estudar o efeito de inibidores selectivos de diferentes sistemas de transporte membranar, na extrusão de ácido e pH intracelular, de modo a perceber quais os transportadores envolvidos na regulação do pH_i nas células do EEM.

A exposição das células ao ião NH_4^+ resulta num aumento do pH_i. O NH_4^+ em solução dissocia-se originando amoníaco (NH_3). Este composto difunde-se através da membrana e uma vez no interior das células pode combinar-se com protões aí existentes formando NH_4^+, segundo a reacção

$$NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+ .$$

Verifica-se depois uma descida lenta do pH_i devido ao suposto influxo passivo de NH_4^+ (Aickin, 1988; Roos e Boron, 1981; Schlue e Deitmer, 1988).

A remoção de NH_4Cl da solução exterior, provoca uma diminuição do pH_i para valores inferiores ao inicial, reflectindo esta queda a entrada passiva de NH_4^+. A recuperação do pH_i para valores controlo é dependente da taxa de excreção dos protões existentes na célula. É durante esta fase de recuperação que se costuma estudar o efeito de inibidores no efluxo de protões, provocado pela sobrecarga ácida.

Nas células do EEM, quando perfundidas durante 9 minutos com Ringer contendo NH_4Cl 50 mM (Figura 22), verifica-se um aumento do pH intracelular de 6,80 ± 0,02 para 7,65 ± 0,12 seguida de uma diminuição para 7,52 ± 0,11 e novamente uma recuperação até 7,71 ± 0,26. Quando se remove o NH_4^+, o pH desce para 6,95 ± 0,03, um valor de pH acima do valor controlo, subindo novamente até ao fim da experiência. Como se pode constatar não foi possível nestas células obter uma acidose intracelular.

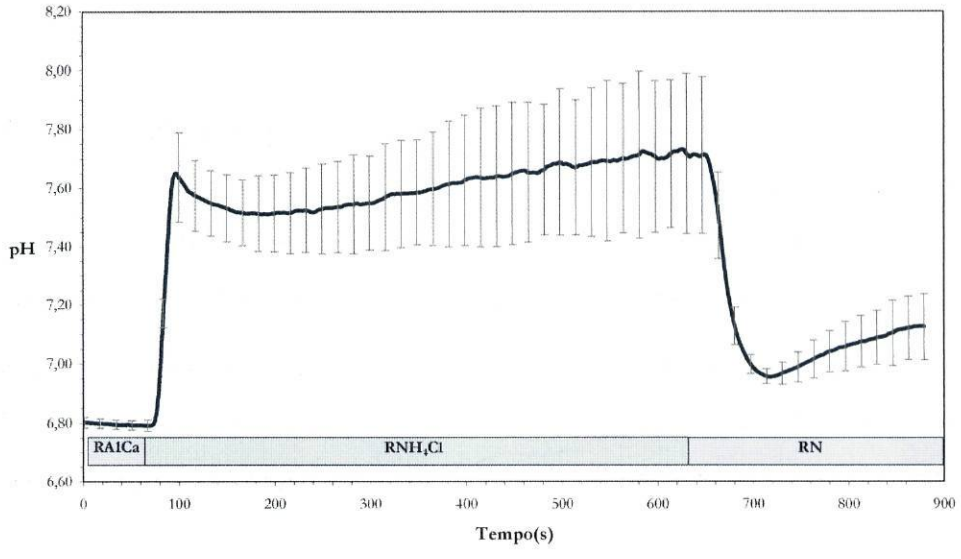


Figura 22. Efeito da sobrecarga com NH_4Cl 50 mM no pH intracelular das células de EEM de *Anodonta cygnea* (RA1Ca – Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}; RNH_4Cl - Ringer NH_4Cl) (média ± e.p.m.; n=6).

Efeito de inibidores específicos no pH intracelular

Efeito da Bafilomicina A_1 e Concanamicina A

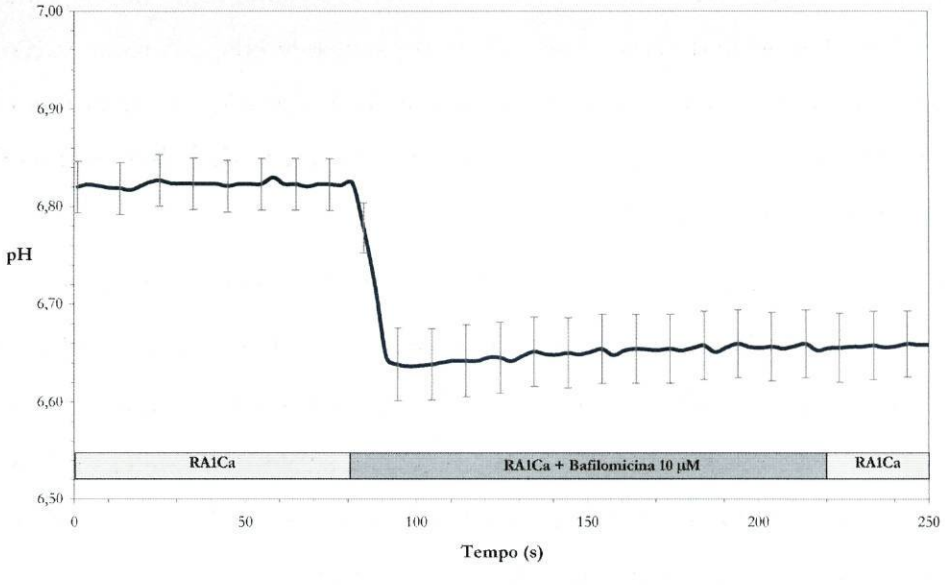


Figura 23. Efeito da Bafilomicina A_1 10 µM no pH intracelular das células de EEM de *Anodonta cygnea* (RA1Ca – Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}) (média ± e.p.m.; n=5).

O efeito de inibidores específicos de V-ATPases no pH intracelular das células de EEM foi estudado na presença de *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*. Ao adicionar-se Bafilomicina A_1 à solução extracelular, verificou-se uma diminuição do pH intracelular de 6,82 ± 0,03 para 6,65 ± 0,04 (Figura 23), sendo este efeito irreversível. A adição de Concanamicina A provocou uma diminuição igualmente irreversível de 6,78± 0,01 para 6,68 ± 0,01 (Figura 24).

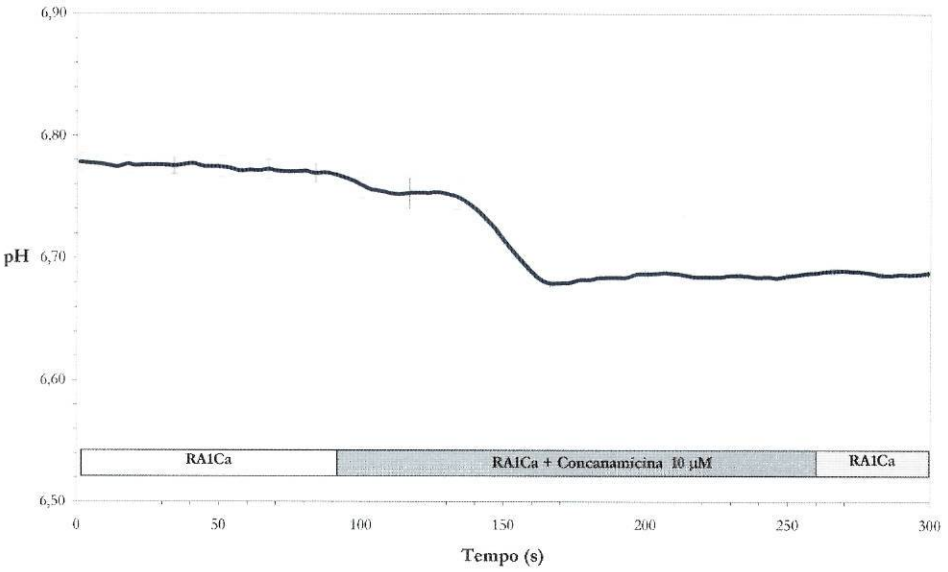


Figura 24. Efeito da Concanamicina A 10 µM no pH intracelular das células de EEM de *Anodonta cygnea* (RA1Ca – Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}) (média ± e.p.m.; n=3).

Efeito do Amiloride

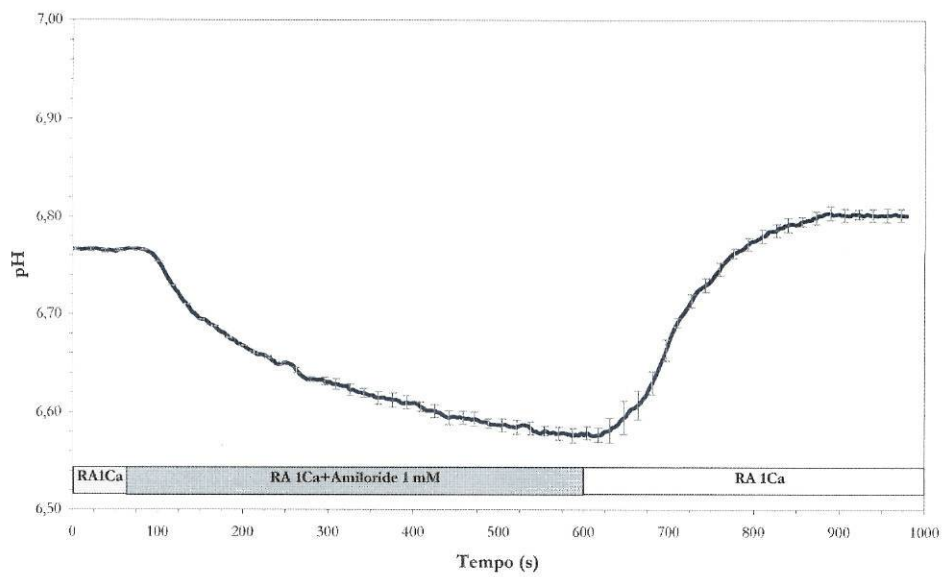


Figura 25. Efeito do Amiloride 1 mM no pH intracelular das células de EEM de *Anodonta cygnea* (RA1Ca – Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}) (média ± e.p.m.; n=5).

Quando se adicionou Amiloride 1 mM, na presença de *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}*, o pH intracelular diminui de 6,74 ± 0,01 para 6,58 ± 0,01 (Figura 25), sendo este efeito revertido quando se perfundiram novamente as células com *Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}* sem o inibidor. O efeito do Amiloride foi mais lento quando comparado com o efeito da Bafilomicina A1 e da Concanamicina A.

Efeito do ião bicarbonato

A adição de ião HCO_3^- (10 mM) às células de EEM diminui o pH intracelular de 6,80 ± 0,03 para 6,68 ± 0,03, sendo este efeito rapidamente revertido (Figura 26).

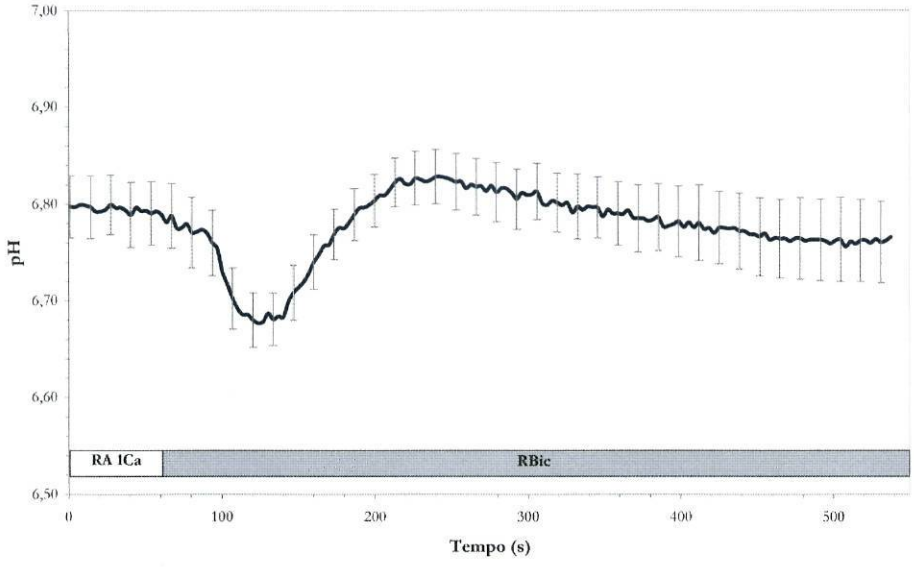


Figura 26. Efeito do ião bicarbonato 10 mM no pH intracelular das células de EEM de *Anodonta cygnea* (RA1Ca – Ringer Anodonta 1 Ca^{2+}; RBic - Ringer Bicarbonato) (média ± e.p.m.; n=3).

Efeito da [Ca^{2+}] extracelular no pH intracelular

As células incubadas com a sonda fluorescente BCECF foram perfundidas com soluções de composições diferentes de modo a verificar a efeito da concentração extracelular de cálcio no pH intracelular destas células. Verificou-se que, quando a concentração extracelular de cálcio em contacto com as células de EEM diminuía de 1 para 0 mM, o valor do pH intracelular diminui de 6,73 ± 0,05 para 6,38 ± 0,06. Pelo contrário, quando a

concentração extracelular de cálcio aumentou de 1 para 6 mM, verificou-se um aumento de 6,76 ± 0,02 para 6,93 ± 0,01. Os efeitos destas alterações foram revertidos quando se alterou novamente o valor da concentração extracelular de cálcio para 1 mM (Figura 27).

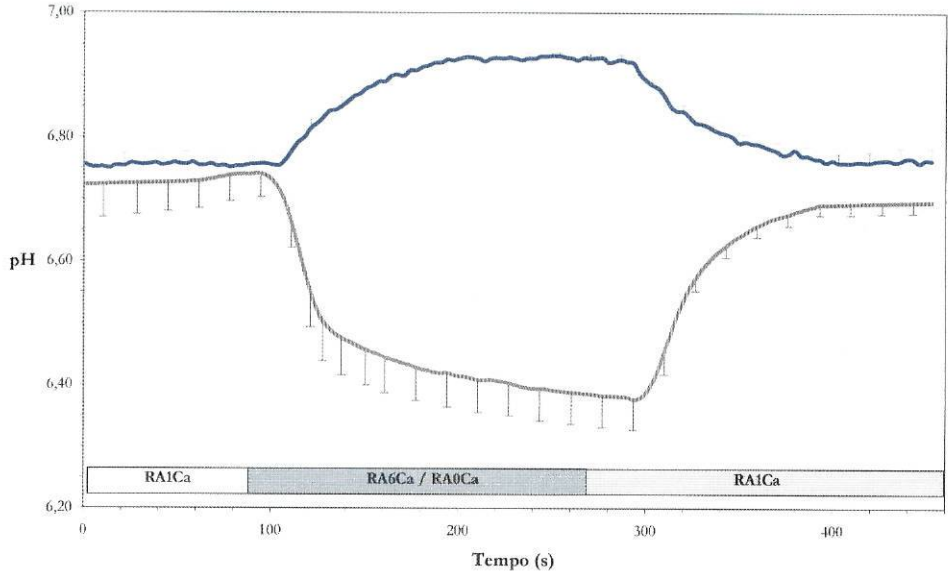


Figura 27. Medição do pH intracelular nas células de EEM de *Anodonta cygnea* perfundidas com soluções de diferente concentração de Ca^{2+} (RA1Ca – 1 mM Ca^{2+}; RA0Ca - 0 mM Ca^{2+}; RA6Ca - 6 mM Ca^{2+}) (média ± e.p.m.; n=5).

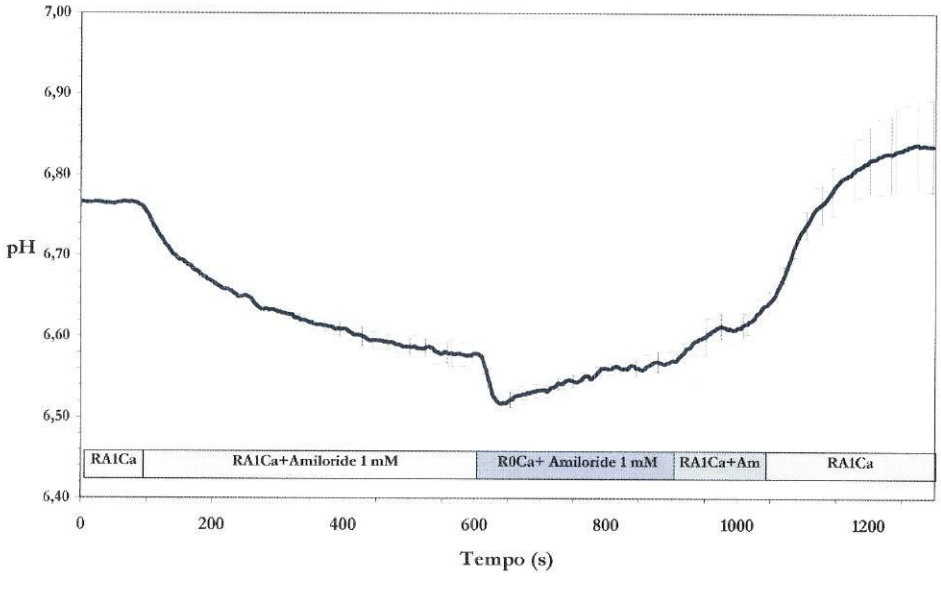


Figura 28. Efeito do Amiloride 1 mM no pH intracelular das células de EEM de *Anodonta cygnea* perfundidas com soluções de diferente concentração de Ca^{2+} (RA1Ca – 1 mM Ca^{2+}; RA0Ca - 0 mM Ca^{2+}; Am -Amiloride 1mM) (média ± e.p.m.; n=5).

Quando, na presença de Amiloride (pH 6,58 ± 0,02), se retirou o ião cálcio da solução extracelular, o pHi diminuiu rapidamente para 6,52 ± 0,02, voltando novamente a subir para um valor de 6,57 ± 0,01 (Figura 28). Novamente na presença de 1 mM de Ca^{2+}, o pH sobe para 6,61 ± 0,02 e para 6,83 ± 0,06, quando se retira o Amiloride da solução externa.

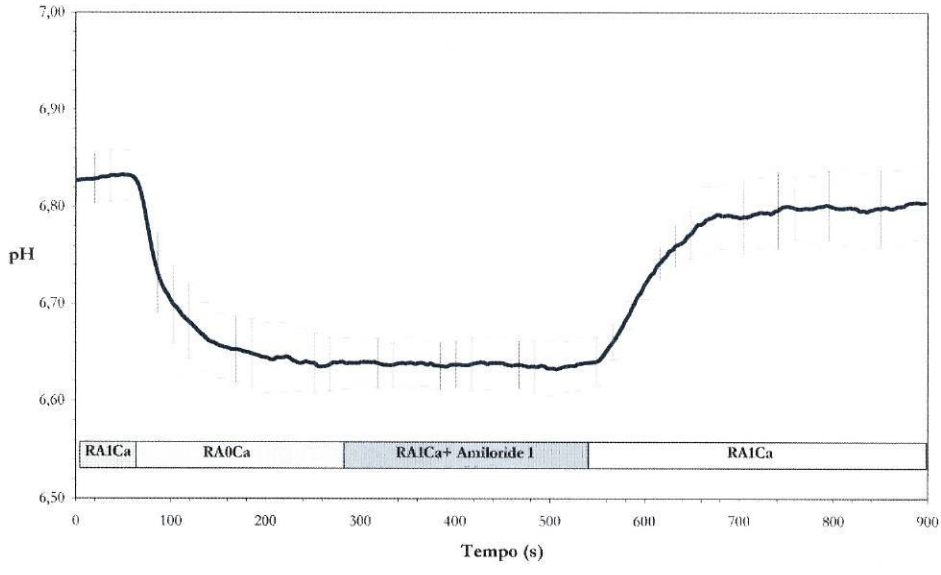


Figura 29. Efeito do Amiloride 1 mM no pH intracelular das células de EEM de *Anodonta cygnea* perfundidas com soluções de diferente concentração de Ca^{2+} (RA1Ca – 1 mM Ca^{2+}; RA0Ca - 0 mM Ca^{2+}) (média ± e.p.m.; n=5).

Para verificar se as alterações no pHi induzidas pela alteração da concentração de Ca^{2+} extracelular eram dependentes de um trocador sensível a Amiloride, a células perfundidas com *Ringer Anodonta 0* Ca^{2+} adicionou-se *Ringer Anodonta 1* Ca^{2+} com Amiloride 1 mM. Ao contrário do que acontece na ausência de Amiloride, neste caso o efeito da alteração da concentração de cálcio externo não se verificou, mantendo-se o pH intracelular a 6,64 ± 0,03. Quando se retirou o inibidor da solução externa o pHi subiu para 6,80 ± 0,04 (Figura 29).

Discussão

Numa grande variedade de células de espécies de vertebrados e invertebrados o pH intracelular, medido com sondas fluorescentes, situa-se entre 6,8 (Nordström e col., 1995) e 7,6 (Yip e col., 2002).

O pH intracelular médio das células do EEM, medido com a sonda fluorescente BCECF, tem um valor de 6,8 ± 0,1 (n=24). O pH foi medido com as células perfundidas numa solução contendo Hepes 10 mM, na ausência de bicarbonato e CO_2 extracelulares. Quando comparado com o determinado com microeléctrodos sensíveis (6,4 ± 0,1), por Rebelo da Costa (1994) verifica-se que é mais elevado. Essas determinações foram realizadas na presença de CO_2 e HCO_3^- extracelular. Schlue e col. (1988) verificaram uma situação semelhante ao medirem o pH de neurónios. Na presença de CO_2 e HCO_3^- o pH_i era ligeiramente mais ácido. Foi, no entanto, encontrada pelos mesmos autores uma situação inversa: nas células da glia o pH_i é mais elevado na presença de CO_2 e HCO_3^-, quando comparado com o valor obtido na presença de Hepes 10 mM.

O estudo da regulação do pH na maioria das células tem sido realizado determinando o efeito de inibidores de transporte na taxa de recuperação do pHi após uma sobrecarga ácida. Esta taxa é um índice da capacidade da célula em excretar os protões que permanecem no citoplasma depois da dissociação do NH_4^+ e da saída do NH_3.

Nas células do EEM não foi possível obter uma sobrecarga ácida ainda que se tivesse usado uma concentração de NH_4Cl elevada (50 mM). O pH intracelular não desceu abaixo do valor inicial, após a remoção do NH_4Cl da solução extracelular, tal como acontece na maioria das células (Boron e col., 1981; Lagadic-Gossmann e col., 1992). Embora se possa especular acerca da assumida permeabilidade ao NH_4^+ das células em geral e das do EEM, em particular, que é responsável pela descida do pH abaixo do valor inicial, é provável que a ausência do efeito também se possa dever ao tempo de exposição ao NH_4Cl utilizado. Boron e col. (1976) obtiveram uma diferença de pH de 0,64, no axónio gigante da Lula, exposto durante cerca de 2 horas a uma solução de NH_4Cl 10 mM. No entanto, na mesma célula, uma exposição de 25 minutos leva a uma descida de pH de 0,2 unidades.

O estudo do efeito de inibidores específicos das V-ATPases Bafilomicina A_1 e Concanamicina A permitiu relacionar o transporte de protões neste epitélio com o pH intracelular. Os resultados apresentados mostram que na presença de Bafilomicina A_1 ou

Concanamicina A 10 μM o pH intracelular diminuiu. O efeito da Bafilomicina A_1 é mais rápido que o da Concanamicina A (15 e 105 seg, respectivamente) e é mais acentuado (delta 0,17 e 0,11, respectivamente).

Uma vez que tanto a Bafilomicina A_1 como a Concanamicina A são dois inibidores específicos da V-ATPase, a diminuição do pH intracelular obtida, a que corresponde um aumento da $[H^+]$ intracelular, será devida à inibição da bomba electrogénica de protões presente nestas células. Estes dois antibióticos provocaram uma diminuição de cerca de 90% da Ccc gerada pelo EEM, quando colocados em contacto com a membrana apical das células (Rebelo da Costa e col., 1999b). A Bafilomicina A_1 também provoca uma inibição mais rápida da Ccc do que a Concanamicina A (Rebelo da Costa e col., 1999b).

Um efeito da Bafilomicina A_1 no pH intracelular, semelhante ao encontrado por nós nas células do EEM, foi descrito em macrófagos alveolares e peritoniais de carneiro (Heming e col., 1995) e em osteoclastos de coelho (Lees e Heersche, 2000). Outros autores estudaram o feito da Bafilomicina A_1 na recuperação do pH, após uma sobrecarga ácida tendo verificado uma inibição da recuperação quando em presença daquele inibidor (Saliba e Kirk, 1999; Sotz e col., 2002).

Se, como está descrito, o Amiloride actua no trocador Na^+/H^+ existente na membrana basolateral das células do EEM (Coimbra e col., 1988), seria de esperar, tal como aconteceu, que provocasse um aumento da concentração de H^+ intracelular. O efeito no pH é reversível tal como é reversível a inibição, pelo Amiloride, da Ccc gerada por este epitélio.

O efeito da introdução no meio extracelular do ião bicarbonato provocou uma redução inicial do pH que é difícil de explicar, pois uma diminuição do fluxo do trocador HCO_3^-/Cl^- ou o aumento do trocador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$ provocada pelo aumento de HCO_3^- extracelular, levaria a um aumento do bicarbonato intracelular e consequentemente a um aumento do pH_i. O aumento do pH_i verificado de seguida está de acordo com o efeito tampão deste composto - reacção com os protões intracelulares e consequente aumento do pH intracelular.

Coimbra e col (1988) verificaram que, em condições de curto-circuito, um aumento da concentração de ião cálcio nos banhos exteriores induzia uma diminuição da corrente transepitelial. Como referido, a Ccc que se observa no EEM é quase exclusivamente devida à acção de uma bomba (V-ATPase) que transporta H^+ do meio intracelular para o fluido extracelular em contacto com a barreira apical. Não há igualmente dúvida de que a remoção e o aumento do cálcio externo levam respectivamente a uma diminuição e a um aumento do

Ca^{2+} intracelular. Esta constatação resulta da análise dos resultados por nós obtidos e dos resultados obtidos por Coimbra e col. (1992).

O efeito do cálcio na Ccc pode ocorrer por duas vias distintas: por inibição da bomba de H^+ ou diminuição da concentração de iões H^+ no meio intracelular. Ambas as vias implicarão uma redução da taxa de transporte pela bomba de H^+ e, por isso, da Ccc.

Está descrita em células de fava (Kinoshita e col., 1995) que a concentração do ião Ca^{2+} controla a actividade de uma V-ATPase na membrana plasmática. Para além disso, o ião cálcio poderá interactuar com esta bomba membranar por alteração de outros parâmetros celulares, nomeadamente o potencial, que apresenta uma despolarização quando se aumenta a concentração extracelular desse ião (Rebelo da Costa, 1994). A alteração deste ou doutro parâmetro celular poderá conduzir a uma inibição da V-ATPase e diminuição da Ccc. A ser assim, o aumento da concentração extracelular de Ca^{2+} levaria a um aumento da concentração de iões H^+ (diminuição do pH_i) no interior da célula, tal como se verificou aquando das medições do pH_i com adição dos inibidores Concanamicina A (Figura 24) e Bafilomicina A_1 (Figura 23).

Nas medições do pH_i que realizámos em que se alterou a concentração extracelular de Ca^{2+} observámos que um aumento desse valor implica um aumento do pH_i e uma diminuição implica igualmente uma diminuição do pH_i. Estas observações contrariam a hipótese de uma acção do ião Ca^{2+} sobre a bomba de H^+. Antes parece verificar-se que o efeito desse ião sobre a Ccc se efectua através da modulação da concentração intracelular de H^+. Assim sendo, era necessário esclarecer se o efeito do Ca^{2+} no pH_i se efectuaria via a modulação da produção intracelular de H^+ (por alteração da actividade de enzimas como anidrase carbónica) ou por modulação do fluxo de partícula ácidas ou básicas da célula através dos transportadores membranares (que não a V-ATPase).

Se o aumento de cálcio estimular o trocador Na^+/H^+, essa estimulação levaria a uma diminuição da concentração intracelular de protões e consequente a um aumento do pH_i. Esta hipótese está de acordo com os resultados obtidos por nós acerca do efeito do cálcio no pH intracelular.

O efeito no trocador não deverá ser mediado indirectamente por um efeito no potencial de membrana pois um aumento do Ca^{2+} intracelular leva a uma despolarização celular que, por sua vez faria, diminuir a força electromotriz do sódio. Em consequência, a taxa de transporte através do trocador diminuiria o que levaria a uma diminuição do pH_i. Mais uma vez não é o que se verifica nos nossos resultados.

Nas experiências em que tentámos esclarecer a dependência do efeito do Amiloride e do efeito do cálcio intracelular no pH_i, os resultados parecem indicar que os dois efeitos são independentes. A ligeira diminuição do pH_i verificada após a remoção do cálcio externo e o aumento do pH_i verificado após a sua reintrodução na presença do amiloride (Figura 28) só poderia ter acontecido se o efeito do cálcio e o efeito do amiloride no pH_i fossem independentes. Os resultados apresentados na Figura 29 não permitem esclarecer mais esta situação, uma vez que a não alteração do pH_i quando se adiciona cálcio ao meio externo na presença de amiloride pode significar que os dois efeitos no pH_i são independentes, de igual amplitude e de sinal contrário ou, pelo contrário, que os dois efeitos são dependentes, sendo o efeito do cálcio sobreponível ao efeito do amiloride.

O efeito do aumento da $[Ca^{2+}]_o$ no pH_i pode ainda ser devido a uma alteração da permeabilidade da membrana em geral, a qual é controlada pela concentração extracelular daquele ião. Um aumento da $[Ca^{2+}]$ no compartimento extracelular provoca uma diminuição da permeabilidade em geral impedindo a entrada de Na^+ (Guyton e Hall, 2000). A diminuição da $[Na^+]_i$ conduzirá a uma diminuição do rácio $[Na^+]_i/[Na^+]_o$ e a um aumento do transporte de protões via trocador Na^+/H^+. A diminuição da $[Na^+]_i$ aumentará a extrosão de protões e levará a um aumento de pH_i. Este efeito indirecto do cálcio extracelular no pH intracelular está de acordo com os resultados por nós obtidos (Figura 27).

No entanto, os resultados parecem indicar que o efeito da variação da $[Ca^{2+}]$ extracelular no pH_i resulta, pelo menos em parte, de um efeito no trocador Na^+/H^+, podendo esse ser exercido directa ou indirectamente.

Resta ainda discutir o efeito do cálcio na produção intracelular de protões. Neste epitélio, as alterações induzidas nas taxas de secreção de base (para o lado da hemolinfa) e de ácido (para o lado da concha) pelo Diamox, um inibidor da anidrase carbónica, são muito semelhantes às alterações observadas na Ccc (Machado e col., 1990). A Ccc é ainda sensível à concentração de CO_2, bicarbonato ou protões na solução que banha o lado apical do epitélio (Machado e col., 1990). Estes dados apontam para que, pelo menos em parte, o transporte de HCO_3^- é depende do fornecimento às células deste ião através da hidratação catalizada do CO_2 (Coimbra e col., 1988).

Puscas e col. (Puscas e col., 2001) verificaram que a administração de $CaCl_2$ a humanos, provoca um aumento da $[Ca^{2+}]$ no sangue e uma estimulação da actividade da anidrase carbónica existente nas células da mucosa gástrica. O efeito do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ no pH_i não pode ser explicado, no entanto, por um aumento da actividade da enzima anidrase

carbónica, pois essa estimulação levaria a um aumento da produção de protões e a uma diminuição do pH_i, o que não se verifica.

Tal como nas células do EEM, há outras células em que está descrito que o aumento do cálcio intracelular acompanha o aumento de pH_i (Johnson e Epel, 1976; Kyozuka e col., 1997; Moser e col., 1996). Estão neste caso os oócitos do ouriço do mar e da ostra em que, na altura da fertilização se verifica um aumento do cálcio que é acompanhado por um aumento do pH intracelular (Johnson e Epel, 1976; Kyozuka e col., 1997). Segundo Jonhson e col. (1976) este aumento do pH_i é produzido pela activação do antiporte Na^+/H^+. Moser e col. (1996) ao estudarem o efeito da concentração de cálcio extracelular nos transportadores de iões envolvidos na regulação do pH_i, verificaram também uma diminuição do seu valor quando retiravam o cálcio da solução extracelular em neurónios de crustáceos e um aumento do pH_i na situação inversa - aumento de cálcio extracelular.

Noutras células, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ leva a uma diminuição do pH_i. Este efeito está descrito por exemplo em osteoblastos (Green e Kleeman, 1992) ou em células isoladas do túbulo proximal de coelho (Yamada e col., 1996). Em ambos os tipos de células o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inibe o trocador Na^+/H^+.

5. Caracterização Bioquímica da V-ATPase do EEM

Introdução

O EEM de *Anodonta cygnea* gera uma corrente sob condições de curto-circuito (Ccc) que, quando expressa em termos de fluxo iónico, tem uma magnitude igual à do fluxo de iões bicarbonato através da membrana basolateral e à do fluxo de protões através da membrana apical daquele epitélio (Machado e col., 1990).

Segundo Machado e col. (1990), o fluxo de protões responsável pela Ccc gerada, deve-se à operação de uma bomba electrogénica de protões localizada na membrana apical das células do EEM. Estes dados foram confirmados em *Unio complanatus* (Hudson, 1993). A evidência directa da presença da V-ATPase na membrana apical foi obtida por Rebelo da Costa e col. em 1999. Estes autores estudaram o efeito dos inibidores específicos das V-ATPases, Bafilomicina A_1 e Concanamicina A, na Ccc do EEM e verificaram que, quando colocados do lado da concha, inibem rápida e quase completamente a Ccc gerada pelo EEM. Estas observações apontaram para um efeito directo dos inibidores na bomba de protões localizada na membrana apical (concha) (Rebelo da Costa e col., 1999b).

As V-ATPases estão quase sempre em contacto com um compartimento fechado como, por exemplo, as lacunas de reabsorção dos osteoclastos (Blair, 1998; Nelson, 1992) ou a cavidade interna dos vacúolos (Bowman e col., 1989; Bowman e Bowman, 1982). Transportam protões para esses compartimentos e por esse motivo desempenham um papel importante na determinação do seu pH (Harvey, 1992b; Nelson, 1992).

À semelhança de outras V-ATPases , a que existe na membrana apical das células do EEM (Rebelo da Costa e col., 1999b) também está em contacto com um espaço limitado, a cavidade extrapaleal, que contém o líquido extrapaleal (LEP). A acção desta V-ATPase desempenha um papel importante nos processos de formação e reabsorção da concha uma vez transporta protões para a cavidade extrapaleal.

De um ponto de vista estritamente químico, a formação ou reabsorção de cristais de carbonato de cálcio (principal componente inorgânico da concha) implica um deslocamento da reacção global:

$$HCO^-_{3\,(aq)} + Ca^{2+}{}_{(aq)} \leftrightarrow CaCO_{3(aq)} + H^+{}_{(aq)}$$

(LEP) (LEP) (Concha) (LEP)

para a direita ou para a esquerda, como resultado de alterações da concentração de HCO_3^-, Ca^{2+} e H^+ no líquido extrapaleal e/ou da acção dos mecanismos de nucleação dependentes da matriz orgânica. A concentração de protões pode determinar o sentido das trocas de cálcio entre o LEP e a concha (Coimbra e col., 1993; Coimbra e col., 1988).

O EEM possui assim particular relevância, uma vez que pode constituir um sistema de eleição para o estudo de uma ATPase tipo V, tão largamente difundida e consequentemente de grande valor funcional. No contexto da biomineralização, o EEM é particularmente interessante porque enquanto no osso os elementos celulares estão mergulhados na trama óssea e são portanto, inacessíveis a estudos electrofisiológicos, o EEM é uma estrutura separada que pode ser estudada isoladamente.

Este trabalho visa a caracterização bioquímica da V-ATPase presente no EEM de *Anodonta cygnea.*

Material e Métodos

Isolamento e homogeneização do EEM

Utilizaram-se neste trabalho exemplares de *Anodonta cygnea* colhidos e mantido em laboratório como descrito no capítulo 3. O isolamento do EEM foi também realizado de acordo com a descrição feita no mesmo capítulo.

O EEM previamente isolado foi cortado com o auxílio de uma tesoura e processado segundo as diferentes necessidades experimentais: montagem em câmaras de Ussing ou homogeneizado para determinação da actividade enzimática.

O epitélio foi lavado numa solução contendo 250 mM Sacarose, 5 mM HEPES, pH 7,4 (com HCl 1M) e em seguida homogeneizado na mesma solução (8% peso/volume). A homogeneização foi realizada com homogeneizador (*Heindolph 50111*), utilizando um pistão de Teflon (30 vezes; 1000 rpm), e o Homogenato foi filtrado através de uma gaze. As amostras, quando não utilizadas imediatamente, foram congeladas e mantidas a -70°C.

Actividade enzimática

A *Solução de Incubação* utilizada para determinar a actividade enzimática continha $MgSO_4$ (6 mM), HEPES (50 mM, pH 7,4), Na_2SO_3 (200 mM), ortovanadato de sódio (0,5 mM), azida de sódio (0,5 mM) e Na_2ATP (3 mM), excepto quando indicado.

Amostras de Homogenato filtrado (0,1 mL) foram incubadas em *Solução de Incubação* (1mL) durante 60 minutos a 23-25°C, na presença ou na ausência de inibidor específico das V-ATPases. A reacção foi parada pela adição de 1 mL de TCA 3%.

Para as leituras espectrofotométricas, os brancos foram preparados de modo idêntico ao descrito para os ensaios enzimáticos. A amostra de tecido foi neste caso adicionada depois da adição de TCA.

A quantificação dos fosfatos (Pi) foi feita adicionando 2 mL de 1-butanol e 0,2 mL de solução de molibdato (contendo 5 g de molibdato de amónio e 22 mL de H_2SO_4 concentrado, em 100 mL). Depois de agitada num vortex durante 15 segundos, a solução foi

neutralizada com a adição de 0,5 mL de solução de citrato de sódio (200 $g.L^{-1}$, pH 7,0) e novamente agitada durante 15 segundos. A solução foi então centrifugada durante 3 minutos a 2000.*g* para separar a fase butanólica que continha a enzima e cuja absorvância foi lida a 400 nm. As soluções padrão de ortofosfato (0,1 a 2,0 µmoles/mL) foram preparadas e tratadas da mesma forma que as amostras.

A actividade da V-ATPase foi calculada como sendo a fracção da actividade ATPásica total sensível ao inibidor específico (Bafilomicina A_1 ou Concanamicina A) expressa em µmol Pi/mg proteína/hora.

Efeito do pH na actividade da V-ATPase

Para estudar o efeito do pH na actividade da V-ATPase, o pH da *Solução de Incubação* foi ajustado a um valor desejado, usando tampões adequados. Foram usados os seguintes tampões: MES (50 mM) (pH 6), HEPES (50 mM) (pHs 7 a 8) e Tris base (50 mM) (pH 9,3). O pH da solução foi ajustado com HCl 1 mM ou NaOH 1 M.

Estimulação com Succinato

O EEM foi isolado como descrito anteriormente. Para cada animal o EEM de uma das valvas foi deixado durante 20 minutos numa solução controlo arejada contendo (em mM): Na^+ 19; K^+ 7; Cl^- 17; HCO_3^- 10; Mg^{2+} 0,5; Ca^{2+} 1; SO_4^{2-} 1; pH 7,4. O EEM da outra valva foi deixado também o mesmo período de tempo numa solução de activação arejada contendo (em mM): Na^+ 19; K^+ 7; Cl^- 17; Succinato 10; Mg^{2+} 0,5; Ca^{2+} 1; SO_4^{2-} 1; pH 4,0.

No final deste período, cada amostra foi ou não mantida em solução controlo arejada, durante 30 minutos, após o que foi homogeneizada para determinação da actividade ATPásica.

Determinação do conteúdo em proteínas totais.

O conteúdo em proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (ABS) como padrão.

Experiências de voltagem controlada

Nas experiências de voltagem controlada utilizaram-se os dois epitélios externos do manto de cada animal.

O EEM foi cuidadosamente dissecado (cerca de 4 cm^2) e montado em câmaras de Ussing com 2 cm de diâmetro (área 3,14 cm^2), separando assim dois compartimentos distintos. Cada um dos compartimentos comunicava com um eléctrodo de calomelanos e um eléctrodo de prata. A continuidade eléctrica entre os dois lados da preparação e os eléctrodos era estabelecida através de pontes de agar. Estas pontes eram constituídas por tubos de polietileno cheios com Agar (*Merck*) 3% (p/v) em *Solução Controlo* com a seguinte composição (em mM): Na^+ 19; K^+ 7; Cl^- 17; HCO_3^- 10; Mg^{2+} 0,5; Ca^{2+} 1; SO_4^{2-} 1.

As pontes de agar e os eléctrodos mergulhavam em recipientes próprios, contendo uma solução saturada de cloreto de potássio. Cada hemi-câmara de Ussing possuía ainda uma chaminé para adição de soluções e arejamento da preparação com carbogénio (5% CO_2 + 95% O_2) e uma saída para a drenagem das soluções.

Depois de montada a preparação, a saída de uma das hemi-câmaras foi bloqueada com o auxílio de uma pinça hemostática. Esse lado foi então cheio com *Solução Controlo* de modo a confirmar se a preparação estava perfurada, o que, a acontecer, permitiria a comunicação entre as duas hemi-câmaras. Seguidamente, enchendo e esvaziando cada lado da câmara, lavou-se várias vezes a preparação com *Solução Controlo.* Cada hemi-câmara foi então cheia com 3 mL de *Solução Controlo.* Ligou-se o arejamento e foram estabelecidas as ligações eléctricas. Com o auxílio de um multímetro, mediu-se o potencial em circuito aberto (Voc).

A preparação foi curto-circuitada durante todo o tempo da experiência, utilizando um aparelho de controlo de voltagem de fabrico próprio. A corrente de curto-circuito foi registada num registador potenciométrico (Goerz, Servogor 400). A condutância da preparação foi medida aplicando pulsos de voltagem transepiteliais de 10 mV durante 15 segundos, de minuto a minuto e registando os pulsos de corrente correspondentes. Os dados foram adquiridos em contínuo usando um sistema de aquisição de dados (WorkBench PC) e guardados no respectivo formato.

Após estabilização da corrente gerada pela preparação durante pelo menos 30 minutos, a Bafilomicina A_1 e a Concanamicina A foram adicionadas ao lado apical da preparação.

Resultados

Efeito da Bafilomicina A_1 e da Concanamicina A na Ccc do EEM: Curva dose-efeito.

Foi descrito por Rebelo da Costa et col. (1999b) que a Bafilomicina A_1 e a Concanamicina A, quando postas em contacto com a membrana apical do EEM, i.e. a membrana virada para a concha, inibem a Ccc gerada por este epitélio.

Com o intuito de escolher um destes inibidores e a concentração que permite observar uma inibição máxima desta enzima, foi elaborado um protocolo que permitiu construir uma curva dose-efeito para cada um dos inibidores (Figuras 30 e 31, respectivamente).

Neste conjunto de experiências, o EEM montado em câmaras de Ussing e banhado dos dois lados com *Solução Controlo*, gerou uma diferença de potencial espontânea de 20 ± 15 mV e, quando circuitado, uma corrente (Ccc) positiva em direcção à concha de 20 ± 7 $\mu A/cm^2$ e uma condutância de 1,1 ± 0,4 mS/cm^2 .

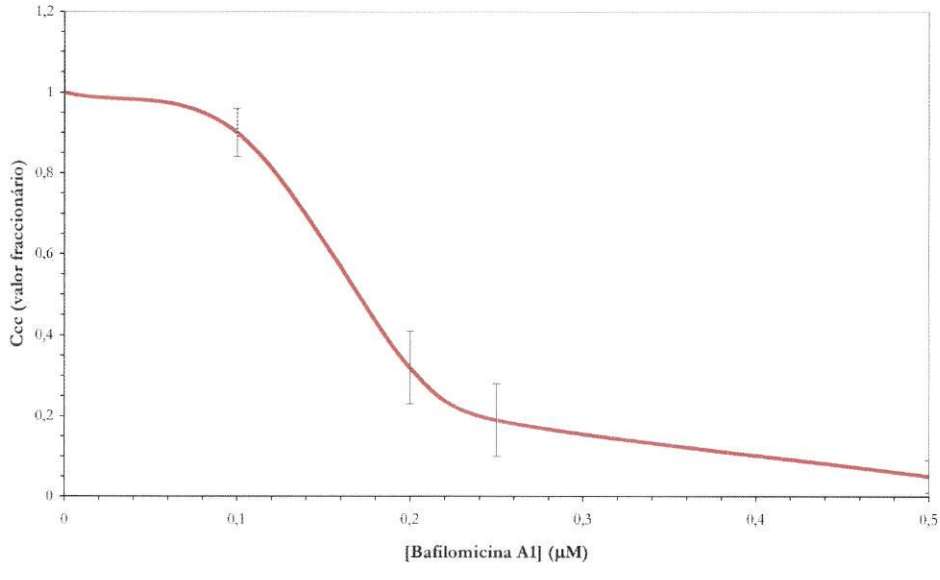


Figura 30. Curva dose-efeito da Bafilomicina A_1 na Ccc. Para cada preparação, os valores absolutos de Ccc foram convertidos nas razões ($Ccc_{(valor\ fraccionário)}$) entre o valor observado no final da experiência e o valor observado antes da adição do inibidor.

Os resultados mostram o efeito de doses crescentes de Bafilomicina A_1 (Figura 30) e de Concanamicina A (Figura 31) na Ccc do EEM. Uma vez que estes inibidores só actuam do lado da concha este efeito foi estudado apenas desse lado.

Para obter 50% de inibição foi necessário utilizar uma concentração de Bafilomicina A_1 de 0,17 μM e de Concanamicina A de 0,7 μM. Apesar de ser necessária uma dose inferior de Bafilomicina A_1 do que de Concanamicina A para obter o mesmo efeito, decidiu-se usar Concanamicina A por motivos económicos.

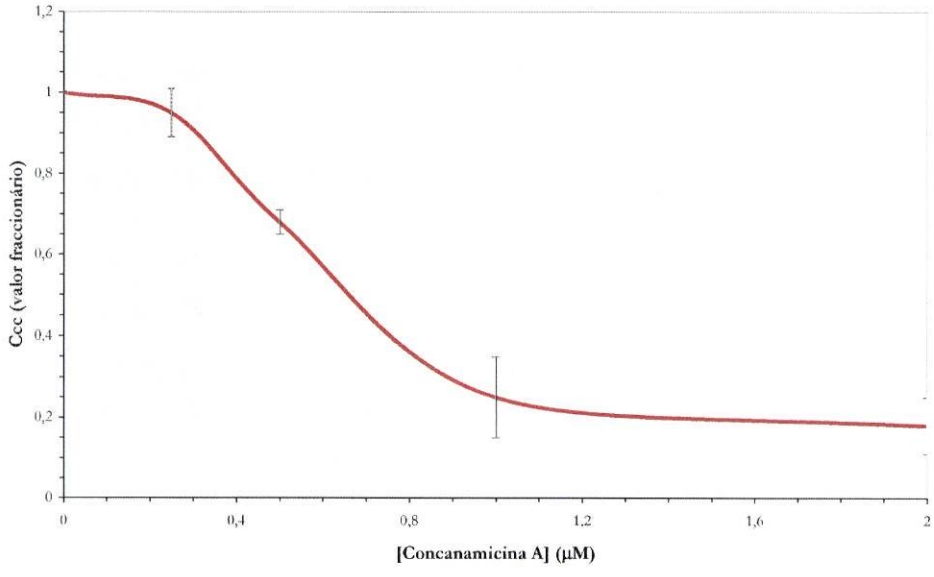


Figura 31. Curva dose-efeito da Concanamicina A na Ccc. Para cada preparação os valores absolutos de Ccc foram convertidos nas razões ($Ccc_{(valor\ fraccionário)}$) entre o valor observado no final da experiência e o valor observado antes da adição do inibidor.

Caracterização da actividade da V-ATPase

Resultados preliminares mostraram que a actividade da V-ATPase era muito baixa. Com o intuito de aumentar a actividade utilizámos os seguintes métodos: estimulação com succinato de sódio (Machado e col., 1988b) e estimulação com sulfito de sódio (Dschida e Bowman, 1995).

Estimulação com succinato

A pré-incubação do EEM, durante 20 minutos, numa solução contendo succinato de sódio 10 mM (pH 4) não originou um aumento da actividade da V-ATPase (Figura 32). Por seu lado, a pré-incubação durante 30 minutos levou a um aumento (1,3 vezes) da actividade relativa da V-ATPase.

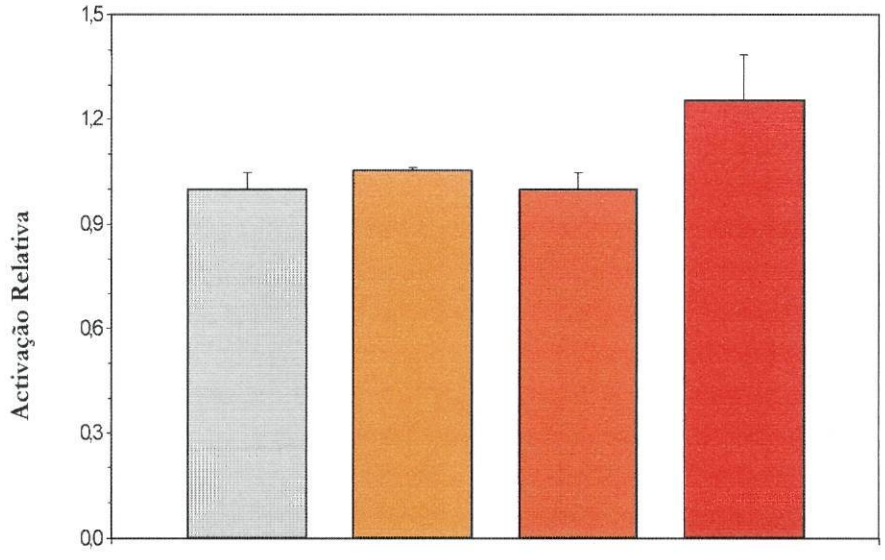


Figura 32. Efeito da pré-incubação com succinato de sódio na actividade da V-ATPase. Um dos dois EEM do mesmo animal foi mantido durante 20 minutos em Solução Controlo arejada (■ e ■); o outro EEM do mesmo animal foi mantido durante 20 minutos numa solução arejada contendo 10 mM de succinato de sódio, pH 4,0 (■ e ■). No fim desta incubação, os epitélios foram (■ e ■) ou não (■ e ■) mantidos por mais 30 minutos em solução controlo arejada. As amostras de homogenato foram incubadas com ou sem Concanamicina A 10 µM. Os resultados (±EPM) estão apresentados como a razão entre a actividade ATPásica inibida na presença de Concanamicina A para cada situação e a actividade ATPásica inibida na presença de Concanamicina A para cada situação controlo(■). V-ATPase Act_{max}= 5,0±1,1 µmol Pi/mg proteína/hora (n=3).

Estimulação com ião sulfito

O ião sulfito, bem como outros agentes anti-oxidantes, previnem a perda de actividade das V-ATPases (Dschida e Bowman, 1995). Nas nossas experiências utilizámos uma gama de concentração de ião sulfito, cujo efeito pronunciado na actividade da enzima pode ser observado na Figura 33. Nas nossas condições experimentais, a concentração óptima de sulfito de sódio foi de 200 mM. Com esta concentração, a actividade da V-ATPase aumentou cerca de 20 vezes.

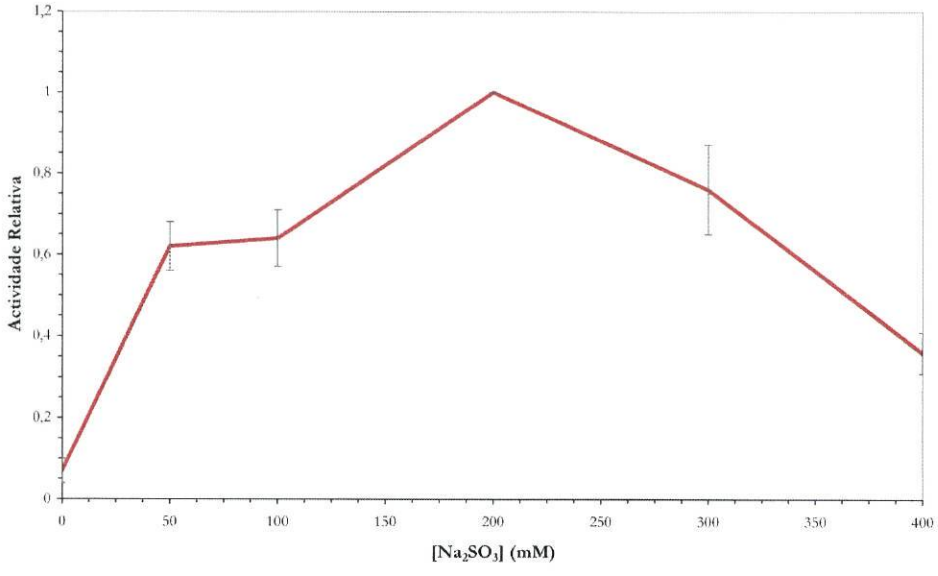


Figura 33. Efeito da incubação com sulfito de sódio na actividade da V-ATPase. As amostras de homogenato foram incubadas com ou sem Concanamicina A 10 μM. Os resultados (±EPM) estão apresentados como a razão entre a actividade ATPásica inibida na presença de Concanamicina A para cada situação e a actividade V-ATPásica máxima registada nestes ensaios. V-ATPase Act_{max}= 4,9±0,8 μmol Pi/mg proteína/hora (n=5).

Curva dose-efeito da Bafilomicina A_1 e Concanamicina A

Na Figura 34 estão representadas as curvas dose-efeito dos inibidores Bafilomicina A_1 e da Concanamicina A na actividade da V-ATPase. Para ambos os inibidores a inibição máxima foi obtida com a concentração de 10 μM. Para obter 50% de inibição máxima foram necessárias 14 $nmol.mg^{-1}$proteína de Bafilomicina A_1 ou 8 $nmol.mg^{-1}$proteína de Concanamicina A.

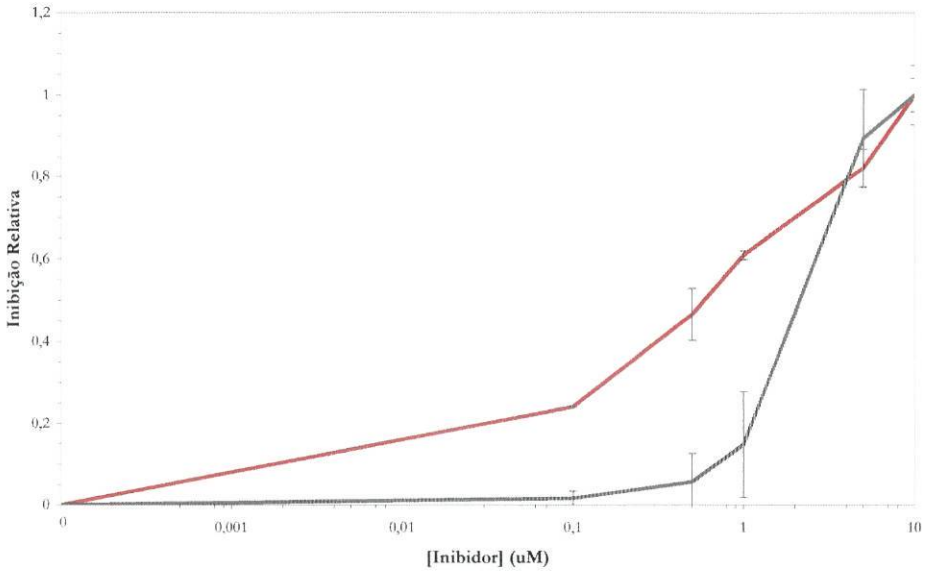


Figura 34. Curva dose-efeito da Bafilomicina A_1 (▬) e Concanamicina A (▬) na actividade da V-ATPase. As amostras de homogenato foram incubadas com diferentes concentrações de inibidor. Os resultados são apresentados como a razão entre a actividade V-ATPásica inibida para cada situação e a actividade V-ATPásica máxima registada nestes ensaios. Considerou-se que para ambos os inibidores a actividade máxima foi obtida para a concentração de 10 μM. V-ATPase Act_{max} (Concanamicina A)= 4,4±1,0 μmol Pi/mg proteína/hora (n=5); V-ATPase Act_{max} (Bafilomicina A_1)= 5,0±1,1 μmol Pi/mg proteína/hora (n=3).

Efeito da temperatura, do ATP e do pH

O efeito da temperatura na actividade da V-ATPase foi estudado para uma gama de temperatura entre 10 e 37 °C. O valor mais alto de actividade foi observado a 27°C (Figura 35 A). Para temperaturas superiores a 40°C, a actividade da V-ATPase não foi mensurável (resultados não apresentados).

O efeito da concentração de ATP na actividade da V-ATPase foi também estudado. Como se pode observar na Figura 35 B, a actividade máxima foi obtida para concentrações de ATP entre 4,5-6,0 μM. Concentrações superiores de ATP originaram inibição da actividade.

O efeito do pH na actividade da V-ATPase foi ensaiado para valores de pH entre 6,0 e 9,3, usando soluções HEPES/Tris/MES. Na Figura 35 C pode ver-se que a hidrólise de ATP é mais rápida no intervalo de pH 7,0-7,3, diminuindo para valores mais altos de pH.

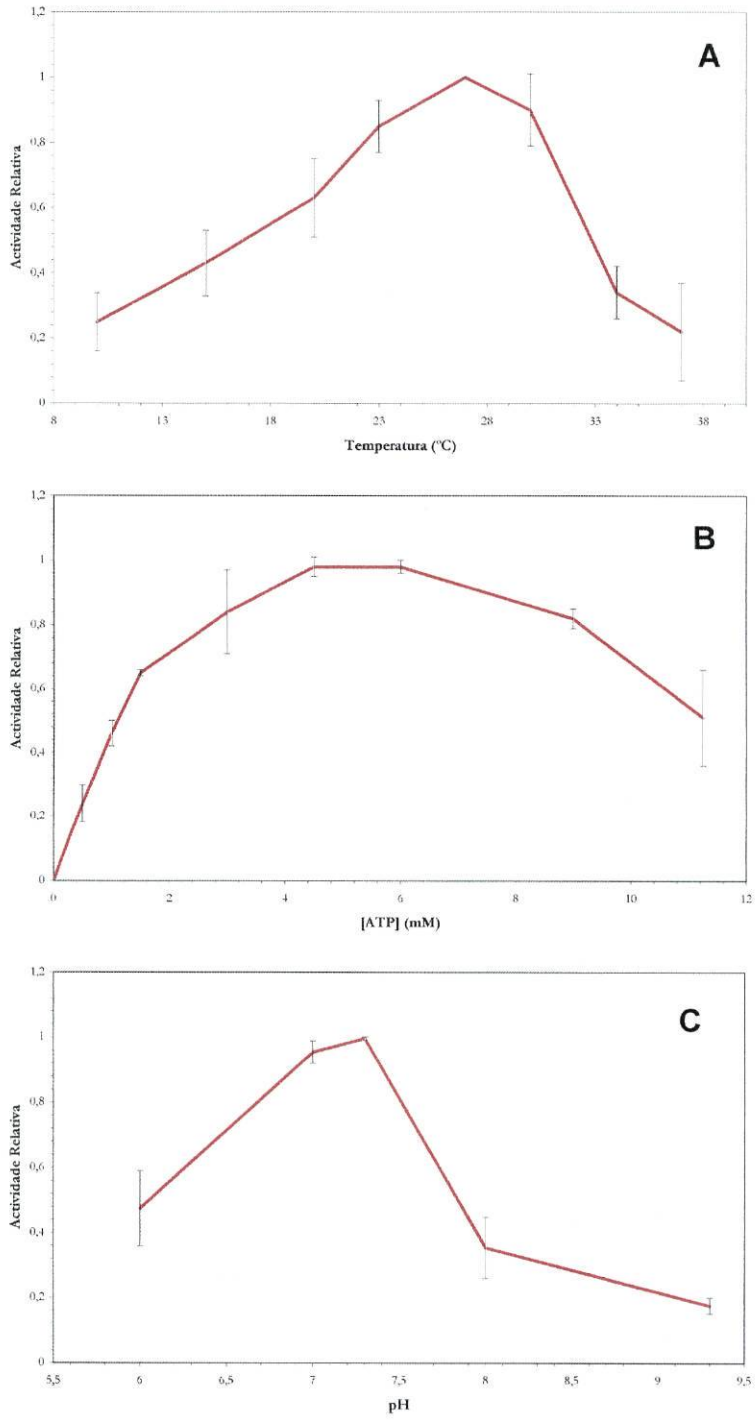


Figura 35. Efeito da temperatura (A), concentração de ATP (B) e pH (C) na actividade da V-ATPase. As amostras de homogenato foram incubadas com ou sem Concanamicina A 10 µM. Os resultados (±EPM) estão apresentados como a razão entre a actividade ATPásica inibida na presença de Concanamicina A para cada situação e a actividade V-ATPásica máxima registada nestes ensaios. V-ATPase Actmax(A)= 4,7±1,2 µmol Pi/mg proteína/hora (n=5); V-ATPase Actmax(B)= 4,5±1,0 µmol Pi/mg proteína/hora (n=5); V-ATPase Actmax(C)= 4,2±1,1 µmol Pi/mg proteína/hora (n=5).

Efeito de inibidores específicos e não-específicos

O ião nitrato está descrito como inibidor específico das ATPases tipo V (Dschida & Bowman, 1995; Bowman et col. 1989), apesar do seu mecanismo de acção não ser claramente conhecido. Os resultados obtidos (Figura 36), mostram uma diminuição linear na actividade ATPásica com o aumento da concentração de nitrato entre 0-500 mM.

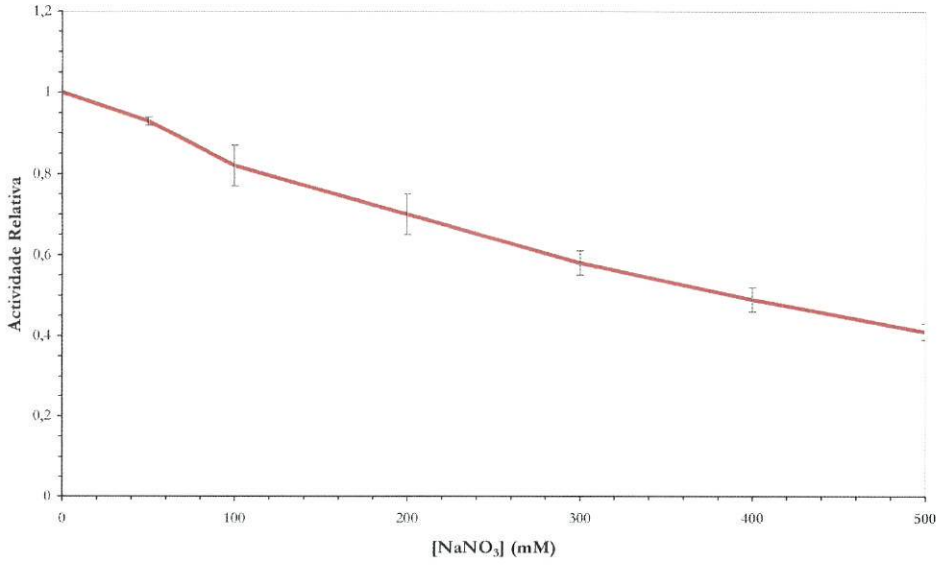


Figura 36. Efeito do nitrato de sódio na actividade ATPásica. As amostras de homogenato foram incubadas sem a presença de sulfito de sódio. Os resultados (±EPM) estão apresentados como a razão entre a actividade ATPásica inibida na presença de nitrato de sódio para cada situação e a actividade ATPásica máxima registada nestes ensaios. ATPase Act_{max}= 9,9±1,1 μmol Pi/mg proteína/hora (n=5).

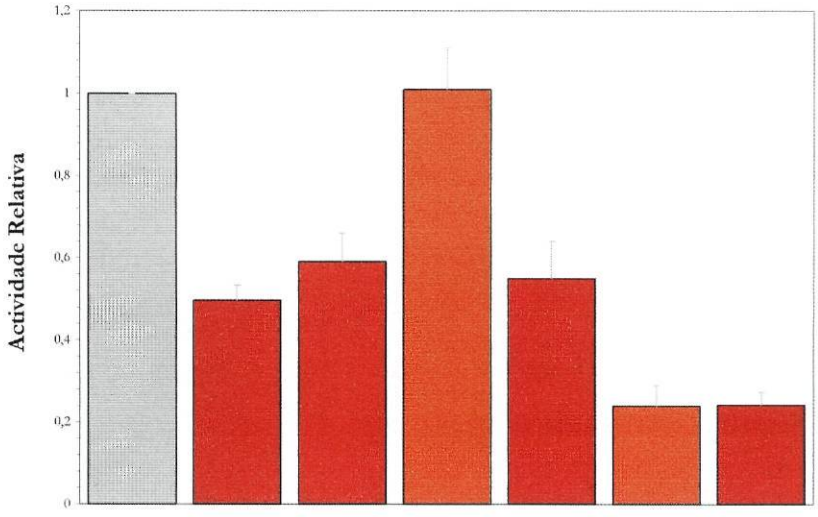
Na Figura 37 é apresentado o efeito de outros inibidores na actividade da V-ATPase.

A Bafilomicina A1 (10 μM) e a Concanamicina A (10 μM) tiveram quase o mesmo efeito na actividade da V-ATPase, inibindo respectivamente 50 e 40% da actividade total.

O NEM (100 μM) não provocou efeito na actividade da V-ATPase. Foram ainda ensaiadas concentrações superiores do inibidor (500 e 1000 μM) que também não inibiram a actividade da V-ATPase (resultados não apresentados).

O DCCD (100 μM) provocou uma inibição da actividade da ATPase total de 80%, na presença e na ausência Concanamicina A. A fracção de actividade inibida pelo DCCD é

significativamente mais elevada do que a inibida na presença dos inibidores específicos de V-ATPases.



Bafilomicina 10 μM	−	+	−	−	−	−	−
Concanamicina 10 μM	−	−	+	−	+	−	+
NEM 100 μM	−	−	−	+	+	−	−
DCCD 100 μM	−	−	−	−	−	+	+

Figura 37. Efeito de diferentes inibidores (Concanamicina A 10 μM, Bafilomicina A_1 10 μM, DCCD 100 μM e NEM 100 μM) na actividade ATPásica. As amostras de homogenato foram incubadas com (+) ou sem inibidores (-). Os resultados (±EPM) estão apresentados como a razão entre a actividade ATPásica registada na presença dos inibidores para cada situação e a actividade ATPásica na situação controlo (■) Act_{max}= 9,5±8,0 μmol Pi/mg proteína/hora (n=6).

Discussão

A presença de uma bomba de protões electrogénica na membrana apical do EEM, foi pela primeira vez sugerida por Coimbra et col. (1988), embora nenhuma evidência directa fosse então apresentada. Em 1999, Rebelo da Costa e col. estudaram o efeito da Bafilomicina A_1 e da Concanamicina A na Ccc deste epitélio. Estes inibidores específicos das V-ATPases induziram a inibição completa e irreversível da Ccc, apenas quando adicionados do lado apical (concha), facto que está de acordo com a presença de uma V-ATPase na barreira apical. A Ccc reflecte a operação de uma bomba de protões: é devida ao transporte de H^+ no sentido da concha e numericamente equivalente ao transporte de bicarbonato no sentido da hemolinfa (Machado e col., 1990).

Uma primeira tentativa de medir a actividade da V-ATPase no homogenato não foi bem sucedida, uma vez que era inferior ao limite de detecção da técnica utilizada. Por esse motivo, procurou-se estimular a actividade da enzima, quer incubando o homogenato com succinato de sódio, quer com sulfito de sódio.

A estimulação da Ccc com succinato de sódio foi descrita por Machado e col. em 1988. Estes autores demonstraram que a pré-incubação do EEM de *Anodonta cygnea*, numa solução a pH 4 contendo este composto, induzia a estimulação da Ccc até cerca de 10 vezes o valor inicial. Hudson (1993) verificou o mesmo efeito em *Unio complanatus*. Em concordância com estes resultados, a actividade da V-ATPase presente no homogeneizado do EEM, apresenta um aumento de 1,3 vezes quando previamente incubado com succinato de sódio.

O segundo método (estimulação com sulfito de sódio) foi utilizado tendo em conta a interacção do ião sulfito com resíduos de cisteína presentes no domínio V_1 da enzima. Esta interacção, prevenindo a formação de pontes dissulfureto entre unidades desse domínio, que poderia levar à inactivação da V-ATPase (Dschida e Bowman, 1995). Com a adição de sulfito de sódio (200 mM) ao meio de incubação foi possível observar um aumento de cerca de 20 vezes na actividade da enzima. Este efeito permite-nos supor que as V-ATPases presentes no homogenato se encontram num estado inactivo, provavelmente por formação de uma ponte dissulfureto entre os resíduos de cisteína do domínio V_1, sendo este efeito revertido devido ao forte poder redutor do ião sulfito. Este método foi utilizado neste trabalho, dado a sua simplicidade e eficácia na estimulação.

Com o intuito de decidir qual o inibidor específico que deveríamos utilizar para caracterizar esta V-ATPase, testámos o efeito de uma gama de concentrações de Bafilomicina A_1 e de Concanamicina A, na Ccc. Apesar da dose necessária para produzir o efeito semi-máximo (IC_{50}) da Bafilomicina A_1 ser ligeiramente inferior, optámos, por motivos económicos, pela Concanamicina A. Relativamente à Bafilomicina A_1, a dose encontrada para inibir eficazmente a V-ATPase é da ordem dos micromolar. Uma dose semelhante a esta foi utilizada por Klein e col. (Klein e col., 1997), para inibir a V-ATPase na pele da rã. Esta dose, no entanto, é superior à utilizada para o mesmo efeito por Hudson (1993) em *Unio complanatus*. Está descrito que para concentrações da ordem micromolar, este composto pode inibir simultaneamente P-ATPases e V-ATPases (Drose e Altendorf, 1997). Tendo em conta que uma P-ATPase (Na^+/K^+-ATPase) está presente na membrana basolateral do EEM (Rebelo da Costa e col., 1999a), estudou-se o efeito da Bafilomicina A_1 (10 μM) na Ccc do EEM, do lado da hemolinfa (basolateral) durante duas horas e não se verificou qualquer inibição da Ccc. O tempo escolhido é o necessário para inibir a Ccc com ubaína (1 mM) (Rebelo da Costa e col., 1999a).

Os valores de IC_{50} da Bafilomicina A_1 e Concanamicina A, descritos para uma grande variedade de células, em que se mediu a actividade da V-ATPase, situam-se entre 0,043 e 20 nmol.mg. proteína^{-1} (Drose e Altendorf, 1997). No presente trabalho, a IC_{50} para a Bafilomicina A (14 nmol.mg.proteína^{-1}) e para a Concanamicina A (8 nmol.mg.proteína^{-1}) encontram-se dentro do intervalo referido.

Neste trabalho, estudou-se ainda o efeito do ião nitrato, NEM, DCCD, Bafilomicina A1 e Concanamicina A, na actividade da V-ATPase.

O ião nitrato parece não provocar uma inibição específica da actividade V-ATPásica do homogenato. Na concentração de 100 mM (Dschida e Bowman, 1995), inibe apenas 17% da actividade ATPásica total do homogenato. A não inclusão de ião sulfito no meio de incubação nas experiências em que se estudou o efeito do ião nitrato pode estar na origem da baixa percentagem de inibição, uma vez que a actividade V-ATPásica medida sem a presença do ião sulfito era extremamente baixa. A utilização conjunta dos dois compostos não seria adequada nestas experiências uma vez que os dois iões partilham o mesmo mecanismo de acção, embora com efeitos antagónicos. O ião nitrato é um composto oxidante que actua favorecendo a formação da ponte dissulfureto no domínio V_1. A inibição verificada para doses elevadas de ião nitrato poderá dever-se a um efeito deste ião sobre outras enzimas celulares envolvidas na hidrólise do ATP e não sobre a V-ATPase.

Quer o DCCD (100 μM) quer o NEM (100 μM) inibem substancialmente a Ccc do EEM (Rebelo da Costa e col., 1999b). No presente trabalho a actividade da V-ATPase só foi inibida pelo DCCD (80%). Este composto parece no entanto inibir a actividade ATPásica de uma forma não-específica, visto que inibe uma fracção da ATPase total bastante mais elevada do que a inibida com os inibidores específicos das V-ATPases. Segundo vários autores o DCCD inibe todos os tipos de ATPases membranares (Arai e col., 1987; Pedersen e Carafoli, 1987). Neste trabalho, este facto não deve ser tido em conta para a não-especificidade observada, uma vez que rotineiramente se adicionou ao meio de incubação inibidores específicos das P e F-ATPases (azida e ortovanadato de sódio).

A razão do NEM não ter aparentemente inibido a actividade da V-ATPase, pode dever-se à presença de sulfito de sódio na solução de incubação. Feng (1994) descreveu que a cisteína e o NEM se ligam a resíduos de cisteína presentes numa subunidade do domínio V_1, e que, pela adição de DTT (agente oxidante), a inibição da cisteína pode ser revertida, pela manutenção do resíduo de cisteína reduzido. O mesmo mecanismo pode ser partilhado pelo ião sulfito, e portanto, prevenir a inibição da enzima pelo NEM.

Neste trabalho foram ainda estudados os inibidores específicos das V-ATPases, Bafilomicina A_1 (10 μM) e Concanamicina A (10 μM). Ambos os compostos tiveram um efeito muito semelhante na inibição da actividade da V-ATPase, inibindo entre 40 a 50% da actividade ATPásica total.

Em conclusão a actividade da V-ATPase do EEM foi máxima a um pH situado entre 7 e 7,3, à temperatura de 27°C e na presença de 4,5-6 mM de ATP. Com estes parâmetros optimizados, a actividade da V-ATPase do homogeneizado do EEM é de 4,6±1,1 μmolPi/mg proteína/hora (n=26).

6. Modelo Matemático

Introdução

O desenho de modelos matemáticos de sistemas biológicos compreende várias fases.

A primeira é a identificação dos componentes do modelo, que são de vários tipos:

1. ***variáveis*** - são quantidades que exprimem o funcionamento do sistema. Podem ser manipuláveis externamente (caso das concentrações iónicas), também chamadas variáveis extrínsecas, ou produzidas pelo modelo (caso da corrente de curto-circuito), chamadas de variáveis intrínsecas. Neste último caso, o seu valor instantâneo é determinado pelo estado funcional do sistema.

2. ***sistemas*** - (transportadores, enzimas, canais) que produzem ou controlam o movimento de substâncias entre compartimentos.

3. ***os processos*** - são as descrições cinéticas da síntese ou dos movimentos de substâncias entre compartimentos[1].

A escolha dos componentes deve obedecer a um princípio de economia. É necessário especificar previamente os objectivos das simulações a fim de definir quais as variáveis intrínsecas que o modelo deve calcular. No caso presente, pretende-se calcular os fluxos iónicos através das barreiras do EEM, assim como as concentrações iónicas no compartimento intracelular e o volume deste compartimento.

A segunda fase é a escolha do tipo geral de sistema a simular. Na prática consideram-se dois grandes grupos de sistemas:

1. ***de parâmetros concentrados*** - neste caso, considera-se que os componentes se distribuem descontinuamente por compartimentos (compartimentos extra e intracelular, no caso presente), geralmente em número reduzido. Considera-se que, em cada compartimento (por exemplo, o espaço extracelular), cada variável tem um valor instantâneo único em todo o compartimento – compartimento homogéneo.

2. **de parâmetros distribuídos** - quando o valor instantâneo das variáveis varia continuamente no espaço, dentro de um mesmo compartimento. O túbulo renal é um exemplo. Em estado estacionário, a concentração de sódio na urina tubular varia ao longo do túbulo.

---

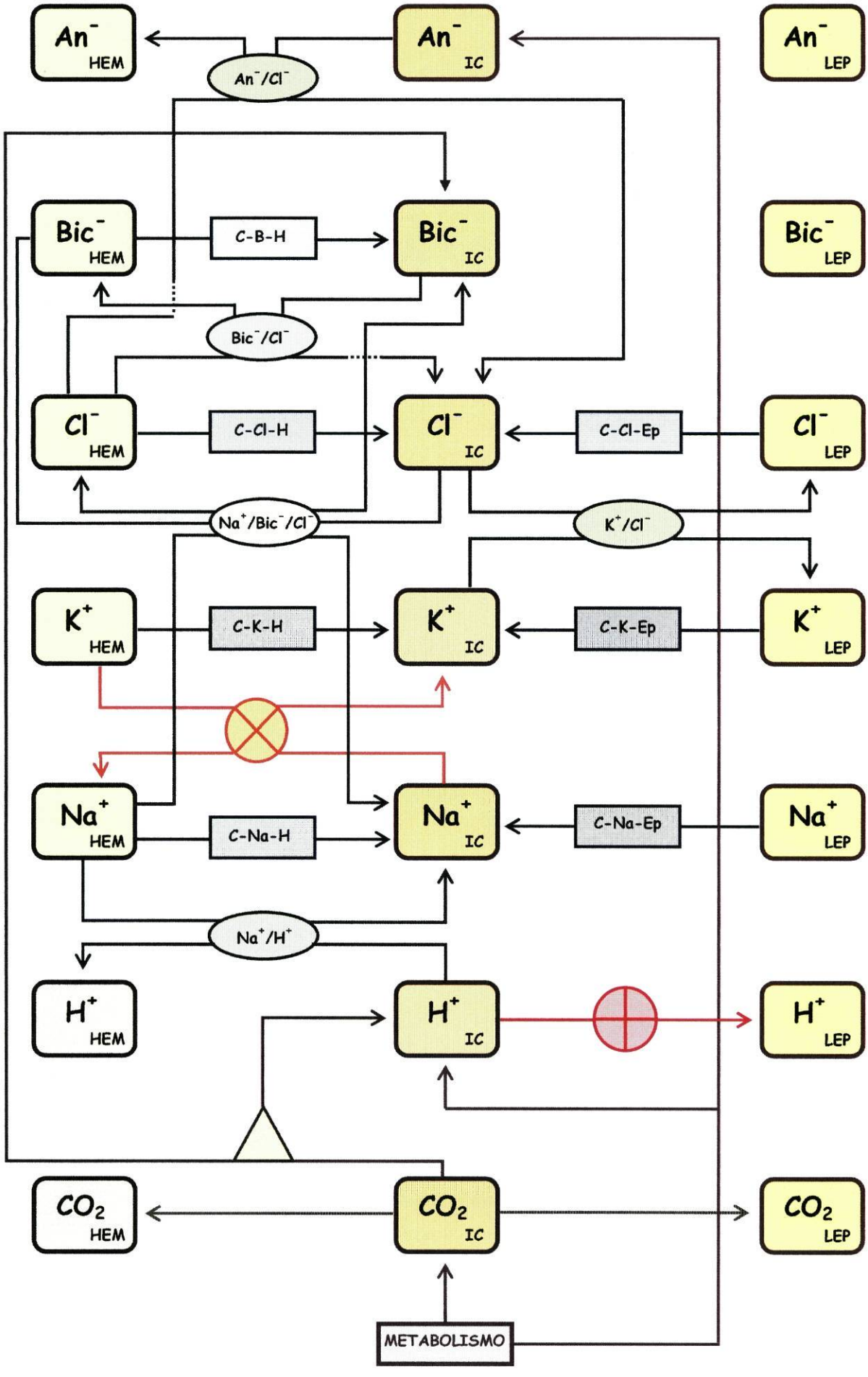
[1] As *descrições cinéticas* são relações matemáticas que incluem três tipos de elementos variáveis: *I*- variáveis (descritas acima); *II*- operadores do cálculo (+, -, :, x, etc.); *III*- parâmetros (grandezas constantes das relações matemáticas). Numa relação linear do tipo $Y = a + b \cdot X$, X e Y são variáveis, + e . são operadores e a e b são parâmetros.

A Figura 38 descreve o modelo aqui idealizado. No modelo existem 21 "quantidades" que representam a quantidade total de ião cloro, bicarbonato, sódio, potássio, hidrogenião, ácidos não voláteis ionizados e anidrido carbónico nos 3 compartimentos considerados: Hemolinfa (HEM), Citosol (IC) e Líquido Extrapaleal (LEP). Estão ainda representados os sistema de transporte membranares, assim como os fluxos iónicos associados a cada um desses transportadores. A direcção das setas representa o sentido do transporte de cada ião, associado a um determinado transportador membranar, quando o fluxo desse transportador é positivo. As "quantidades" são representadas sem dimensões.

A terceira fase do modelo é a escolha do tipo geral de simulações, conforme se pretendem simular situações estacionárias ou situações dinâmicas (transitórios). Até muito recentemente, a maioria esmagadora dos modelos era do primeiro tipo, simulações que são indistinguíveis do simples assentamento de curvas, a menos que resultem da formulação de relações que exprimam processos moleculares fundamentais.

O modelo aqui apresentado foi resolvido utilizando o "software" de aplicação Berkeley Madonna (www.berkeleymadonna.com), generosamente cedido pelo Prof. Robert Macey.

Figura 38. Diagrama de Blocos do Modelo. Linhas: (▬) fluxos através de translocadores membranares; (▬) fluxos através de canais membranares; (▬) e (▬) fluxos através de bombas membranares; (▬) fluxos devido ao metabolismo celular; (▬) fluxos difusionais simples; (▬) fluxo resultantes da acção da Anidrase carbónica (Δ); Linhas a ponteado: intercessão de fluxos do mesmo tipo; Setas: direcção dos fluxos nas equações do modelo; Rectângulos arredondados: "quantidades"; Rectângulos: canais membranares; Ovais: translocadores membranares; círculos: bombas membranares (⊕ bomba de protões, ⊗ bomba de Na^+/K^+).


An⁻ HEM
An⁻ IC
An⁻ LEP
An⁻/Cl⁻
Bic⁻ HEM
C-B-H
Bic⁻ IC
Bic⁻ LEP
Bic⁻/Cl⁻
Cl⁻ HEM
C-Cl-H
Cl⁻ IC
C-Cl-Ep
Cl⁻ LEP
Na⁺/Bic⁻/Cl⁻
K⁺/Cl⁻
K⁺ HEM
C-K-H
K⁺ IC
C-K-Ep
K⁺ LEP
Na⁺ HEM
C-Na-H
Na⁺ IC
C-Na-Ep
Na⁺ LEP
Na⁺/H⁺
H⁺ HEM
H⁺ IC
H⁺ LEP
CO₂ HEM
CO₂ IC
CO₂ LEP
METABOLISMO

Descrição do Modelo

Geometria

O modelo consiste em dois compartimentos aquosos semi-infinitos e bem agitados (hemolinfa e compartimento extrapaleal) e um compartimento aquoso celular bem agitado. Considerou-se que este compartimento é equivalente a um sincício que engloba todas as células do epitélio e tem a geometria de uma fatia de citoplasma de 15 μm de espessura, separada da hemolinfa e do compartimento extrapaleal por barreiras impermeáveis onde há canais, transportadores e bombas que se descreverão abaixo.

Compartimentos extracelulares

Assumiu-se que os fluidos extracelulares (Líquido Extrapaleal e Hemolinfa) tinham uma composição idêntica e eram compostos apenas por iões sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio, protões, hidroxiliões, bicarbonato, anidrido carbónico e ácidos não voláteis ionizados (com valência -1). As concentrações destes iões estão descritas na Tabela 3.

			Valores	Unidades
$C_{Hemolinfa/LEP}$	CHid_Hem/Ep	a	3,9811 e^{-11}	$mol.cm^{-3}$
	COxid_ Hem/Ep	b	7,862 e^{-10}	$mol.cm^{-3}$
	CK_Hem/Ep		7,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CCa_Hem/Ep		1,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CMg_Hem/Ep		0,5 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CNa_Hem/Ep	c	18,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CCl_Hem/Ep		17,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CAnCarb_Hem/Ep		0,8913 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CBic_Hem/Ep		10,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CAcNv_Hem/Ep		1,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$

Tabela 3. Valores de concentração das espécies iónicas presentes nos fluidos extracelulares (hemolinfa, Hem; líquido extrapaleal, Ep)

[a] CHid_Hem/Ep= 10 e(-pH_Hem/Ep)

[b] COxid_ Hem/Ep = Kw/CHid_Hem

[c] CNa_Hem=CBic_Hem+CCl_Hem+CAcNv_Hem-CK_Hem-2.CCa_Hem-2.CMg_Hem

As bases fixas ionizadas resultam da produção metabólica de ácidos não voláteis, fosfórico, sulfúrico, e ácidos produzidos pelo metabolismo intermediário.

Compartimento intracelular

Assumiu-se que o fluido intracelular era composto apenas por iões sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio, bicarbonato, protões, hidroxiliões, ácidos não voláteis ionizados (com valência -1), anidrido carbónico e proteínas. As concentrações dos iões estão descritas na Tabela 4.

			Valores	Unidades
$C_{Intracelular}$	CHid_C0	c	1,585 e^{-10}	$mol.cm^{-3}$
	COxid_C0	a	1,975 e^{-10}	$mol.cm^{-3}$
	CK_C0		40,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CCa_C0		2,0 e^{-10}	$mol.cm^{-3}$
	CMg_C0		0,5 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CNa_C0		2,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CCl_C0		3,2 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CAnCarb_C0		0,897 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CBic_C0		2,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CAcNv_C0		1,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	CProt_eq0	b	2,83 e^{-5}	$mol.cm^{-3}$

Tabela 4. Valores de concentração das espécies iónicas presentes no fluido intracelular no estado estacionário

[a] COxid_C0 = KW/CHid_C0

[b] CProt_eq0=CNa_C0+CK_C0+ CHid_C0 - CBic_C0-CCl_C0- COxid_C0-CAcNv_C0

[c] CHid_C0= 10 e(-pH_C0)

Enquanto que as concentrações iónicas nos compartimentos extracelulares foram medidas directamente, as concentrações intracelulares resultaram de uma análise prévia das condições que tornavam viável uma situação estacionária, satisfazendo um certo número de dados experimentais.

Se admitirmos que:

1. o potencial intracelular é de cerca de 40 mV, citoplasma negativo, e é determinado, como acontece em geral para as células animais, pela soma ponderada dos potenciais de difusão dos iões presentes em maior concentração, para os quais as membranas são permeáveis;
2. as concentrações nos compartimentos externos são as da tabela;

então, para um potencial de membrana de 40 mV, os cocientes dos iões dominantes, *CK_C/CK_Ep(Hem)* e *CCl_C/CCl_Ep(Hem)*, terão de ser maiores que

$$exp[z.F.V/(RT)] \cong 4,8.$$

Escolheram-se concentrações intracelulares de 40 e 3,2 mM para K^+ e Cl^-, respectivamente. Esta escolha foi determinada em simulações do estado estacionário que satisfizeram, por um lado, o potencial de membrana e, por outro, a condição de todos os parâmetros do modelo (permeabilidades, afinidades, taxas máximas, etc.) serem positivos.

A contribuição do Na^+ para o potencial de membrana parece ser pequena. É de esperar que, como consequência da operação da bomba de sódio, contribua para o potencial de membrana com um potencial de Nernst positivo.

A concentração intracelular de bicarbonato é determinada, por um lado, pelo balanço entre a produção de anidrido carbónico e a sua difusão para o exterior da célula e, por outro, pela velocidade a que é hidratado pela anidrase carbónica. Dada a permeabilidade elevadíssima das membranas biológicas a anidrido carbónico, não é de prever que exista um gradiente apreciável das concentrações deste gás entre os compartimentos intracelular e extracelulares. A concentração de anidrido carbónico intracelular usada no estado de referência foi cerca de 1% mais elevada que a concentração externa. Para um pH externo de 7,4 e uma concentração de bicarbonato de 10 mM, a concentração extracelular de CO_2 é cerca de 0,9 mM. A concentração intracelular de CO_2 e o pH intracelular de 6,8 permitem estimar uma concentração intracelular de equilíbrio de bicarbonato de 2,5 mM. Para manter uma produção contínua de bicarbonato admitiu-se que a sua concentração estava abaixo do seu valor de equilíbrio (2 mM). A menos que se encarem valores muito diferentes destes, a sua escolha não afectará grandemente o comportamento do modelo.

A quantidade total de proteínas na célula foi considerada fixa e é dada pela princípio da isotonicidade dos fluidos ($Cosm_{intracelular} = Cosm_{extracelular}$). Por isso,

Cprot_mol=Cosm0- CNa_C0 -CK_C0 - CHid_C0 - CBic_C0-CCl_C0- COxid_C0-CAcNv_C0.

A quantidade de proteínas ionizadas na célula, no estado estacionário, é dada pela equação de electroneutralidade,

$$CProt_eq0 = CNa_C0 + CK_C0 + CHid_C0 - CBic_C0 - CCl_C0 - COxid_C0 - CAcNv_C0.$$

Admitimos que a ionização das proteínas intracelulares em função do pH tinha um comportamento idêntico ao descrito por Van Slyke e col. (1928) para as proteínas plasmáticas, ou seja, da forma

$$Pr^- = A \cdot (pH - pK_{Pr})$$

em que o pK_{Pr} tem um valor aproximado de 6,75. Para evitar descontinuidades para valores altos e baixos de pH utilizou-se a função:

$$fpH = B.\{1 + Tanh[c \cdot (pH - pK_{Pr})]\}$$

que foi ajustada de modo que, para pHs em torno de pK_{Pr}, se sobrepunha à função Pr^-, acima descrita. Para valores de pH em torno de pK_{Pr}:

$$fpH \cong B.[1 + c \cdot (pH - pK_{Pr})]$$

uma expressão linear facilmente transformável na expressão de Van Slyke e col. (1928).

Os valores escolhidos das concentrações intracelulares de bases fixas foram arbitrariamente de 1 mM. A utilização do modelo se encarregará de fornecer ajustamentos para os valores escolhidos.

Sistemas de transporte

Enquanto não dispusermos de sondas mais específicas para a identificação de sistemas de transporte teremos de recorrer a métodos mais grosseiros. No caso presente, utilizou-se a combinação de três critérios:

- a utilização de inibidores específicos do transporte como indicadores da presença de um transportador;
- a detecção de uma variação na corrente de curto-circuito como indicação de um efeito;
- o lado do epitélio em que o inibidor fez efeito como indicador da barreira onde o transportador está localizado.

Com estes três critérios, foram identificados os seguintes sistemas de transporte, que estão ilustrados na Figura 39.

Consideraram-se os seguintes sistemas de transporte:

1. *H^+-ATPase tipo V* (membrana apical) (Rebelo da Costa e col., 1999b)
2. *Bomba de Na^+-K^+* (membrana basolateral) (Rebelo da Costa e col., 1999a)
3. *Transportador Na^+-H^+* (membrana basolateral) (Coimbra e col., 1988)

4. *Transportador* $Na^+/ HCO_3^- - Cl^-$ (membrana basolateral) (Barrias, 2003)
5. *Transportador* $HCO_3^- - Cl^-$ (membrana basolateral) (Coimbra e col., 1988)
6. *Canais de* Cl^- (membranas apical e basolateral) (Barrias, 2003)
7. *Transportador* $K^+ - Cl^-$ (membrana apical) (Rebelo da Costa, 1994)

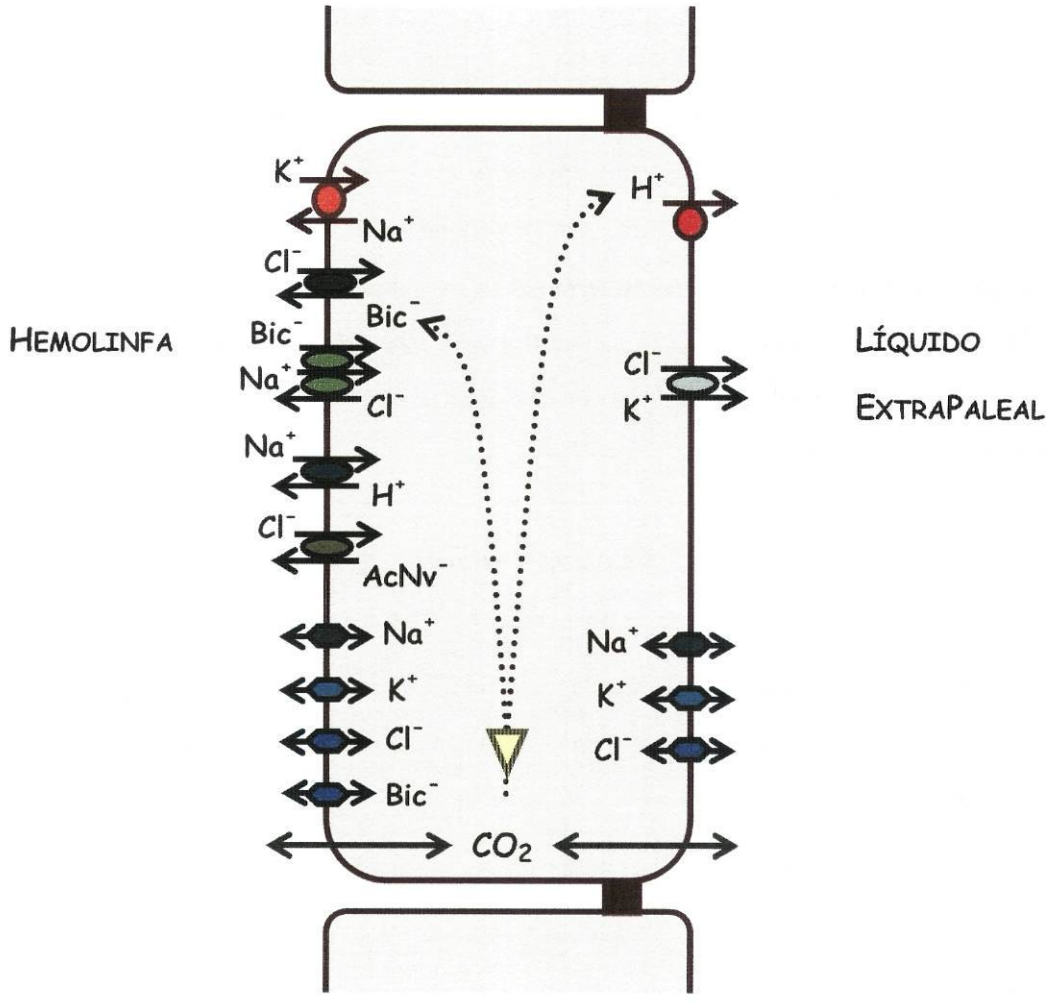


Figura 39. Representação esquemática dos sistemas de transporte membranares do EEM.

Dada a presença da bomba de Na^+/K^+ foi necessário postular a presença de:

8. *Canais de* Na^+ *e de* K^+ (membranas apical e basolateral).

É pouco plausível que a produção de protões resulte exclusivamente da hidratação de CO_2, pelo que se postulou uma produção de Ácidos Não voláteis e, consequentemente um:

9. *Transportador Ácidos Não voláteis-Cl^-* (membrana basolateral).

A introdução de:

10. *Canais de HCO_3^-* (membrana basolateral)

deveu-se à constatação de que o modelo era instável quando se inibia o trocador HCO_3^- -Cl^-.

Princípios de conservação

A resolução do modelo implica que se defina um conjunto de relações que permitam reduzir o número de graus de liberdade do sistema. O ponto de partida é a definição do estado estacionário, situação em que os compartimentos não variam, ou seja, em que em geral

$$d/dt\ (Qi) = 0$$

sendo Qi a "quantidade" do componente i.

Nessas condições, para cada "quantidade" e em estado estacionário:

$$\sum J_i = 0$$

ou seja, a soma total dos fluxos de um componente através das barreiras de um compartimento é nula (não há acumulação, nem deplecção). Haverá um sistema de seis equações simultâneas que só permitem definir seis parâmetros.

Recorremos a um conjunto de relações adicionais que permitem calcular os restantes parâmetros:

1. *Isotonicidade* - permitiu determinar a quantidade de proteínas osmoticamente activas no estado estacionário. Considerou-se que esta se mantinha constante em qualquer situação experimental. Assumiu-se igualmente que os movimentos de água através da membrana celular são suficientemente rápidos para que, havendo alterações da composição intracelular, se mantenha a isotonicidade, à custa de alterações do volume celular.

2. *Conservação de massa* - a taxa de acumulação de um dado componente num compartimento celular é dada, em qualquer instante, pela diferença entre o influxo através da membrana basolateral e o efluxo através da membrana apical. Este princípio

permitiu definir as taxas máximas de transporte no estado de referência, que se consideram constantes daí em diante.

3. *Electroneutralidade* - a carga total devida aos iões positivos é igual à devida aos iões negativos nos três compartimentos considerados. Este princípio permitiu definir os valores instantâneos do compartimento do cloro e os fluxos de carga através das duas barreiras a partir da corrente de curto-circuito.

Finalmente, postularam-se relações entre certos fluxos com base nas observações do efeito de inibidores.

Como a maioria das observações experimentais foram sempre feitas em condições de curto-circuito, os fluxos paracelulares foram sempre nulos, pelo que não são considerados no modelo.

Equações consideradas

a. Movimentos difusionais

Assumiu-se que os movimentos difusionais de Na^+, K^+ e Cl^- através das duas membranas obedecem à equação de Goldman-Hodgkin-Katz. Para cada ião:

$$Jdif = Pi.\frac{\frac{z.F.V}{R.T}}{\left[\exp\left(\frac{z.F.V}{R.T}\right)-1\right]}.\left[C_1.\exp\left(\frac{z.F.V}{R.T}\right)-C_2\right]$$

onde:

Jdif - fluxo difusional do ião *i* através da membrana

Pi – permeabilidade da membrana ao ião *i*

z - valência do ião (mol^{-1})

F - constante de Faraday (96500 coul)

V - diferença de potencial através da membrana (volt)

R - constante dos gases perfeitos (8,315 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)

T- temperatura absoluta (273,15 + T°C, K)

C_1,C_2 - concentrações do ião nos dois lados da membrana

As permeabilidades totais para os iões potássio e cloro foram calculadas assumindo que, no estado estacionário, o fluxo total de entrada de um ião para a célula é igual ao fluxo total

de saída desse mesmo ião. Assumiu-se ainda que, para este dois iões, a permeabilidade da membrana apical é distinta da permeabilidade da membrana basolateral.

Foi atribuído um valor baixo para a permeabilidade transcelular do ião Na^+. Assumiu-se ainda que, para este ião, a permeabilidade da membrana apical é diferente da permeabilidade da membrana basolateral.

O fluxo difusional do Anidrido Carbónico através da membrana celular ocorre por difusão simples, sendo dado pela equação:

$$JAnCarb_Dif = P_AnCarb.(CAnCarb_Hem - CAnCarb_C)$$

b. ATPases

1. O fluxo de protões devido à bomba de protões é dado pela equação

$$JHid_P = JHid_P_M.\left(\frac{CHid_C}{CHid_C + KHid_C}\right)$$

onde:

JHid_P – fluxo do ião através da bomba de protões

$JHid_P_M$ - fluxo do ião em situação de saturação da bomba

KHid_C – afinidade da bomba para o ião H^+

2. O fluxo de sódio devido à bomba de Na^+/K^+ é dado pela equação

$$JpNa = JpNa_M.\left(\frac{CNa_C}{CNa_C + KNa_C}\right)^3.\left(\frac{CK_Hem}{CK_Hem + KK_Hem}\right)^2$$

onde:

JpNa – fluxo do ião Na^+ através da bomba Na^+/K^+

$JpNa_M$ - fluxo do ião Na^+ em situação de saturação da bomba

KK_Hem – afinidade da bomba para o ião K^+

KNa_C – afinidade da bomba para o ião Na^+

c. Transportadores de membrana

Por um critério de simplicidade considerou-se que os transportes obedeciam a cinéticas lineares, em que os acoplamentos estavam representados pelos produtos das concentrações

dos iões acoplados, nos mesmos compartimentos (para os co-transportes) ou em compartimentos opostos (para os contra-transportes).

1. Para os trocadores Na^+/H^+, HCO_3^-/Cl^-, $AcNv/Cl^-$ a forma geral da equação que define os seus fluxos é:

$$Jxy = Jxy_M.(Cx_1.Cy_2 - Cx_2.Cy_1)$$

2. Para o translocador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$, a forma geral da equação que define os seus fluxos é:

$$Jxyz = Jxyz_M.(Cx_1.Cy_1.Cz_2 - Cx_2.Cy_2.Cz_1)$$

3. Para o translocador K^+/Cl^- a forma geral da equação que define os seus fluxos é:

$$Jxy = Jxy_M.(Cx_1.Cy_1 - Cx_2.Cy_2)$$

onde:

Jxy - fluxo através do transportador X/Y

Jxyz - fluxo através do transportador X/Y/Z

Jxy_M - fluxo em situação de saturação através do transportador X/Y

$Jxyz_M$ - fluxo em situação de saturação através do transportador X/Y/Z

Cx_1/Cx_2 - concentrações do ião x dos dois lados da membrana

Cy_1/Cy_2 - concentrações do ião y dos dois lados da membrana

Cz_1/Cz_2 - concentrações do ião z dos dois lados da membrana

Estado estacionário: atribuição de valores numéricos

a. Fluxo de protões

A partir dos resultados descritos por Coimbra e col. (1988) e por Rebelo da Costa e col. (1999ba), em que a corrente de curto-circuito gerada pelo EEM é descrita como sendo devida ao fluxo de protões da hemolinfa para o fluido extrapaleal, gerado pela acção de uma bomba de protões tipo V, atribui-se a este fluxo um valor inicial correspondente ao valor médio (ou típico) da corrente de curto-circuito. Assim,

$$\mathbf{JHid_P0} = 2{,}0 \,.\, 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

O fluxo total de H^+ na célula é devido à acção do transportador Na^+/H^+, da bomba de H^+ e à produção de H^+, derivada da formação de ácidos não voláteis (JpAcNv) e de ião bicarbonato (JBic_P) pela célula. No estado estacionário, segundo o princípio da

conservação de massa, a produção de protões é igual à sua extrosão da célula através da bomba de protões e do trocador H^+/Na^+. Logo:

$$JpAcNv0 + JBic_P0 - JHid_Na_Hem0 = JHid_P0$$

b. Produção de anidrido carbónico

A atribuição de um valor à produção de CO_2 é arbitrária. É possível atribuir-lhe um limite inferior correspondente à taxa a que os protões são expulsos da célula, aproximadamente $2{,}0.10^{-10}$ mol.cm^{-2}.s^{-1}. Escolheu-se o valor de $2{,}0.10^{-9}$ mol.cm^{-2}.s^{-1}

$$\mathbf{JAnCarb} = 2{,}0.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

para permitir simulações em que a taxa de bombagem de protões aumenta. Desta maneira, a produção de CO_2 nunca é factor limitante no funcionamento do sistema.

c. Fluxo do ião bicarbonato

A partir dos resultados apresentados por Machado e col. (1990), confirmados por Hudson (1992) em *Unio*, a corrente de curto-circuito gerada pelo EEM é descrita como sendo numericamente igual ao fluxo de iões bicarbonato através da barreira basolateral. Em princípio este fluxo deve ser numericamente igual ao fluxo de iões bicarbonato produzidos na célula por acção da Anidrase Carbónica (JBic_P), de modo a que, no estado estacionário, haja uma manutenção da quantidade de bicarbonato intracelular. Atribui-se à produção de bicarbonato JBic_P um valor inicial correspondente ao valor da corrente de curto-circuito:

$$JBic_P0 = JHid_P0 = 2{,}0.10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

Com base nos efeitos observados com bloqueadores do transporte de bicarbonato postulou-se que o fluxo deste ião através da membrana basolateral é devido à acção de dois tipos de transportador, um transportador $Na^+/HCO3^-/Cl^-$ e um transportador $HCO3^-/Cl^-$. Como referimos acima para estabilizar o modelo foi necessário postular a existência de canais de bicarbonato que já foram observados noutros sistemas (Cabantchik e Greger, 1992; Mason e col., 2003). Assim a soma dos fluxos de bicarbonato no estado estacionário, devidos a cada um destes mecanismos de transporte, é igual a:

$$JNa_Bic_Hem0 - JCl_Bic_Hem0 + JBic_D0 = -JBic_P0$$

d. Fluxo de ião sódio

O fluxo total de sódio através das duas barreiras é devido à acção do transportador Na^+/H^+, do transportador $Na^+/ HCO3^-/Cl^-$, de canais de Na^+ e da bomba de Na^+/K^+. No estado estacionário, segundo o princípio da conservação de massa, o fluxo de entrada de sódio para a célula é igual ao fluxo de saída. Logo:

$$JNa_Bic_Hem0 + JHid_Na_Hem0 + JNa_D0 = JpNa0$$

O fluxo de sódio através do transportador de $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$, no estado estacionário, é calculado como uma fracção do fluxo de Na^+ através da bomba de Na^+/K^+:

$$JNa_Bic_Hem0 = 0{,}1.JpNa0$$

Não há dados sobre o valor deste fluxo, pelo que o valor escolhido é arbitrário de modo a não influenciar muito as simulações, ainda que permitindo simular o efeito de inibidores.

Idênticas considerações foram usadas para o cálculo do fluxo de sódio através da transportador de Na^+/H^+, no estado estacionário:

$$JHid_Na_Hem0 = 0{,}1\ JHid_P0$$

e. Fluxo de ião potássio

O fluxo total de potássio através da membrana é devido à acção do transportador Cl^-/K^+, de canais de K^+ e da bomba de Na^+/K^+. No estado estacionário, segundo o princípio da conservação da massa, o fluxo de entrada de potássio para a célula é igual ao fluxo de saída. Logo:

$$JpK0 + JK_D0 - JCl_K_Ep0 = 0$$

Uma vez que a estequiometria de transporte da bomba de Na^+/K^+ implica o transporte de 3 iões Na^+ para o exterior da célula e o contra-transporte de 2 iões K^+ para o interior:

$$JpK0 = -(2/3).JpNa0$$

O fluxo difusional de potássio, no estado estacionário, corresponde à partilha arbitrária do fluxo de K^+ através da bomba pelos canais de K^+ e pelo transportador Cl^-/K^+.

f. Fluxo de ácidos não voláteis

O fluxo total de ácidos não voláteis através da barreira basolateral é devido à produção intracelular destes ácidos e à acção do transportador AcNv/Cl^-. No estado estacionário, segundo o princípio da conservação de massa, a produção de ácidos não voláteis na célula é igual ao fluxo de saída. Logo:

$$JpAcNv0 + JAcNv_Cl_Hem0 = 0$$

g. Fluxo de ião cloro

O fluxo total de ião cloro através da membrana é devido à acção do transportador $Na^+/HCO3^-/Cl^-$, do transportador K^+/Cl^-, do transportador $HCO3^-/Cl^-$ e de canais de Cl^-. No estado estacionário, segundo o princípio da conservação de massa o fluxo de entrada de cloro para a célula é igual ao fluxo de saída. Logo:

$$JCl_Bic_Hem0 - JNa_Bic_Hem0 - JAcNv_Cl_Hem0 + JCl_D0 = 0$$

O Modelo Dinâmico

Uma vez definido o estado estacionário, o modelo permite o cálculo dos valores instantâneos das variáveis após a introdução de perturbações, que consistem em alterações de um ou mais parâmetros. Para que o modelo possa ser usado, terá de ser estável quando não é perturbado.

O núcleo do modelo matemático é constituído por seis equações diferenciais não lineares, em função do tempo, que correspondem às quantidades intracelulares do ião sódio (QNa), do ião potássio (QK), do ião bicarbonato (QBic), do hidrogenião total (QHidT), de ácidos não voláteis (QAcNv) e de anidrido carbónico total (QAnCarbT).

As quantidades instantâneas no citoplasma resultam do somatório dos fluxos de cada um desses componentes entre o meio intracelular e os dois compartimentos extracelulares considerados.

Assim, definiram-se as derivadas em ordem ao tempo, d/dt(Qx), para cada um dos componentes:

$d/dt\ (QNa) = JNa_D+JHid_Na_Hem+JNa_Bic_Hem-JpNa$

$d/dt\ (QK) = JpK+JK_D-JCl_K_Ep$

$d/dt\ (QAnCarbT) = JAnCarb-JCl_Bic_Hem+JNa_Bic_Hem+JAnCarb_Dif+JBic_D$

$d/dt\ (QHidT) = JpAcNv-JHid_P+JBic_P-JHid_Na_Hem$

$d/dt\ (QAcNv) = JpAcNv+JAcNv_Cl_Hem$

$d/dt\ (QBic) = JBic_P+JNa_Bic_Hem-JCl_Bic_Hem+JBic_D$

A estratégia dos cálculos consiste em calcular o valor $Qi(t+\Delta t)$ a partir do valor de $Qi(t)$ e do valor de $d/dt\ (Qi(t))$. O método de cálculo usado é fornecido pelo software Madonna, que permite escolher entre 5 algoritmos. A escolha é feita empiricamente, utilizando o critério simples de seleccionar o método que mais rapidamente produz resultados.

O Significado do Modelo

Na sua fase actual, o modelo não é uma representação rigorosa do sistema que pretende representar. É uma ferramenta de análise cuja função principal é mostrar a coerência interna do modelo qualitativo proposto até à data.

Simulações

A estratégia experimental, utilizada na simulação do efeito na Ccc e pH_i do EEM de substâncias inibidoras específicas de sistemas de transporte membranar, consistia em alterar o valor de um ou mais parâmetros tal como se descreve abaixo. Os parâmetros escolhidos são uma interpretação dos efeitos dos inibidores em termos do modelo.

As perturbações introduzidas no modelo obedeceram a um desenho genérico:

- o bloqueio de canais simula-se reduzindo o valor da respectiva permeabilidade;
- o bloqueio das bombas e dos transportadores simula-se reduzindo os valores das respectivas taxas máximas de transporte.

Para evitar indeterminações numéricas, os valores dos parâmetros nunca foram reduzidos a zero e as transições entre valores dos parâmetros foram exponenciais, utilizando-se expressões do tipo

$$PAR(t)=PAR(0)*(1-exp(-t/\tau))$$

em que PAR(t) e PAR(0) são os valores do parâmetro a perturbar nos instantes *0* e *t*, e τ é uma constante de tempo. A constante de tempo τ foi introduzida para ajustar a resposta no tempo e tem nesta fase um significado desconhecido. A resposta da Ccc do EEM aos inibidores é em geral muito lenta e não é integralmente explicável pela taxa a que os compartimentos variam como resultado de modificações nos fluxos iónicos. O efeito de qualquer droga sobre a Ccc é uma cadeia de mecanismos, que incluem a sua difusão até ao receptor respectivo, através duma camada não agitada, a sua combinação com esse receptor, e o efeito desta combinação sobre os processos que seguem e sobre o transporte iónico através das duas barreiras. Todos estes mecanismos decorrem de acordo com as respectivas taxas, que neste momento são desconhecidas.

Efeito da Bafilomicina A_1 na Ccc

A Bafilomicina A_1 é um inibidor específico das ATPases tipo V (Drose e Altendorf, 1997). O efeito desta substância na Ccc foi estudado por Rebelo da Costa e col. (1999ba), utilizando o método de Voltagem-Controlada. Estes autores verificaram uma inibição da

corrente quando adicionaram a Bafilomicina A_1 do lado apical do epitélio. O seu efeito foi simulado reduzindo a taxa máxima de bombeamento da V-ATPase em 95%. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 40. Está representada na Figura 41 a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação.

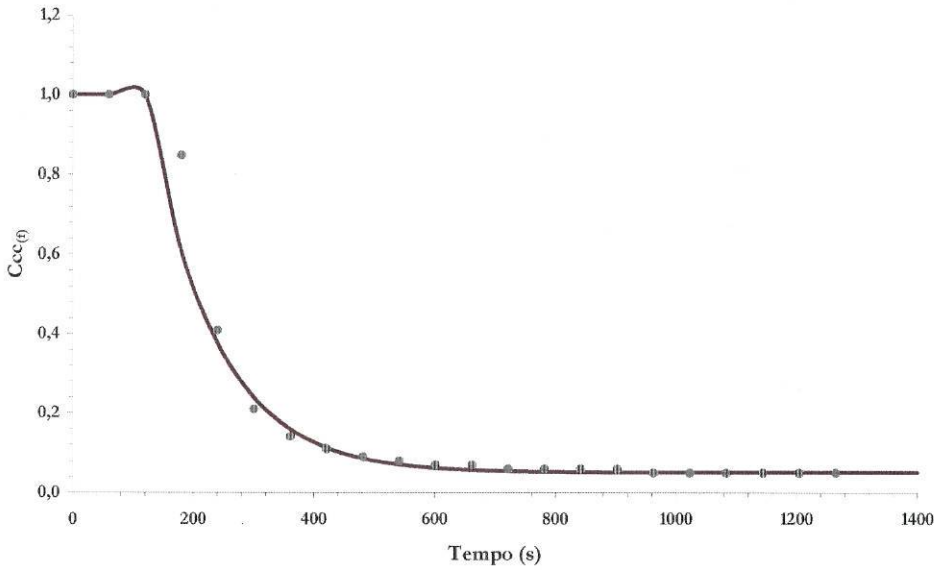


Figura 40. Efeito da Bafilomicina A_1 na Ccc (valor fraccionário). Valores experimentais (•) (Rebelo da Costa e col., 1999b) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JHid_PM (95%).

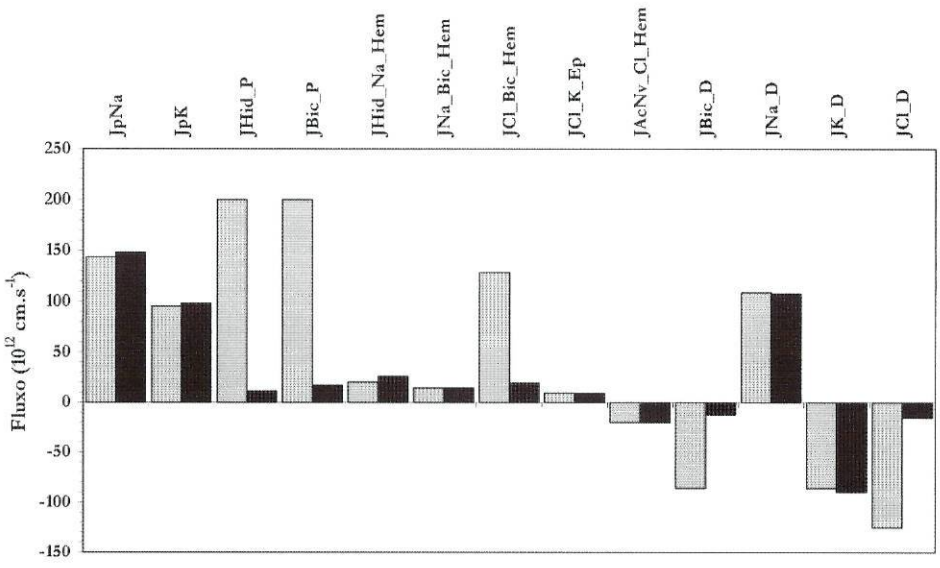


Figura 41. Fluxos no estado estacionário (▥) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito da Bafilomicina A_1 na Ccc.

Não existe discrepância significativa entre os valores computados e os valores experimentais, para esta simulação.

Como podemos verificar na Figura 41, reduzindo a taxa máxima de transporte da V-ATPase verifica-se uma diminuição directa do fluxo de iões H^+ através dessa bomba (*JHid_P*). Esta diminuição da saída de iões H^+ da célula leva a um aumento da sua concentração, que implica uma um desvio para a esquerda (produção de CO_2) da reacção de hidratação de CO_2 e, portanto, uma diminuição da concentração intracelular de ião bicarbonato (*JBic_P*) e um aumento da taxa de transporte do trocador Na^+/H^+ (*JHid_Na_Hem*). A redução do ião bicarbonato intracelular leva, por seu lado, a uma redução do seu fluxo através dos canais específicos (*JBic_D*) e do trocador HCO_3^-/Cl^- (*JCl_Bic_Hem*). A diminuição do fluxo difusional de cloro (*JCl_D*) só pode explicar-se pela ligeira despolarização do compartimento intracelular. As alterações verificadas nos outros fluxos representados na Figura 41 são pouco significativas para esta simulação.

Efeito do Diamox na Ccc

O Diamox é um inibidor específico da Anidrase Carbónica (Ashe JR e col., 1956; Enns e Hill, 1983). O efeito desta substância na Ccc foi estudado por Coimbra e col. (1988), utilizando o método de Voltagem-Controlada. Estes autores verificaram uma inibição da corrente quando adicionaram o Diamox a qualquer dos lados do epitélio. O seu efeito foi simulado reduzindo da taxa máxima de actividade da enzima de 98,5%. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 42. Está representada na Figura 43 a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação.

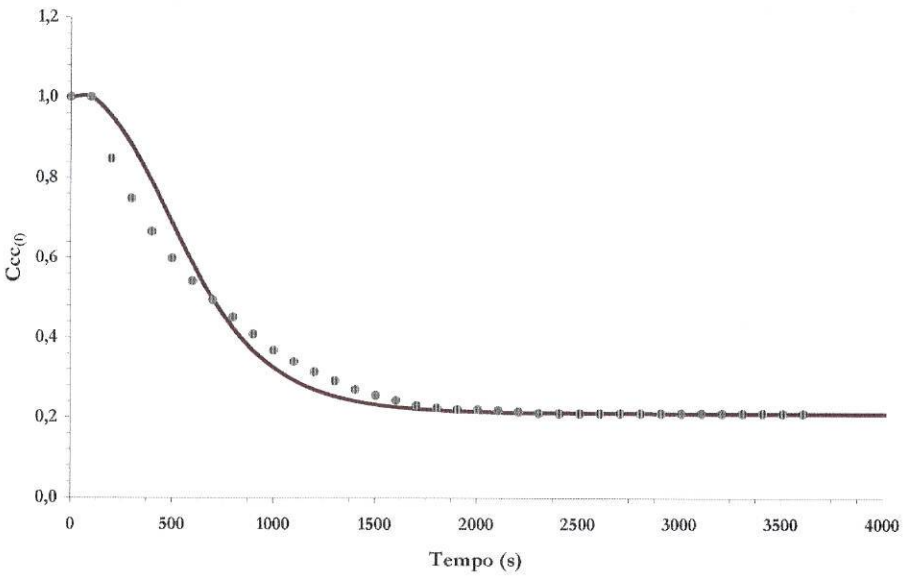


Figura 42. Efeito do Diamox na Ccc (valor fraccionário). Valores experimentais (●) (Coimbra e col., 1988) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JBic_PM (98,5%).

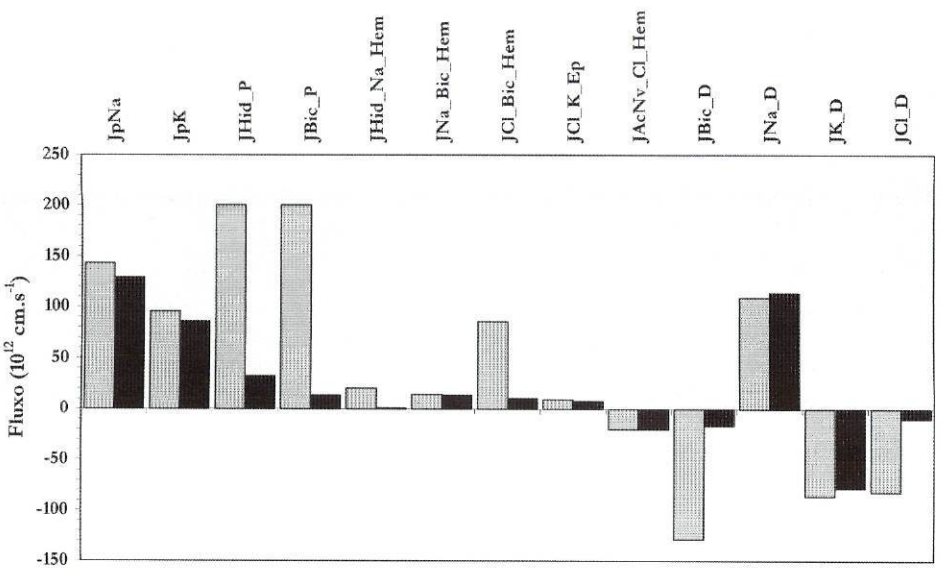


Figura 43. Fluxos no estado estacionário (▥) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito do Diamox na Ccc.

Para simular o efeito do Diamox não foi necessário introduzir qualquer alteração nos parâmetros e fluxos iniciais.

Analisando as variações mais significativas nos fluxos considerados, podemos verificar (Figura 43) que, reduzindo a taxa máxima de hidratação do anidrido carbónico (*JBic_P*), se verifica uma diminuição directa da produção intracelular de iões bicarbonato e H^+,

consequente redução das concentrações intracelulares de protões e bicarbonato e dos fluxos de saída da célula destes iões, por diminuição da taxa de transporte do trocador Na^+/H^+ (*JHid_Na_Hem*) e da bomba de protões (*JHid_P*). A redução do ião bicarbonato intracelular leva, por seu lado, a uma redução do fluxo de ião bicarbonato através dos canais específicos (*JBic_D*) e do trocador HCO_3^-/Cl^- (*JCl_Bic_Hem*). A diminuição da taxa de transporte do trocador HCO_3^-/Cl^- reduz a entrada de ião Cl^- para a célula, logo implica a diminuição do seu fluxo difusional (*JCl_D*). As alterações verificadas nos outros fluxos representados na Figura 43 são pouco significativas para esta simulação.

Efeito do Amiloride na Ccc

O Amiloride é um inibidor específico do trocador Na^+/H^+ (Grinstein e Smith, 1987; Mahnensmith e Aronson, 1985), estando descrita igualmente a sua acção inibitória em canais de membrana específicos de Na^+ (Benos e col., 1987). O efeito desta substância na Ccc foi descrito por Coimbra e col. (1988). O seu efeito foi simulado introduzindo uma redução de 98% da taxa máxima de transporte do trocador e 90% da permeabilidade da membrana basolateral ao ião Na^+. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 44. Está também representada na Figura 45 a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação.

O efeito do Amiloride só pôde ser simulado aumentando simultaneamente os valores de referência da permeabilidade ao ião Na^+ das barreiras basolateral e apical das células e diminuindo a fracção de ião bicarbonato transportado pelo transportador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$.

Coimbra e col. (1988) atribuíram o efeito deste inibidor na Ccc à inibição do trocador Na^+/H^+. A simulação aponta para a existência de canais de Na^+ sensíveis a esse inibidor, que contribuem para o efeito que tem sobre a Ccc.

Como podemos verificar na Figura 45, reduzindo a taxa máxima de transporte do trocador Na^+/H^+ verifica-se uma diminuição directa do fluxo de iões H^+ e Na^+ através desse sistema de transporte (*JHid_Na_Hem*). A diminuição na saída de iões H^+ da célula leva a um aumento da sua concentração intracelular, que implica uma ligeira subida no seu fluxo através da V-ATPase (*JHid_P*). A redução do fluxo de entrada na célula do ião Na^+ leva, por seu lado, a uma diminuição da taxa de transporte da bomba de Na^+/K^+ (*JpNa*), ou seja, da

entrada de iões K^+ e da saída de iões Na^+ da célula, daí verificar-se uma redução do fluxo difusional desses iões através dos canais específicos (*JNa_D* e *JK_D*). As alterações verificadas nos outros fluxos representados na Figura 45 são pouco significativas para esta simulação.

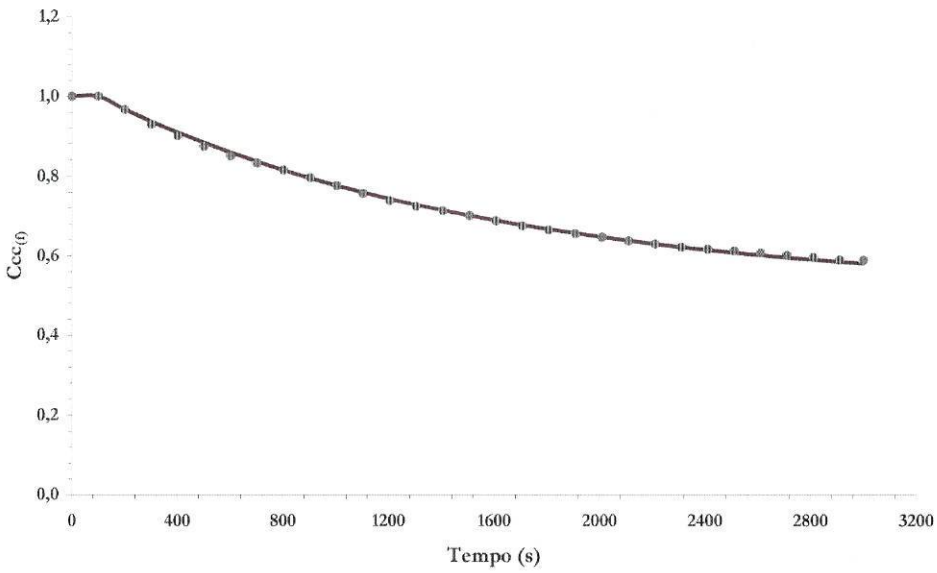


Figura 44. Efeito do Amiloride na Ccc (valor fraccionário). Valores experimentais (⊕) (Coimbra e col., 1988) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JHid_Na_HemM (98%) e PNa_Hem (90%).

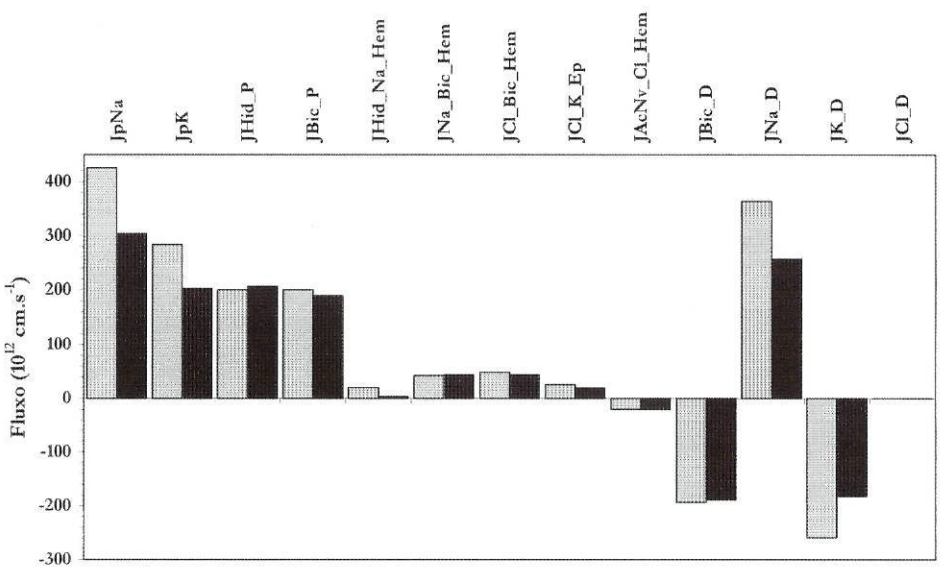


Figura 45. Fluxos no estado estacionário (▥) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito do Amiloride na Ccc.

Efeito do DIDS e SITS na Ccc

O DIDS é um inibidor dos transportadores $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$ e HCO_3^-/Cl^- (Boron e Boulpaep, 1983; Pace e col., 1983). Está descrita igualmente a sua acção na inibição de canais de membrana específicos de Cl^- (Bicho e col., 1999; Jensen e Skott, 1996). O efeito desta substância na Ccc foi descrito por Coimbra e col. (1988), utilizando a técnica de Voltagem-Controlada. Quando o inibidor foi adicionado do lado basolateral do epitélio, verificaram uma diminuição da Ccc. O seu efeito foi simulado reduzindo 90% das taxas máximas de transporte dos transportadores de bicarbonato e 85% da permeabilidade da membrana basolateral ao ião Cl^-. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 46. Está representada na Figura 47 a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação.

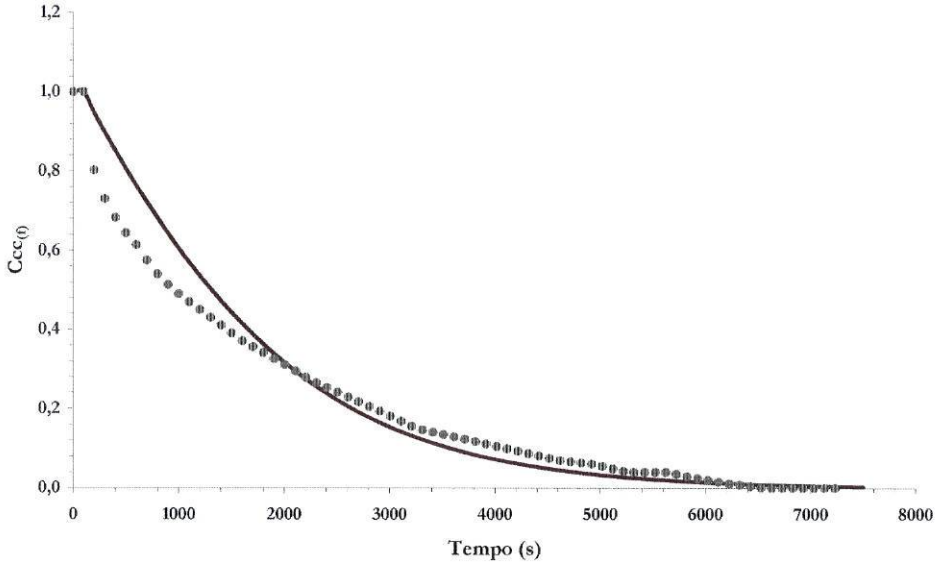


Figura 46. Efeito do DIDS na Ccc (valor fraccionário). Valores experimentais (•) (Coimbra e col., 1988) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JCl_Bic_HemM (90%), JNa_Bic_HemM (90%) e PCl_Hem (85%).

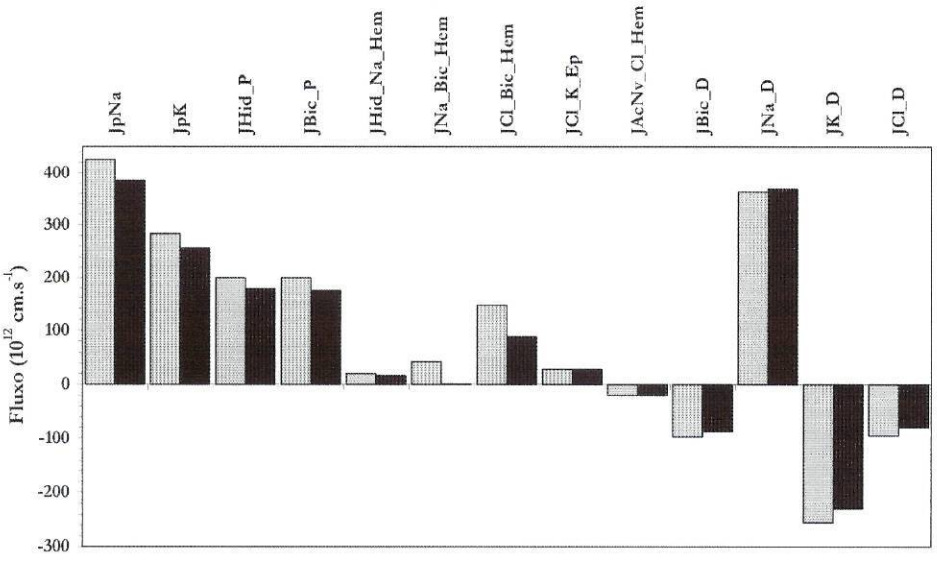


Figura 47. Fluxos no estado estacionário (▥) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito do DIDS na Ccc.

O SITS é um inibidor dos transportadores $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$ e HCO_3^-/Cl^- (Boron e Boulpaep, 1983; Yarbrough e col., 1999) . Está descrita igualmente a sua acção na inibição de canais de membrana específicos de Cl^- (Dick e col., 1999; Hogg e col., 1994). O efeito desta substância na Ccc foi descrito por Coimbra e col. (1988). Utilizando a técnica de Voltagem-Controlada, verificaram uma inibição da Ccc, quando o inibidor foi adicionado do lado basolateral do epitélio. O seu efeito foi simulado introduzindo uma redução de 90% das taxas máximas de transporte dos transportadores de bicarbonato e 78 % da permeabilidade da membrana basolateral ao ião Cl^-. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 48. Na Figura 49 está representada a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação.

O efeito do DIDS e do SITS na Ccc só foi possível simular aumentando a permeabilidade ao Na^+ das barreiras apical e basolateral das células.

O efeito destes inibidores na Ccc foi atribuído, por Coimbra e col. (1988), à inibição do trocador HCO_3^-/Cl^- presente na membrana basolateral. Barrias (2003) descreveu a presença de um trocador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$ também na membrana basolateral das células. Como referido, este trocador é também sensível a inibição por SITS e DIDS.

Tendo em conta estes dados, introduziu-se uma redução da taxa máxima desses dois transportadores nas simulações, utilizando-se constantes de tempo distintas para se verificar

uma maior sobreposição dos dados. Foi ainda necessário inibir os canais de Cl^- na membrana basolateral.

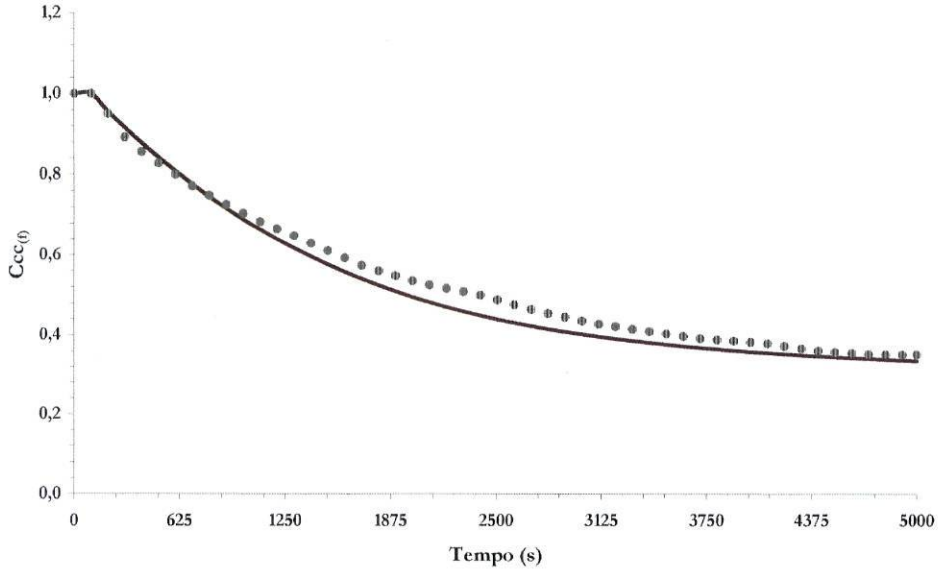


Figura 48. Efeito do SITS na Ccc (valor fraccionário). Valores experimentais (•) (Coimbra e col., 1988) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução JCl_Bic_HemM (90%), JNa_Bic_HemM (90%) e PCl_Hem (78%).

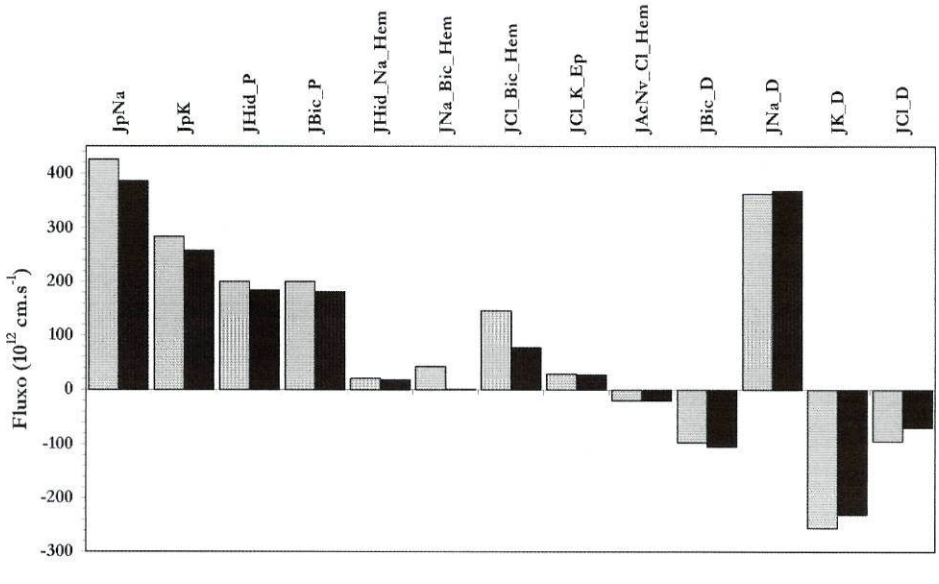


Figura 49. Fluxos no estado estacionário (■) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito do SITS na Ccc.

Como as alterações induzidas pela simulação do efeito destes dois inibidores na Ccc são em tudo semelhantes, serão analisadas em conjunto. Como podemos verificar (Figuras 47 e 49) reduzindo as taxas máximas dos transportadores HCO_3^-/Cl^- (*JCl_Bic_Hem*) e $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$ (*JNa_Bic_Hem*) e a permeabilidade dos canais específicos do ião Cl^- da barreira basolateral (*JCl_DifHem*), verifica-se uma diminuição directa do fluxo de iões através desses sistemas de transporte. A diminuição do fluxo de saída de iões bicarbonato da célula pelo trocador HCO_3^-/Cl^- (*JCl_Bic_Hem*) determina uma subida na concentração intracelular de bicarbonato e uma deslocação da reacção de hidratação do CO_2 para a esquerda (redução de *JBic_P*) e, por isso, uma diminuição na produção de iões H^+. Esta diminuição leva a um ligeiro decréscimo do seu fluxo de saída da célula, por diminuição da taxa de transporte do trocador Na^+/H^+ (*JHid_Na_Hem*) e da bomba de protões (*JHid_P*). As alterações verificadas nos outros fluxos representados nas Figuras 47 e 49 são pouco significativas para esta simulação.

Efeito da Ubaína na Ccc

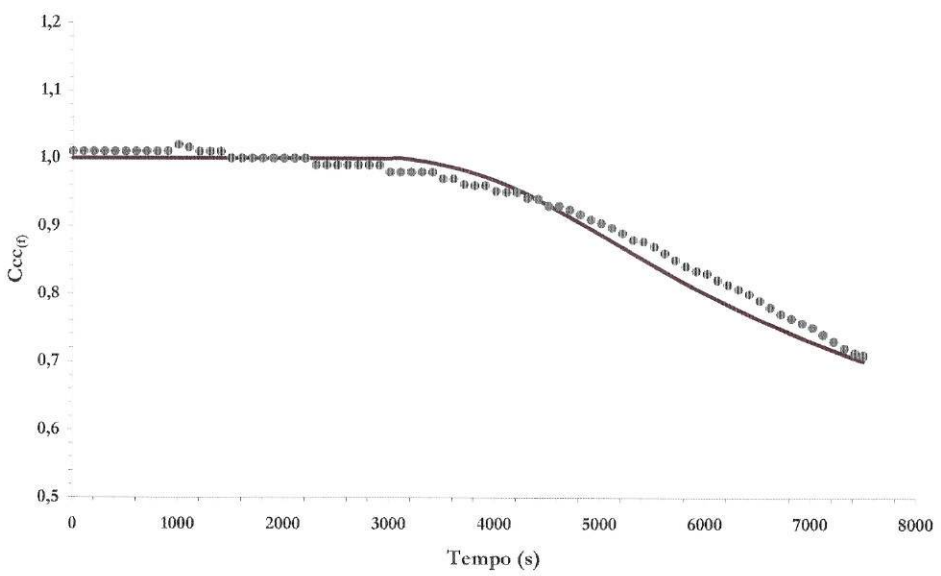


Figura 50. Efeito da Ubaína na Ccc (valor fraccionário). Valores experimentais (●) (Rebelo da Costa e col., 1999a) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JpNaM (95%).

A Ubaína é um inibidor específico da bomba de Na^+/K^+ (Schneider e col., 1998; Shimizu e col., 1983). O efeito desta substância na Ccc foi descrito por Rebelo da Costa e col. (1999a), utilizando a técnica de Voltagem-Controlada. Verificaram uma inibição da Ccc quando o inibidor foi adicionado do lado basolateral do epitélio O seu efeito foi simulado introduzindo uma redução da taxa máxima de transporte da bomba de 95%. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 50. Está representada na Figura 51 a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação. Não existem discrepâncias significativas entre os valores computados e os valores experimentais.

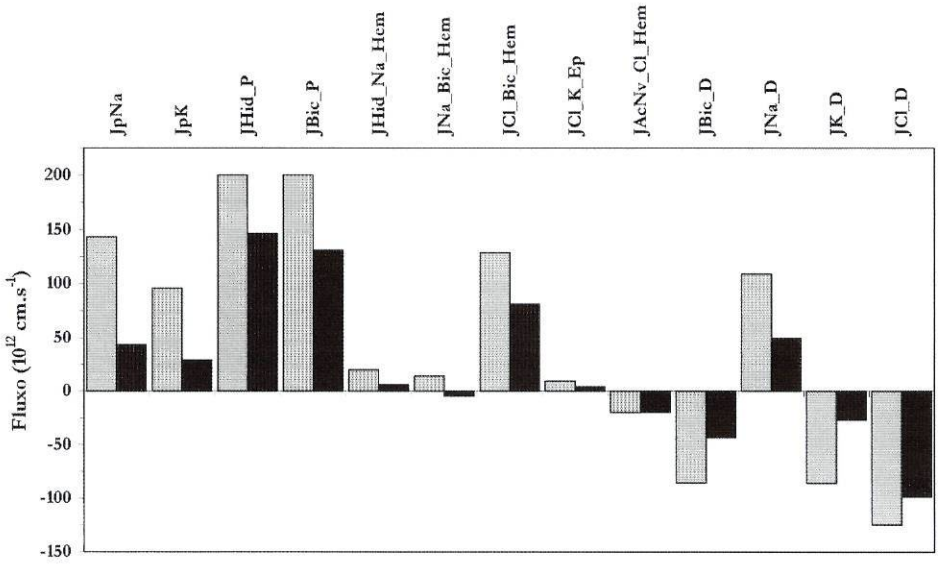


Figura 51. Fluxos no estado estacionário (▥) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito da Ubaína na Ccc.

Como podemos verificar na Figura 51, reduzindo a taxa máxima de transporte da bomba de Na^+/K^+, verifica-se uma diminuição directa do fluxo de iões através desse sistema de transporte (*JpNa*), ou seja, da entrada de iões K^+ e da saída de iões Na^+ da célula. Esta diminuição implica uma redução do seu fluxo difusional através dos canais específicos (*JNa_D* e *JK_D*). O aumento acentuado da concentração intracelular do ião Na^+ leva à diminuição do seu fluxo de entrada pelo trocador Na^+/H^+ (*JHid_Na_Hem*) e à inversão dos fluxos do transportador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$ (*JNa_Bic_Hem*). Como o funcionamento dessa bomba contribui para a determinação do potencial de membrana, verifica-se que a sua inibição leva a uma despolarização intracelular acentuada. Esta despolarização implica a

redução do fluxo difusional dos iões carregados negativamente (*JCl_D* e *JBic_D*). A diminuição na saída desses iões da célula leva a uma acumulação intracelular de cloro e bicarbonato e consequente diminuição de *JBic_P*, inversão dos fluxos do transportador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$ e redução da taxa de transporte do trocador HCO_3^-/Cl^- (*JCl_Bic_Hem*). A diminuição de *JBic_P* implica também uma redução da produção intracelular de iões H^+ e, por isso, uma redução do seu fluxo através da bomba de protões (*JHid_P*). As alterações verificadas nos outros fluxos representados na Figura 51 são pouco significativas para esta simulação.

Efeito do DIOA na Ccc

O DIOA é um inibidor do co-transportador de Cl^-/K^+ (Linton e O'Donnell, 1999; Soler e col., 1993). O efeito desta substância na Ccc foi descrito por Rebelo da Costa (1994). O seu efeito foi simulado introduzindo uma redução da taxa máxima de transporte do co-transportador de 95%. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 52. Na Figura 53 estão representados os fluxos dos diferentes sistemas de transporte no estado estacionário e no instante final da simulação.

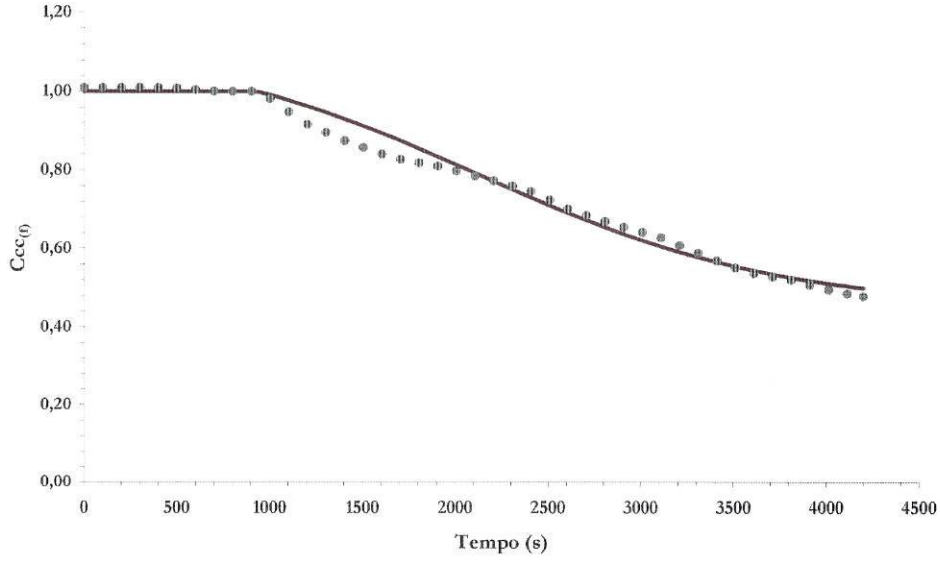


Figura 52. Efeito do DIOA na Ccc (valor fraccionário). Valores experimentais (●) (Rebelo da Costa, 1994) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JCl_K_EpM (95%).

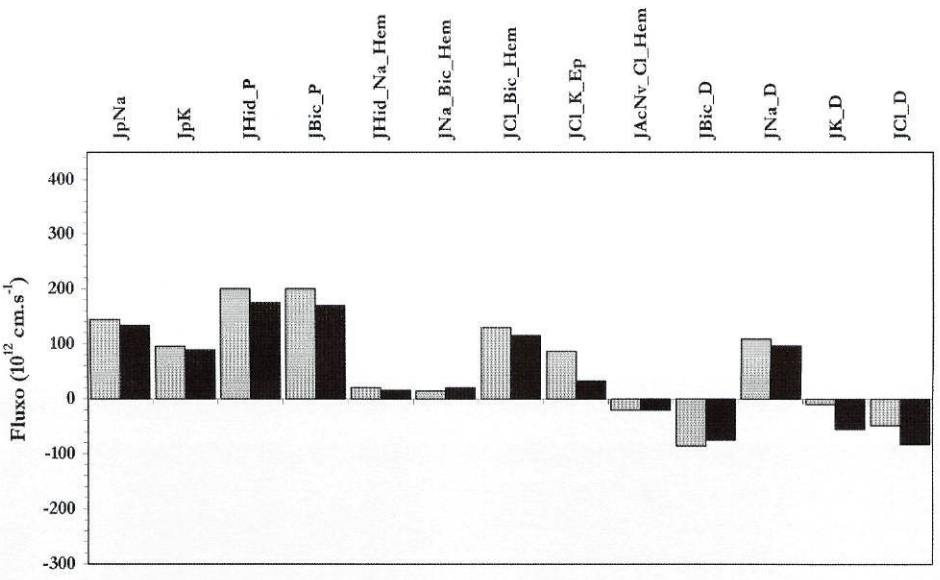


Figura 53. Fluxos no estado estacionário (▥) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito do DIOA na Ccc.

Para simular o efeito do DIOA na Ccc foi necessário diminuir a permeabilidade ao ião Cl^- da membrana basolateral e aumentar a fracção de ião K^+ transportada pelo co-transportador K^+/Cl^- no estado de referência.

Reduzindo a taxa máxima de transporte do transportador de Cl^-/K^+ verifica-se uma diminuição directa do fluxo de iões através desse sistema de transporte (*JCl_K_Ep*), ou seja, da saída de iões K^+ e Cl^- da célula (Figura 53). Esta diminuição implica um aumento do fluxo difusional desses iões através dos canais específicos (*JCl_D* e *JK_D*). O aumento da concentração intracelular do ião K^+ leva a um ligeiro decréscimo na taxa de transporte da bomba de Na^+/K^+ e a uma despolarização. Tal como para a simulação do efeito da Ubaína (embora com menor magnitude), esta despolarização implica a ligeira redução do fluxo difusional dos iões bicarbonato (*JBic_D*). Esta diminuição na saída desses iões da célula leva a um decréscimo na produção intracelular de ião bicarbonato (*JBic_P*) e por isso uma redução da taxa de transporte do trocador HCO_3^-/Cl^- (*JCl_Bic_Hem*). A diminuição *JBic_P* implica também uma redução da produção intracelular de iões H^+ e, por isso, uma redução do seu fluxo através da bomba de protões (*JHid_P*). As alterações verificadas nos outros fluxos representados na Figura 53 são pouco significativas para esta simulação.

Efeito da Bafilomicina A_1 e Amiloride no pHi

O efeito destas substâncias no pH_i foi descrito no capítulo 4.

Para simular o seu efeito no pH_i utilizou-se uma estratégia distinta da usada nas simulações anteriores. Como os resultados experimentais foram obtidos utilizando soluções exteriores sem iões bicarbonato e anidrido carbónico, reduziu-se o valor das concentrações destes componentes nas soluções extracelulares antes de se iniciarem as simulações, de modo a que os parâmetros do modelo (permeabilidades, afinidades, taxas máximas, etc.) fossem sempre positivos.

Para além da alteração das concentrações extracelulares de alguns componentes, para que fosse possível a simulação do efeito destes dois inibidores no pH_i, foi necessário introduzir outras modificações no estado estacionário, nomeadamente, o aumento da taxa de transporte do trocador Na^+/H^+ e da produção de ácidos não voláteis. Estas modificações acarretaram, por sua vez, alterações em alguns dos fluxos no estado estacionário de outros sistemas de transporte (Figuras 55 e 57).

O efeito da Bafilomicina A_1 foi simulado introduzindo uma redução da taxa máxima de bombeamento da V-ATPase de 99%. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 54. Na Figura 55 está representada a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação.

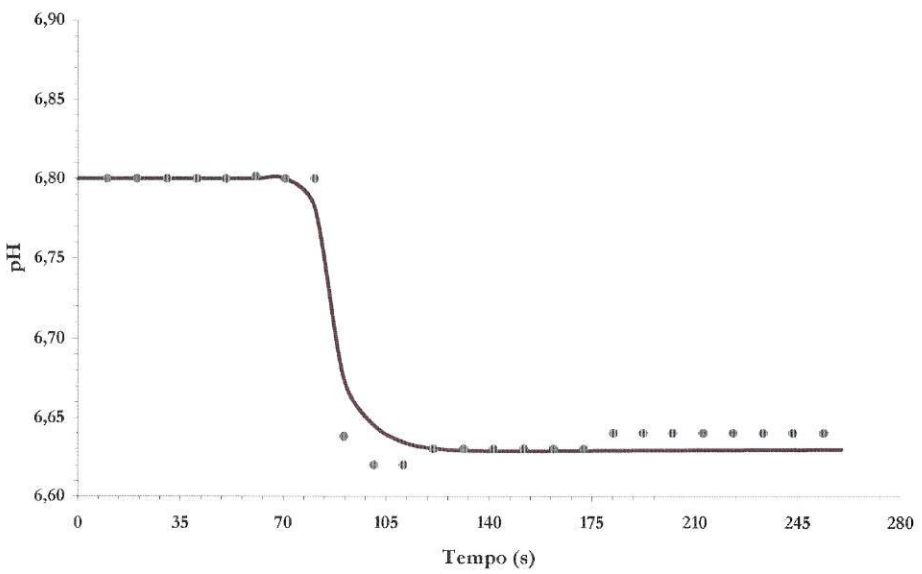


Figura 54. Efeito da Bafilomicina A_1 no pH_i (valor normalizado). Valores experimentais (⊕) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JHid_PM (99%).

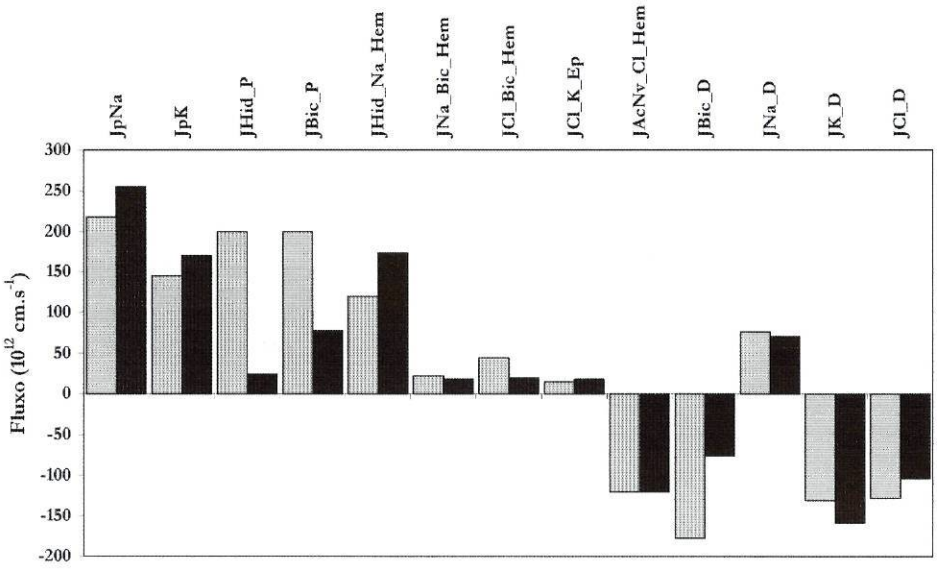


Figura 55. Fluxos no estado estacionário (▥) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito da Bafilomicina A_1 no pH intracelular.

O efeito do Amiloride no pH_i foi simulado introduzindo uma redução da taxa máxima de transporte do trocador Na^+/H^+ e da permeabilidade da membrana basolateral ao ião Na^+ de 98%. Os valores experimentais e os resultantes da simulação estão representados na Figura 56. Na Figura 57 está representada a variação dos fluxos dos diferentes sistemas de transporte entre o estado estacionário e o instante final da simulação.

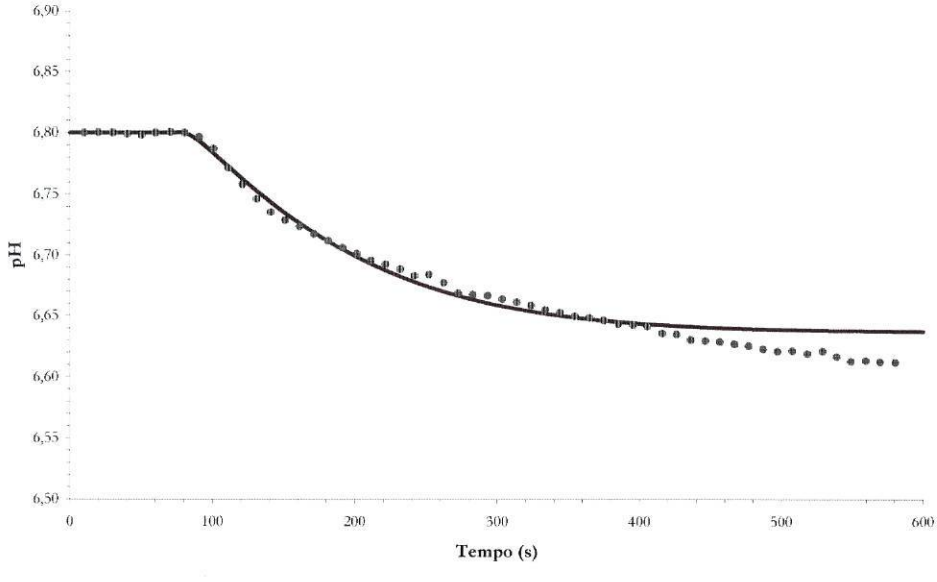


Figura 56. Efeito do Amiloride no pH_i (valor normalizado). Valores experimentais (Φ) e valores resultantes da computação do modelo (▬) assumindo uma redução de JHid_Na_HemM (98%) e PNa_Hem (98%).

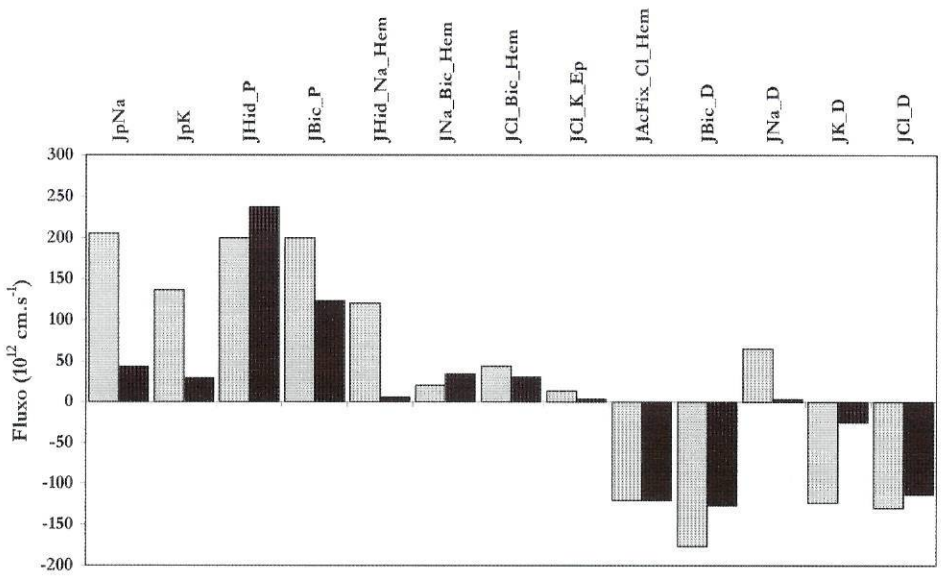


Figura 57. Fluxos no estado estacionário (■) e fluxos no instante final (■) resultantes da simulação do efeito do Amiloride no pH intracelular.

Como podemos verificar nas Figuras 55 e 57, a redução das taxas máximas de transporte inibidas nestas duas simulações, *JHid_PM* e *JHid_Na_HemM*, produzem efeitos nos fluxos finais dos diversos transportadores membranares idênticos aos verificados nas simulações do efeito dos dois compostos na Ccc. Podemos justificar essas variações baseando-nos nas explicações referidas em cada um desses casos.

Parâmetros e Fluxos

A combinação de parâmetros utilizados nas diferentes simulações estão representados nas tabelas seguintes. Estão também representados os valores dos fluxos dos sistemas de transporte no estado estacionário (Início) e no instante final das simulações (Fim).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	42,4	**JpNa**	143	148
V_C	1,50	1,41	**JpK**	96	99
pH_C	6,80	6,69	**JHid_P**	200	11
CCl_C	3,20	3,26	**JAnCarb_Dif**	-1800	-1983
CNa_C	2,00	2,26	**JBic_P**	200	17
CK_C	40,00	39,19	**JHid_Na_Hem**	20	26
CBic_C	2,00	1,94	**JNa_Bic_Hem**	14	14
PNa_Hem	2550		**JCl_Bic_Hem**	129	19
PNa_Ep	450		**JCl_K_Ep**	10	9
PK_Hem	68343		**JAcNv_Cl_Hem**	-20	-20
PK_Ep	17086		**JBic_D**	-86	-12
PCl_Hem	2426810		**JNa_D**	109	108
PCl_Ep	1040060		**JK_D**	-86	-89
PBic_Hem	325137		**JCl_D**	-125	-15

Tabela 5. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito da Bafilomicina A_1 na Ccc (Fluxos-10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações-mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^{-9}cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	45,6	**JpNa**	143	129
V_C	1,50	2,16	**JpK**	96	86
pH_C	6,80	7,86	**JHid_P**	200	32
CCl_C	3,20	2,88	**JAnCarb_Dif**	-1800	-1986
CNa_C	2,00	1,43	**JBic_P**	200	14
CK_C	40,00	43,88	**JHid_Na_Hem**	20	1
CBic_C	2,00	1,71	**JNa_Bic_Hem**	14	13
PNa_Hem	2850		**JCl_Bic_Hem**	86	11
PNa_Ep	150		**JCl_K_Ep**	10	8
PK_Hem	68343		**JAcNv_Cl_Hem**	-20	-20
PK_Ep	17086		**JBic_D**	-129	-16
PCl_Hem	1592640		**JNa_D**	109	114
PCl_Ep	682562		**JK_D**	-86	-78
PBic_Hem	487706		**JCl_D**	-82	-9

Tabela 6. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito do Diamox na Ccc (Fluxos - 10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações-mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^9 cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	44,2	JpNa	426	303
V_C	1,50	1,46	JpK	284	202
pH_C	6,80	6,77	JHid_P	200	206
CCl_C	3,20	3,06	JAnCarb_Dif	-1800	-1811
CNa_C	2,00	0,86	JBic_P	200	189
CK_C	40,00	41,15	JHid_Na_Hem	20	3
CBic_C	2,00	1,91	JNa_Bic_Hem	43	44
PNa_Hem	4100		JCl_Bic_Hem	49	44
PNa_Ep	5900		JCl_K_Ep	26	20
PK_Hem	205342		JAcNv_Cl_Hem	-20	-20
PK_Ep	51336		JBic_D	-194	-189
PCl_Hem	7178		JNa_D	363	256
PCl_Ep	3076		JK_D	-258	-183
PBic_Hem	736014		JCl_D	-0,37	-0,59

Tabela 7. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito do Amiloride na Ccc (Fluxos-10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações-mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^9 cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	43,6	JpNa	426	386
V_C	1,50	1,61	JpK	284	257
pH_C	6,80	6,89	JHid_P	200	179
CCl_C	3,20	3,14	JAnCarb_Dif	-1800	-1825
CNa_C	2,00	1,46	JBic_P	200	175
CK_C	40,00	40,65	JHid_Na_Hem	20	16
CBic_C	2,00	2,56	JNa_Bic_Hem	43	1
PNa_Hem	5500		JCl_Bic_Hem	146	88
PNa_Ep	4500		JCl_K_Ep	28	28
PK_Hem	203086		JAcNv_Cl_Hem	-20	-20
PK_Ep	50771		JBic_D	-97	-87
PCl_Hem	1840220		JNa_D	363	369
PCl_Ep	788666		JK_D	-256	-229
PBic_Hem	368007		JCl_D	-95	-80

Tabela 8. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito do DIDS na Ccc (Fluxos - 10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações- mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^9 cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	43,6	**JpNa**	426	387
V_C	1,50	1,58	**JpK**	284	258
pH_C	6,80	6,87	**JHid_P**	200	184
CCl_C	3,20	3,14	**JAnCarb_Dif**	-1800	-1819
CNa_C	2,00	1,47	**JBic_P**	200	181
CK_C	40,00	40,64	**JHid_Na_Hem**	20	17
CBic_C	2,00	2,41	**JNa_Bic_Hem**	43	1
PNa_Hem	5500		**JCl_Bic_Hem**	146	77
PNa_Ep	4500		**JCl_K_Ep**	28	27
PK_Hem	203086		**JAcNv_Cl_Hem**	-20	-20
PK_Ep	50771		**JBic_D**	-97	-105
PCl_Hem	1840220		**JNa_D**	363	369
PCl_Ep	788666		**JK_D**	-256	-231
PBic_Hem	368007		**JCl_D**	-95	-69

Tabela 9. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito do SITS na Ccc (Fluxos-10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações-mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^9 cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	25,6	**JpNa**	143	43
V_C	1,50	2,19	**JpK**	96	29
pH_C	6,80	7,04	**JHid_P**	200	146
CCl_C	3,20	6,30	**JAnCarb_Dif**	-1800	-1869
CNa_C	2,00	20,23	**JBic_P**	200	131
CK_C	40,00	19,49	**JHid_Na_Hem**	20	6
CBic_C	2,00	3,78	**JNa_Bic_Hem**	14	-5
PNa_Hem	2550		**JCl_Bic_Hem**	129	81
PNa_Ep	450		**JCl_K_Ep**	10	4
PK_Hem	68343		**JAcNv_Cl_Hem**	-20	-20
PK_Ep	17086		**JBic_D**	-86	-44
PCl_Hem	2426810		**JNa_D**	109	50
PCl_Ep	1040060		**JK_D**	-86	-27
PBic_Hem	325137		**JCl_D**	-125	-99

Tabela 10. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito da Ubaína na Ccc (Fluxos - 10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações-mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^9 cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	35,0	JpNa	143	133
V_C	1,50	1,74	JpK	96	88
pH_C	6,80	6,91	JHid_P	200	175
CCl_C	3,20	4,38	JAnCarb_Dif	-1800	-1830
CNa_C	2,00	1,55	JBic_P	200	170
CK_C	40,00	39,74	JHid_Na_Hem	20	16
CBic_C	2,00	2,68	JNa_Bic_Hem	14	20
PNa_Hem	1050		JCl_Bic_Hem	129	115
PNa_Ep	1950		JCl_K_Ep	86	32
PK_Hem	8543		JAcNv_Cl_Hem	-20	-20
PK_Ep	949		JBic_D	-86	-75
PCl_Hem	134172		JNa_D	109	97
PCl_Ep	1207550		JK_D	-10	-55
PBic_Hem	325137		JCl_D	-48	-82

Tabela 11. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito do DIOA na Ccc (Fluxos - 10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações-mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^9 cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	40,9	JpNa	218	255
V_C	1,50	1,47	JpK	145	170
pH_C	6,80	6,63	JHid_P	200	24
CCl_C	3,20	3,47	JAnCarb_Dif	-1800	-1922
CNa_C	2,00	4,53	JBic_P	200	78
CK_C	40,00	37,42	JHid_Na_Hem	120	174
CBic_C	2,00	1,61	JNa_Bic_Hem	22	18
PNa_Hem	2850		JCl_Bic_Hem	44	19
PNa_Ep	150		JCl_K_Ep	15	18
PK_Hem	103959		JAcNv_Cl_Hem	-120	-120
PK_Ep	25990		JBic_D	-177	-76
PCl_Hem	2491230		JNa_D	76	71
PCl_Ep	1067670		JK_D	-131	-159
PBic_Hem	98177		JCl_D	-128	-103

Tabela 12. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito da Bafilomicina A_1 no pH_i (Fluxos-10^{-12} mol.cm^{-2}.s^{-1}; Concentrações-mM; VM-mV; V_C-1.0^{e-3}cm^3/cm^2; Permeabilidades-10^9 cm.s^{-1}).

	Início	Fim		Início	Fim
VM	43,0	45,7	**JpNa**	205	43
V_C	1,50	1,43	**JpK**	137	29
pH_C	6,80	6,64	**JHid_P**	200	237
CCl_C	3,20	2,88	**JAnCarb_Dif**	-1800	-1877
CNa_C	2,00	0,24	**JBic_P**	200	123
CK_C	40,00	42,12	**JHid_Na_Hem**	120	6
CBic_C	2,00	1,54	**JNa_Bic_Hem**	21	34
PNa_Hem	2850		**JCl_Bic_Hem**	44	30
PNa_Ep	150		**JCl_K_Ep**	14	3
PK_Hem	97914		**JAcFix_Cl_Hem**	-120	-120
PK_Ep	24479		**JBic_D**	-176	-127
PCl_Hem	2527420		**JNa_D**	65	3
PCl_Ep	1083180		**JK_D**	-123	-26
PBic_Hem	68404		**JCl_D**	-130	-113

Tabela 13. Parâmetros e fluxos da simulação do efeito do Amiloride no pH_i (Fluxos - 10^{-12} $mol.cm^{-2}.s^{-1}$; Concentrações - mM; VM-mV; V_C-$1.0^{e-3}cm^3/cm^2$; Permeabilidades - 10^9 $cm.s^{-1}$).

Discussão

Como referido, o modelo não pretende ser uma representação rigorosa do sistema que pretende simular. É sim uma ferramenta de análise cuja função principal é mostrar a coerência interna do modelo qualitativo proposto anteriormente.

A elaboração deste modelo só foi possível mediante a introdução de alguns transportadores de membrana cuja existência ainda não foi descrita no EEM. Assim, postulou-se a presença de canais específicos de Na^+, K^+ e HCO_3^- e de um trocador Ácidos não voláteis/Cl^- na membrana deste epitélio.

Fez-se uma série de simulações de protocolos verificados experimentalmente. Para cada caso, analisou-se não só a variação no parâmetro medido experimentalmente, como também a variação dos fluxos dos diversos transportadores.

Em todas as simulações realizadas foi possível reproduzir os resultados experimentais obtidos para o efeito de inibidores específicos de sistemas de transporte sobre a Ccc e o pH intracelular. Para que isso acontecesse foi necessário, em alguns casos, introduzir alterações em um ou mais parâmetros do estado de referência, o que pode dever-se a:

- incorrecção de uma ou mais das cinéticas escolhidas para definir os fluxos dos diferentes sistemas de transporte;
- indefinições no modelo por falta de dados experimentais que permitam determinar os parâmetros do estado de referência;
- variações das preparações utilizadas para obter os diferentes resultados experimentais utilizados nestas simulações.

Para cada uma das simulações realizadas, a análise dos resultados é consistente, ou seja, os resultados obtidos não foram determinados por valores implausíveis e muito menos impossíveis dos diferentes fluxos.

No nosso entender, as estimativas que neste momento carecem de qualquer explicação dizem respeito às constantes de tempo dos transitórios

O modelo está escrito de uma forma modular de modo a ser facilmente modificável. Permite, por isso, a simulação de uma série de situações experimentais distintas.

O modelo não inclui uma descrição dos movimentos de cálcio.

Como foi dito no capítulo 3, as observações resultantes dos trabalhos de Coimbra e col. (1988) e de Coimbra e col. (1992) permitem concluir que os iões cálcio atravessam passivamente as células do EEM. Em condições de curto-circuito e na ausência de um fluxo líquido transepitelial somos forçados a postular que o cálcio intracelular está em equilíbrio electroquímico com o cálcio externo. Isso implica que, para um potencial intracelular de cerca de – 40 mV, a concentração de cálcio intracelular é cerca de 20 vezes superior à concentração externa, o que contraria o conceito geralmente aceite de que as concentrações intracelulares de cálcio são pelo menos três ordens de grandeza inferiores às externas. Tratando-se de um ponto altamente controverso, considerou-se que seria prudente aguardar as observações que estão a ser feitas com sondas fluorescentes, que contudo, até ao presente confirmam as conclusões acima expostas.

Anexo

Fluxos e parâmetros celulares do estádio estacionário

		Valores	Unidades
Afinidades	KNa_C	2,0 e^{-7}	$mol.cm^{-3}$
	KHid_C	1,585 e^{-10}	$mol.cm^{-3}$
	KK_Hem	1,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
	KAnCarb	6,0 e^{-6}	$mol.cm^{-3}$
Permeabilidades	P_Na	3 e^{-6}	$cm.s^{-1}$
	P_K	8,5 e^{-5}	$cm.s^{-1}$
	P_Cl	3,5 e^{-3}	$cm.s^{-1}$
	P_Bic	3,3 e^{-4}	$cm.s^{-1}$
Volume celular	V_C0	1,5 e^{-3}	$cm^3.cm^{-2}$
Potencial de membrana	VM0	0,043	V
Fluxos	JAcNv_Cl_Hem0	-2,0 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JAnCarb0	2,0 e-9	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JAnCarb_Dif0	-5,8 e-9	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JBic_D0	-8,6 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JBic_P0	2,0 e-10	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JCl_Bic_Hem0	1,29 e-10	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JCl_D0	-1,25 e-10	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JCl_DifEp0	-3,7 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JCl_DifHem0	-8,7 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JCl_K_Ep0	1,0 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JHid_P0	2,0 e-10	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JK_D0	-8,6 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JK_DifEp0	-1,7 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JK_DifHem0	-6,9 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JNa_Bic_Hem0	1,4 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JNa_D0	109 e-12	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JNa_DifEp0	1,6 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JNa_DifHem0	9,3 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JpAcNv0	2,0 e-11	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JpK0	96 e-12	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$
	JpNa0	143 e-12	$mol.cm^{-2}.s^{-1}$

Tabela 14. Fluxos e parâmetros celulares do estado estacionário.

Equações do Modelo

STOPTIME=7500
DT = 1
TOLERANCE= 1.0E-18
DTOT=100
Minutos=TIME/60

{COMPOSIÇÃO DOS BANHOS - VALORES DE ESTADO ESTACIONÁRIO }

{HEMOLINFA - Hem}

COsm=57e-6
CNa_Hem=CBic_Hem+CCl_Hem+CAcNv_Hem - CK_Hem-2*CCa_Hem-2 *CMg_Hem
CK_Hem=7.0e-6
CCl_Hem=17.0e-6
CBic_Hem=10.0e-6
pH_Hem=10.4
PreW= 17.5
Henry_coef=0.03
pKa=9.35
CHid_Hem=3.9811e-11
COxid_Hem=KW/CHid_Hem
CAnCarb_Hem= 0.8913e-6
CMg_Hem=0.5e-6
CAcNv_Hem=1.0e-6
CCa_Hem=1.0e-6
PreAnCarb_Hem= ((CAnCarb_Hem/Henry_coef)/(760-17.5))*100

{LÍQUIDO EXTRAPALEAL - Ep}

CNa_Ep=CBic_Ep+CCl_Ep+CAcNv_Ep - CK_Ep-2*CCa_Ep-2*CMg_Ep
CK_Ep=CK_Hem
CCl_Ep=17.0e-6
CBic_Ep=10.0e-6
pH_Ep=10.4
CHid_Ep=3.9811e-11
pKa=9.35
CAnCarb_Ep= 0.8913e-6
CMg_Ep=0.5e-6
CAcNv_Ep=1.0e-6
CCa_Ep=1.0e-6
PreAnCarb_Ep= ((CAnCarb_Ep/Henry_coef)/(760-17.5))*100

```
{COMPARTIMENTO INTRACELULAR - C}

V_C0=1.5e-3
CMg_C=0.5e-6
CCa_C=2.0e-10
CNa_C0=2.0e-6
CK_C0=40.0e-6
CCl_C0=3.2e-6
COxid_C0=KW/CHid_C0
CHid_C0=1.585e-10
pH_C0=-LOG10(CHid_C0)
CAnCarb_C01=8.97e-7
CAcNv_C0=1.0e-6
CBic_C0=2e-6

{NERNST}

EK=26*logN(CK_C0/CK_Hem)
ECl=-26*logN(CCl_C0/CCl_Hem)

{CÁLCULO DAS QUANTIDADES TOTAIS NOS COMPARTIMENTOS}

QNa0 = V_C0*CNa_C0
QK0 = V_C0*CK_C0
QCl0= V_C0* CCl_C0
QAcNv0=CAcNv_C0*V_C0
QHid0=CHid_C0*V_C0
QOxid_C0= COxid_C0*V_C0
QAnCarbT0=V_C0*CAnCarbT_C0

{CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO DA ÁGUA}

KW=3.13e-20              {KW=H*OH}

{CONSTANTES INICIAIS IMPORTANTES}

{CONSTANTES ELÉCTRICAS}

Far=96500
R = 8.3105
T= 273+ TC
TC= 25
Factor= Far/(R*T)
```

{AFINIDADES}

KNa_C= 2.0e-7
KK_Hem=1.0e-6
KAnCarb=6.0e-6
KHid_C=CHid_C0

{DEFINIÇÃ0 DO ESTADO ESTACIONÁRIO: QUANTIDADES DERIVADAS}

{BICARBONATO e CO2}

QBic0=CBic_C0*V_C0
CAnCarbT_C0=CAnCarb_C01+ CBic_C0
CAnCarb_C0=(QAnCarbT0 - QBic0) /V_C0
CBic_Ceq=CAnCarb_C0*[10^-(pH_C0 - pKa)]

{RATIOS}

alfaP_Na = 0.85
alfaP_K = 0.8
alfaP_Cl = 0.7
alfaK= 0.9
alfaHNa = 0.1
alfaNaBic = 0.1
alfaAcNv = 0.1
alfaBic= 0.6

{PERMEABILIDADES}

P_Na=3.0e-6
PNa_Hem=alfaP_Na*P_Na
PNa_Ep = P_Na - PNa_Hem
PK_Hem=alfaP_K*P_K
PK_Ep=(1-alfaP_K)*P_K
PCl_Hem=P_Cl*alfaP_Cl*INIB_PCl_H
PCl_Ep=P_Cl*(1 -alfaP_Cl)

{FLUXOS INICIAIS}

JHid_P0=2.0e-10
JAnCarb=2.0E-10
JK_D0 = -alfaK* JpK0
JCl_K_Ep0 = (1 - alfaK) * JpK0
JHid_Na_Hem0 = alfaHNa*JHid_P0
JNa_Bic_Hem0 = alfaNaBic*JpNa0

```
JpK0 = (2/3) * JpNa0
JpNa0= (JNa_D0 + alfaHNa * JHid_P0)/(1 - alfaNaBic)
JpAcNv = alfaAcNv * JHid_P0
JAcNv_Cl_Hem0 = - JpAcNv
JBic_P0 = JHid_P0 + JHid_Na_Hem0 - JpAcNv
JCl_Bic_Hem0 = AlfaBic * (JBic_P0 + JNa_Bic_Hem0)
JBic_D0= - Bic_Rest + JCl_Bic_Hem0
JCl_D0= JCl_K_Ep0 + JNa_Bic_Hem0 - JpAcNv - JCl_Bic_Hem0
JAnCarb_Dif0 = -(JAnCarb -  JCl_Bic_Hem0 +JNa_Bic_Hem0 + JBic_D0)

{FLUXOS PARA IMPRESSÃO}

JK_D0_ = JK_D0 * 1.0E12
JCl_K_Ep0_ = JCl_K_Ep0 * 1.0E12
JHid_Na_Hem0_ = JHid_Na_Hem0 * 1.0E12
JNa_Bic_Hem0_ = JNa_Bic_Hem0 * 1.0E12
JpK0_ = JpK0 * 1.0E12
JpNa0_= JpNa0 * 1.0E12
JpAcNv_ = JpAcNv * 1.0E12
JAcNv_Cl_Hem0_ = JAcNv_Cl_Hem0 * 1.0E12
JBic_P0_ = JBic_P0 * 1.0E12
JCl_Bic_Hem0_ = JCl_Bic_Hem0 * 1.0E12
JBic_D0_= JBic_D0 * 1.0E12
JCl_D0_= JCl_D0 * 1.0E12
JAnCarb_Dif0_ = JAnCarb_Dif0 * 1.0E12

{PARÂMETROS}

P_AnCarb=JAnCarb_Dif0/GradAnCarb0
JBic_PM = JBic_P0/(Ka*CAnCarb_C0 - CBic_C0*CHid_C0 )
JAcNv_MM=JAcNv_Cl_Hem0/((CAcNv_Hem*CCl_C0-CAcNv_C0*CCl_Hem))
JHid_PM=JHid_P0/(CHid_C0/(CHid_C0+KHid_C))
JpNa_M=JpNa0/[(CNa_C0/(CNa_C0+KNa_C))^3 * (CK_Hem/(CK_Hem + KK_Hem))^2]
JHid_Na_HemM=JHid_Na_Hem0/(CNa_Hem*CHid_C0-CNa_C0*CHid_Hem)
JNa_Bic_HemM=(JNa_Bic_Hem0/(CNa_Hem*CBic_Hem*CCl_C0-
                                        CNa_C0*CBic_C0*CCl_Hem)) *INIB_PCl_H
JCl_Bic_HemM=JCl_Bic_Hem0/(CCl_Hem*CBic_C0 -CCl_C0*CBic_Hem)
JCl_K_EpM = JCl_K_Ep0/(CK_C0*CCl_C0 - CK_Ep*CCl_Ep)

{EQUAÇÕES  PARA T=0}

GradAnCarb0=(CAnCarB_Hem -CAnCarb_C0)
JHid_P01=JHid_PM*(CHid_C0/(CHid_C0+KHid_C))
JAnCarb_Dif01= P_AnCarb*GradAnCarb0
JpNa01=JPNa_M*Satur_0
```

```
JBic_P01 = JBic_PM*(Ka*CAnCarb_C0 - CBic_C0*CHid_C0)
JHid_Na_Hem01=JHid_Na_HemM*(CNa_Hem*CHid_C0-CNa_C0*CHid_Hem)
JNa_Bic_Hem01=JNa_Bic_HemM*(CNa_Hem*CBic_Hem*CCl_C0-
                                                    CNa_C0*CBic_C0*CCl_Hem)
JCl_Bic_Hem01=JCl_Bic_HemM*(CCl_Hem*CBic_C0 -CCl_C0*CBic_Hem)
JCl_K_Ep01 = JCl_K_EpM*(CK_C0*CCl_C0-CK_Ep*CCl_Ep)
JAcNv_Cl_Hem01=JAcNv_MM*(CAcNv_Hem*CCl_C0-CAcNv_C0*CCl_Hem)

{FLUXOS DIFUSIONAIS}

P_K=JK_D0/(GoldHem0*GradKHem0)
P_Cl=JCl_D0/(GoldHem0Cl*GradClHem0)
PBic_Hem=(JBic_D0/(GoldHem0Cl*GradBicHem0))*INIB_PCl_H

EHem0= Factor * VM0
EPHem0=Exp(EHem0)
EEp0=-EHem0
EPEp0=Exp(EEp0)
EHem0Cl= -Factor * VM0
EPHem0Cl=Exp(EHem0Cl)
EEp0Cl=- EHem0Cl
EPEp0Cl=Exp(EEp0Cl)

GoldHem0=IF abs(EHem0) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE EHem0/  (EPHem0-1)
GoldHem0Cl= IF abs(EHem0Cl) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE  EHem0Cl/(EPHem0Cl-1)
GoldEp0= IF abs(EEp0) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE EEp0/(EPEp0-1)
GoldEp0Cl= IF abs(EEp0Cl) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE EEp0Cl/(EPEp0Cl-1)

GradNaHem0=(CNa_Hem*EPHem0-CNa_C0)
GradKHem0=(CK_Hem*EPHem0-CK_C0)
GradClHem0=(CCl_Hem*EPHem0Cl-CCl_C0)
GradBicHem0=(CBic_Hem*EPHem0Cl-CBic_C0)

GradNaEp0=(CNa_C0*EPEp0-CNa_Ep)
GradKEp0=(CK_C0*EPEp0-CK_Ep)
GradClEp0=(CCl_C0*EPEp0Cl-CCl_Ep)

JBic_D01 = PBic_Hem * (GoldHem0Cl*GradBicHem0)
JNa_DifHem0=PNa_Hem*GoldHem0*GradNaHem0
JK_DifHem0=PK_Hem*GoldHem0*GradKHem0
JCl_DifHem0=PCl_Hem*GoldHem0Cl*GradClHem0

JNa_DifEp0=PNa_Ep*GoldEp0*GradNaEp0
JK_DifEp0=PK_Ep*GoldEp0*GradKEp0
JCl_DifEp0=PCl_Ep*GoldEp0Cl*GradClEp0
```

```
JNa_D0=JNa_DifHem0 - JNa_DifEp0
JK_D01=JK_DifHem0 - JK_DifEp0
JCl_D01=JCl_DifHem0 - JCl_DifEp0

IBic0= -JBic_D0*Far
INa_Hem0=JNa_DifHem0*Far
IK_Hem0=JK_DifHem0*Far
ICl_Hem0=-JCl_DifHem0*Far

INa_Ep0=JNa_DifEp0*Far
IK_Ep0=JK_DifEp0*Far
ICl_Ep0=-JCl_DifEp0*Far

IHem0=INa_Hem0 + IK_Hem0+ICl_Hem0 + IBic0
IEp0= INa_Ep0 + IK_Ep0 + ICl_Ep0
ISC0=(IEp0+ JHid_P0*Far)*1.0e6

IT0=IHem0 - IEp0

IpNa0= -JpNa0 * Far/3
IpH0 = JHid_P0 * Far
INaBic0= JNa_Bic_Hem0 * Far

IPNa0_=IpNa0*1.0e6
IpH0_ =Jhid_P0 *Far*1.0e6
INaBic0_=JNa_Bic_Hem0 * Far*1.0e6
IBic0_= -JBic_D0*Far*1.0e6
INa_H_=INa_Hem0*1.0e6
IK_H_=IK_Hem0*1.0e6
ICl_H_=ICl_Hem0*1.0e6

INa_Ep0_=INa_Ep0*1.0e6
IK_Ep0_=IK_Ep0*1.0e6
ICl_Ep0_=ICl_Ep0*1.0e6

IHem0_=IHem0*1.0e6
IEp0_= IEp0*1.0e6

FVM0=(IpNa0 - IpH0 + INaBic0 + IT0)*Ganho
Ganho=1.0e16

VM0=0.043
```

```
{EQUAÇÕES DIFERENCIAIS}

d/dt (QNa )=-JpNa + JNa_D+  (JHid_Na_Hem + JNa_Bic_Hem)
d/dt (QK )=JpK + JK_D - JCl_K_Ep
d/dt (QAnCarbT )=JAnCarb-  JCl_Bic_Hem+JNa_Bic_Hem +JAnCarb_Dif + JBic_D
d/dt (QHidT )=JpAcNv - JHid_P  + JBic_P - JHid_Na_Hem
d/dt(QAcNv) =JpAcNv + JAcNv_Cl_Hem
d/dt(QBic) = JBic_P +JNa_Bic_Hem-JCl_Bic_hem + JBic_D

INIT QNa= QNa0
INIT QK= QK0
INIT QAnCarbT= QAnCarbT0
INIT QHidT= QHidT0
INIT QAcNv= QAcNv0
INIT QBic= QBic0

{CÁLCULO DO POTENCIAL INTRACELULAR}

FVM=(IpNa - IpH + INaBic + IT)*Ganho

Vit=0.03
GUESS VM = Vit
ROOTS VM =FVM
LIMIT VM>=0
LIMIT VM<=.2


{CÁLCULO DA QUANTIDADE INTRACELULAR DE PROTÕES LIVRES}

CHid_C=QHid/V_C
QOxid_C= COxid_C*V_C

FHH=(QHidT - QHId - ( 2*Qprot -QProt_eq))*1e11
GUESS QHid = QHid0
ROOTS QHid = FHH
LIMIT QHid >= 1.0e-14
LIMIT QHid <= 1.0e-11

{CÁLCULO das QUANTIDADES de PROTEÍNAS E DE TAMPÃO INTRACELULAR}

QOsm_C0 = V_C0 * COsm
CAT0=CNa_C0+CK_C0+ CHid_C0
AN0= CBic_C0+CCl_C0+ COxid_C0+CAcNv_C0
```

```
CProt_mol0=COsm - CAT0 - AN0
QProt_mol = CProt_mol0 * V_C0
QProt_eq0 = V_C0 * (CAT0 - AN0)
FunProt0=(1+TANH(slope*(PH_C0-9.75)))
QProt= QProt_eq0/FunProt0
FunProt= (1+TANH(slope*(PH_C-9.75)))
QProt_eq= QProt * FunProt
QCl0=QNa0+QK0+QHid0-QAcNv0-COxid_C0*V_C-QProt_eq0-QBic0
QHidT0=QHid0+ ( 2*Qprot -QProt_eq0)
QCl=QNa+QK+QHid-QAcNv-COxid_C*V_C-QProt_eq-QBic
slope=0.7

CAT=CNa_C+CK_C+ CHid_C
AN= CBic_C+CCl_C+ COxid_C+CAcNv_C
IaoT= CAT + AN

QIaoT= QNa+QK+QCl+QBic+QAcNv + QHid +QOxid_C
QOsm_C=QProt_mol+ QIaoT

{CÁLCULO DE V_C}

FVC=(V_C - QOsm_C/COsm)*ganho
ROOTTOL=1.0e-10
GUESS V_C = 1.2e-3
ROOTS V_C = FVC
LIMIT V_C >= 0.5e-4
LIMIT V_C <= 3.0e-2

{CÁLCULO DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO CORRENTES}

CCl_C=QCl/V_C
CNa_C = QNa/V_C
CK_C =QK/V_C
pH_C=-LOG10(CHid_C)
COxid_C=KW/CHid_C
CAcNv_C=QAcNv/V_C
CHid_C = QHid/V_C
CBic_C = QBic/V_C
CAnCarb_C = (QAnCarbT - QBic)/V_C
CProt_eq = QProt_eq/V_C
CAnCarbT_C =QAnCarbT/V_C
```

{EQUAÇÕES DE ACTUALIZAÇÃO PARA T>0}

JpNa=JpNa_M*[(CNa_C/(CNa_C+KNa_C))^3*(CK_Hem/(CK_Hem+KK_Hem))^2]*INIB_JpNa
JpK=JpNa*2/3
JHid_P=(JHid_PM*(CHid_C/(CHid_C+KHid_C)))*INIB_JHidP
JAnCarb_Dif= P_AnCarb*(CAnCarB_Hem -CAnCarb_C)
JBic_P = JBic_PM*(Ka*CAnCarb_C - CBic_C*CHid_C)*INIB_JBic_P
JHid_Na_Hem=JHid_Na_HemM*(CNa_Hem*CHid_C-CNa_C*CHid_Hem)*INIB_JHid_Na
JNa_Bic_Hem=JNa_Bic_HemM*(CNa_Hem*CBic_Hem*CCl_C-CNa_C*CBic_C*CCl_Hem)
*INIB_JNa_Bic
JCl_Bic_Hem=JCl_Bic_HemM*(CCl_Hem*CBic_C -CCl_C*CBic_Hem)*INIB_JCl_Bic
JCl_K_Ep = JCl_K_EpM*(CK_C*CCl_C-CK_Ep*CCl_Ep)*INIB_JCl_K
JAcNv_Cl_Hem=JAcNv_MM*(CAcNv_Hem*CCl_C-CAcNv_C*CCl_Hem)*INIB_JAcNv_Cl

{FLUXOS DIFUSIONAIS}

EHem= Factor * VM
EPHem=Exp(EHem)
EEp=-EHem
EPEp=Exp(EEp)
EHemCl= -Factor * VM
EPHemCl=Exp(EHemCl)
EEpCl=- EHemCl
EPEpCl=Exp(EEpCl)

GoldHem=IF abs(EHem) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE EHem/(EPHem-1)
GoldHemCl= IF abs(EHemCl) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE EHemCl/(EPHemCl-1)
GoldEp= IF abs(EEp) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE EEp/(EPEp- 1)
GoldEpCl= IF abs(EEpCl) < 1.0e-12 THEN 1 ELSE EEpCl/ (EPEpCl-1)

GradNaHem=(CNa_Hem*EPHem-CNa_C)
GradKHem=(CK_Hem*EPHem-CK_C)
GradClHem=(CCl_Hem*EPHemCl-CCl_C)
GradBicHem=(CBic_Hem*EPHemCl-CBic_C)

GradNaEp=(CNa_C*EPEp-CNa_Ep)
GradKEp=(CK_C*EPEp-CK_Ep)
GradClEp=(CCl_C*EPEpCl-CCl_Ep)

JBic_D = PBic_Hem * (GoldHemCl*GradBicHem)
JNa_DifHem=PNa_Hem*GoldHem*GradNaHem*INIB_PNa_Hem
JK_DifHem=PK_Hem*GoldHem*GradKHem
JCl_DifHem=PCl_Hem*GoldHemCl*GradClHem

```
JNa_DifEp=PNa_Ep*GoldEp*GradNaEp
JK_DifEp=PK_Ep*GoldEp*GradKEp
JCl_DifEp=PCl_Ep*GoldEpCl*GradClEp

JNa_D=JNa_DifHem - JNa_DifEp
JK_D=JK_DifHem - JK_DifEp
JCl_D=JCl_DifHem - JCl_DifEp

IBic= -JBic_D*Far
INa_Hem=JNa_DifHem*Far
IK_Hem=JK_DifHem*Far
ICl_Hem=-JCl_DifHem*Far

INa_Ep=JNa_DifEp*Far
IK_Ep=JK_DifEp*Far
ICl_Ep=-JCl_DifEp*Far

IHem=INa_Hem + IK_Hem+ICl_Hem + IBic
IEp=  INa_Ep + IK_Ep + ICl_Ep
ISC=(IEp+ JHid_P*Far)*1.0e6

IT=IHem - IEp
IpNa= -JpNa * Far/3
IpH = JHid_P * Far
INaBic= JNa_Bic_Hem * Far

IPNa_=IpNa*1.0e6
IpH_ =Jhid_P *Far*1.0e6
INaBic_=JNa_Bic_Hem * Far*1.0e6
IBic_= -JBic_D*Far*1.0e6
INa_H_=INa_Hem*1.0e6
IK_H_=IK_Hem*1.0e6
ICl_H_=ICl_Hem*1.0e6

INa_Ep_=INa_Ep*1.0e6
IK_Ep_=IK_Ep*1.0e6
ICl_Ep_=ICl_Ep*1.0e6

IHem_=IHem*1.0e6
IEp_=  IEp*1.0e6

{BALANÇOS INICIAIS PARA VERIFICAÇÃO DO PROGRAMA}

BNa0 =-JpNa0 + JNa_D0+  JHid_Na_Hem0 + JNa_Bic_Hem0
BK0 =JpK0 + JK_D0 - JCl_K_Ep0
```

```
BAnCarbT0 =JAnCarb - JCl_Bic_Hem0 +JNa_Bic_Hem0 +JAnCarb_Dif0 + JBic_D0
BHid0 =JpAcNv - JHid_P0  + JBic_P0 - JHid_Na_Hem0
BAcNv0  = JpAcNv + JAcNv_Cl_Hem0
BBic0 = JBic_P0 + JNa_Bic_Hem0 - JCl_Bic_Hem0 + JBic_D0
BCl0 = JCl_K_Ep0 + JNa_Bic_Hem0 + JAcNv_Cl_Hem0 - JCl_D0- JCl_Bic_Hem0

{BALANÇOS RECALCULADOS PARA VERIFICAÇÃO DO PROGRAMA}

BNa01 =-JpNa01 + JNa_D0+  JHid_Na_Hem01 + JNa_Bic_Hem01
BK01 =JpK0 + JK_D0 - JCl_K_Ep01
BAnCarbT01 =JAnCarb - JCl_Bic_Hem01 +JNa_Bic_Hem01 +JAnCarb_Dif01 + JBic_D01
BHid01 =JpAcNv - JHid_P01  + JBic_P01 - JHid_Na_Hem01
BAcNv01  = JpAcNv + JAcNv_Cl_Hem01
BBic01 = JBic_P01 + JNa_Bic_Hem01 - JCl_Bic_Hem01 + JBic_D01
BCl01 = JCl_K_Ep01 + JNa_Bic_Hem01 + JAcNv_Cl_Hem01 - JCl_D01- JCl_Bic_Hem01

{BALANÇOS CORRENTES PARA VERIFICAÇÃO DO PROGRAMA}

BNa =-JpNa + JNa_D+  JHid_Na_Hem + JNa_Bic_Hem
BK =JpK + JK_D - JCl_K_Ep
BAnCarbT =JAnCarb - JCl_Bic_Hem +JNa_Bic_Hem +JAnCarb_Dif + JBic_D
BHid =JpAcNv - JHid_P  + JBic_P - JHid_Na_Hem
BAcNv  = JpAcNv + JAcNv_Cl_Hem
BBic = JBic_P + JNa_Bic_Hem - JCl_Bic_Hem + JBic_D
BCl = JCl_K_Ep + JNa_Bic_Hem + JAcNv_Cl_Hem - JCl_D- JCl_Bic_Hem

{PERTURBAÇÕES}

Start_JHidP=100
Val_JHidP=0
Rise=10
Alisar1 = 1- Exp (-Atraso_JHidP/Rise)
Atraso_JHidP=(TIME- START_JHidP)*STEP(Val_JHidP,start_JHidP)
INIB_JHidP= 1-STEP(Val_JHidP,start_JHidP)*Alisar1

Start_JpNa=100
Val_JpNa=0
Rise=10
Alisar2 = 1- EXp (-Atraso_JpNa/Rise)
Atraso_JpNa=(TIME- START_JpNa)*STEP(Val_JpNa,start_JpNa)
INIB_JpNa= 1-STEP(Val_JpNa,start_JpNa)*Alisar2

Start_JBic_P=100
Val_JBic_P=0
Rise=10
```

```
Alisar3 = 1- EXp (-Atraso_JBic_P/Rise)
Atraso_JBic_P=(TIME- START_JBic_P)*STEP(Val_JBic_P,start_JBic_P)
INIB_JBic_P= 1-STEP(Val_JBic_P,start_JBic_P)*Alisar3


Start_JHid_Na=100
Val_JHid_Na=0
Rise=10
Alisar4 = 1- EXp (-Atraso_JHid_Na/Rise)
Atraso_JHid_Na=(TIME- START_JHid_Na)*STEP(Val_JHid_Na,start_JHid_Na)
INIB_JHid_Na= 1-STEP(Val_JHid_Na,start_JHid_Na)*Alisar4

Start_JNa_Bic=100
Val_JNa_Bic=0
Rise=10
Alisar5 = 1- EXp (-Atraso_JNa_Bic/Rise)
Atraso_JNa_Bic=(TIME- START_JNa_Bic)*STEP(Val_JNa_Bic,start_JNa_Bic)
INIB_JNa_Bic= 1-STEP(Val_JNa_Bic,start_JNa_Bic)*Alisar5

Start_JCl_Bic=100
Val_JCl_Bic=0
Rise=10
Alisar6 = 1- EXp (-Atraso_JCl_Bic/Rise)
Atraso_JCl_Bic=(TIME- START_JCl_Bic)*STEP(Val_JCl_Bic,start_JCl_Bic)
INIB_JCl_Bic= 1-STEP(Val_JCl_Bic,start_JCl_Bic)*Alisar6

Start_JCl_K=100
Val_JCl_K=0
Rise=10
Alisar7 = 1- EXp (-Atraso_JCl_K/Rise)
Atraso_JCl_K=(TIME- START_JCl_K)*STEP(Val_JCl_K,start_JCl_K)
INIB_JCl_K= 1-STEP(Val_JCl_K,start_JCl_K)*Alisar7

Start_JAcNv_Cl=100
Val_JAcNv_Cl=0
Rise=10
Alisar8 = 1- EXp (-Atraso_JAcNv_Cl/Rise)
Atraso_JAcNv_Cl=(TIME- START_JAcNv_Cl)*STEP(Val_JAcNv_Cl,start_JAcNv_Cl)
INIB_JAcNv_Cl= 1-STEP(Val_JAcNv_Cl,start_JAcNv_Cl)*Alisar8

Start_PNa_Hem=100
Val_PNa_Hem=0
Rise=10
Alisar9 = 1- EXp (-Atraso_PNa_Hem/Rise)
Atraso_PNa_Hem=(TIME- Start_PNa_Hem)*STEP(Val_PNa_Hem,start_PNa_Hem)
```

```
INIB_PNa_Hem= 1-STEP(Val_PNa_Hem,start_PNa_Hem)*Alisar9

Start_PCl_H=100
Val_PCl_H=0
Rise=10
Alisar11 = 1- Exp (-Atraso_PCl_H/Rise)
Atraso_PCl_H=(TIME- START_PCl_H)*STEP(Val_PCl_H,start_PCl_H)
INIB_PCl_H= 1-STEP(Val_PCl_H,start_PCl_H)*Alisar11

{VALORES PARA IMPRESSÃO}

VM_=VM*1.0e3
V_C_=V_C*1.0e3
ISC_R=ISC/ISC0

{CONCENTRAÇÕES}

CNa_C0_ =CNa_C0*1.0e6
CK_C0_ =CK_C0*1.0e6
CCl_C0_ =CCl_C0*1.0e6
COxid_C0_ =COxid_C0*1.0e6
CHid_C0_ =CHid_C0*1.0e6
pH_C0_ =pH_C0 - 3.0
CAnCarb_C0_ =CAnCarb_C0*1.0e6
CAcNv_C0_ =CAcNv_C0*1.0e6
CBic_C0_ =CBic_C0*1.0e6
CProt_mol0_ =CProt_mol0*1.0e6
CProt_eq0_ = QProt_eq0*1.0e6/V_C0
CNa_O=CNa_Hem*1.0e6
CK_O=CK_Hem*1.0e6
CCl_O=CCl_Hem*1.0e6
CBic_O=CBic_Hem*1.0e6


{FACTORES}

alfaP_Na_ =alfaP_Na
alfaP_K_ = alfaP_K
alfaP_Cl_ = alfaP_Cl
alfaK_ = alfaK
alfaHNa_ = alfaHNa
alfaNaBic_ = alfaNaBic
alfaAcNv_ = alfaAcNv
alfaBic_= alfaBic
```

```
{FLUXOS}

JpNa_=JPNa * 1.0E12
JpK_=Jpk * 1.0E12
JHid_P_=JHid_P* 1.0E12
JAnCarb_Dif_= jAnCarb_Dif* 1.0E12
JBic_P_ = JBic_P* 1.0E12
JHid_Na_Hem_ =JHid_Na_Hem* 1.0E12
JNa_Bic_Hem_ =JNa_Bic_Hem* 1.0E12
JCl_Bic_Hem_ =JCl_Bic_Hem* 1.0E12
JCl_K_Ep_ = JCl_K_Ep* 1.0E12
JAcNv_Cl_Hem_=JAcNv_Cl_Hem* 1.0E12

{FLUXOS DIFUSIONAIS}

JBic_D_ = JBic_D* 1.0E12
JNa_D_=JNa_D* 1.0E12
JK_D_=JK_D* 1.0E12
JCl_D_=JCl_D* 1.0E12

JNa_D_Ep=JNa_DifEp* 1.0E12
JK_D_Ep=JK_DifEp* 1.0E12
JCl_D_Ep=JCl_DifEp* 1.0E12

JNa_D_Hem=JNa_DifHem* 1.0E12
JK_D_Hem=JK_DifHem* 1.0E12
JCl_D_Hem=JCl_DifHem* 1.0E12

{CORRENTES}

IPNa_=IpNa*1.0e6
IpH_ =JHid_P *Far*1.0e6
INaBic_=JNa_Bic_Hem * Far*1.0e6
IBic_= -JBic_D*Far*1.0e6
INa_H_=INa_Hem*1.0e6
IK_H_=IK_Hem*1.0e6
ICl_H_=ICl_Hem*1.0e6
INa_Ep_=INa_Ep*1.0e6
IK_Ep_=IK_Ep*1.0e6
ICl_Ep_=ICl_Ep*1.0e6
IHem_=IHem*1.0e6
IEp_= IEp*1.0e6
```

{PERMEABILIDADES}

P_Na_=P_Na*1.0E9
PNa_Hem_ =PNa_Hem*1.0E9
PNa_Ep_ = PNa_Ep*1.0E9
PK_Hem_ =PK_Hem*1.0E9
PK_Ep_ =PK_Ep*1.0E9
PCl_Hem_ =PCl_Hem*1.0E9
PCl_Ep_ =PCl_Ep*1.0E9
PBic_Hem_ =PBic_Hem*1.0E9

Significado dos símbolos utilizados

(1) a notação **0** (ex. AN0) é utilizada para representar o fluxo ou parâmetro no estado estacionário (de referência)

(2) a notação **01** (ex. CBic_C01) é utilizada para representar o fluxo ou parâmetro no estado estacionário recalculado para verificação do modelo

AN	soma das concentrações intracelulares dos aniões
CAcNv_C	concentração intracelular de ácidos não voláteis
CAcNv_Hem/Ep	concentração de ácidos não voláteis na hemolinfa/LEP
CAnCarb_C	concentração intracelular de anidrido carbónico
CAnCarb_Hem/Ep	concentração de anidrido carbónico na hemolinfa/LEP
CAnCarbT_C	concentração intracelular de anidrido carbónico total
CAT	soma das concentrações intracelulares dos catiões
CBic_C	concentração intracelular de ião bicarbonato
CBic_Hem/Ep	concentração de ião bicarbonato na hemolinfa/LEP
CCa_C	concentração intracelular de ião cálcio
CCa_Hem/Ep	concentração de ião cálcio na hemolinfa/LEP
CCl_C	concentração intracelular de ião cloro
CCl_Hem/Ep	concentração de ião cloro na hemolinfa/LEP
CHid_C	concentração intracelular de hidrogenião
CHid_Hem/Ep	concentração de hidrogenião na hemolinfa/LEP
CK_C	concentração intracelular de ião potássio
CK_Hem/Ep	concentração de ião potássio na hemolinfa/LEP
CMg_C	concentração intracelular de ião magnésio
CMg_Hem/Ep	concentração de ião magnésio na hemolinfa/LEP
CNa_C	concentração intracelular de ião sódio
CNa_Hem/Ep	concentração de ião sódio na hemolinfa/LEP
COsm	osmolaridade dos fluidos considerados
COxid_C	concentração intracelular de hidroxilião
COxid_Hem/Ep	concentração de hidroxilião na hemolinfa/LEP
CProt_eq	concentração intracelular de proteínas ionizadas (carga -1)
CProt_mol	concentração intracelular de proteínas totais

exp	função exponencial
f	função
Far	constante de Faraday (96500 $C.mol^{-1}$)
GradAnCarb	gradiente de anidrido carbónico entre a hemolinfa e citosol
GradBicHem	gradiente de ião bicarbonato entre a hemolinfa e citosol
GradClEp	gradiente de ião cloro entre o citosol e o LEP
GradClHem	gradiente de ião cloro entre a hemolinfa e citosol
GradKEp	gradiente de ião potássio entre o citosol e o LEP
GradKHem	gradiente de ião potássio entre a hemolinfa e citosol
GradNaEp	gradiente de ião sódio entre o citosol e o LEP
GradNaHem	gradiente de ião sódio entre a hemolinfa e citosol
IaoT	soma das concentrações intracelulares de todos os iões
IBic	corrente difusional de ião bicarbonato através da membrana basolateral
ICl_Ep	corrente difusional de ião cloro através da membrana apical
ICl_Hem	corrente difusional de ião cloro através da membrana basolateral
IEp	soma das correntes iónicas difusionais na membrana apical
IHem	soma das correntes iónicas difusionais na membrana basolateral
IK_Ep	corrente difusional de ião potássio através da membrana apical
IK_Hem	corrente difusional de ião potássio através da membrana basolateral
INa_Ep	corrente difusional de ião sódio através da membrana apical
INa_Hem	corrente difusional de ião sódio através da membrana basolateral
INaBic	corrente iónica devida ao transportador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$
IpH	corrente iónica devida à bomba de H^+
IpNa	corrente iónica devida à bomba de Na^+/K^+
ISC	corrente iónica total através do EEM
IT	soma das correntes iónicas difusionais através da célula
JAcNv_Cl_Hem	fluxo de ác. não voláteis devido ao trocador Ácidos Fixos/Cl^-
JAcNv_MM	taxa máxima de transporte do trocador Ácidos Fixos/Cl^-
JAnCarb	produção metabólica de anidrido carbónico
JAnCarb_Dif	fluxo difusional total de anidrido carbónico
JBic_D	fluxo difusional de ião bicarbonato
JBic_P	produção de ião bicarbonato pela Anidrase Carbónica

JBic_PM	taxa máxima de produção de ião bicarbonato pela Anidrase Carbónica
JCl_Bic_Hem	fluxo de ião cloro devido ao trocador HCO_3^-/Cl^-
JCl_Bic_HemM	taxa máxima de transporte do trocador HCO_3^-/Cl^-
JCl_D	fluxo difusional transcelular de ião cloro
JCl_DifEp	fluxo difusional de ião cloro pela membrana apical
JCl_DifHem	fluxo difusional de ião cloro pela membrana basolateral
JCl_K_Ep	fluxo de ião cloro devido ao transportador K^+/Cl^-
JCl_K_EpM	taxa máxima de transporte do transportador K^+/Cl^-
JHid_Na_Hem	fluxo de ião sódio devido ao trocador H^+/Na^+
JHid_Na_HemM	taxa máxima de transporte do trocador H^+/Na^+
JHid_P	fluxo de iões H^+ devido à bomba de H^+
JHid_PM	taxa máxima de transporte da bomba de H^+
JK_D	fluxo difusional transcelular de ião potássio
JK_DifEp	fluxo difusional de ião potássio pela membrana apical
JK_DifHem	fluxo difusional de ião potássio pela membrana basolateral
JNa_Bic_Hem	fluxo de ião sódio devido ao transportador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$
JNa_Bic_HemM	taxa máxima de transporte do transportador $Na^+/HCO_3^-/Cl^-$
JNa_D	fluxo difusional transcelular de ião sódio
JNa_DifEp	fluxo difusional de ião sódio pela membrana apical
JNa_DifHem	fluxo difusional de ião sódio pela membrana basolateral
JpAcNv	produção metabólica de ác. não voláteis
JpK	fluxo de ião K^+ devido à bomba de Na^+/K^+
JpNa	fluxo de ião Na^+ devido à bomba de Na^+/K^+
JpNaM	taxa máxima de transporte da bomba de Na^+/K^+
KAnCarb	afinidade da anidrase carbónica para o CO_2
KHid_C	afinidade da bomba de protões para o ião H^+
KK_Hem	afinidade da bomba de Na^+/K^+ para o ião K^+
KNa_C	afinidade da bomba de Na^+/K^+ para o ião Na^+
KW	constante de dissociação de H_2O
P_AnCarb	permeabilidade da célula ao anidrido carbónico
PBic_Hem	permeabilidade da membrana basolateral ao ião bicarbonato
P_Cl	permeabilidade da célula ao ião cloro

P_K	permeabilidade da célula ao ião potássio
P_Na	permeabilidade da célula ao ião sódio
PCl_Ep	permeabilidade da membrana apical ao ião cloro
PCl_Hem	permeabilidade da membrana basolateral ao ião cloro
pH_C	pH do fluido intracelular
pH_Hem/Ep	pH da hemolinfa/LEP
PK_Ep	permeabilidade da membrana apical ao ião potássio
PK_Hem	permeabilidade da membrana basolateral ao ião potássio
pKa	6,35
PNa_Ep	permeabilidade da membrana apical ao ião sódio
PNa_Hem	permeabilidade da membrana basolateral ao ião sódio
PreAnCarb_Hem/Ep	pressão vapor de anidrido carbónico na hemolinfa/LEP
PreW	pressão vapor de H_2O
QAcNv	quantidade intracelular de ácidos não voláteis
QAnCarbT	quantidade intracelular de anidrido carbónico total
QBic	quantidade intracelular de ião bicarbonato
QCl	quantidade intracelular de ião cloro
QHid	quantidade intracelular de ião H^+
QHidT	quantidade intracelular total de ião H^+
QIaoT	quantidade intracelular total de iões
QK	quantidade intracelular de ião cloro
QNa	quantidade intracelular de ião sódio
QOsm_C	quantidade intracelular total de partículas osmoticamente activas
QOxid_C	quantidade intracelular de hidroxiliões
QProt	quantidade intracelular de proteínas totais
QProt_eq	quantidade intracelular de proteínas ionizadas (carga -1)
QProt_mol	quantidade intracelular de proteínas totais
R	constante dos gases perfeitos
T	temperatura em k
TC	temperatura em °C
V_C	volume celular
VM	potencial de membrana

7. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos tirar as seguintes conclusões sobre algumas parâmetros e mecanismos de transporte das células do EEM:

1. A concentração intracelular de cálcio livre é superior a 0,3 mM.
2. O Mn^{2+} intracelular é suficientemente elevado para interferir nas medições da $[Ca^{2+}]_i$ realizadas com as sondas Fura-2 e Mag-fura-5.
3. A $[Ca^{2+}]$ intracelular, medida com a sonda Fura-2 na presença de uma concentração intracelular elevada de Mn^{2+}, é sensível a alterações da concentração extracelular desse ião. A $[Ca^{2+}]_i$ aumenta quando o valor da concentração extracelular desse ião aumenta, diminuindo quando o valor extracelular diminui.
4. O pH intracelular é 6,8±0,1, medido na presença de HEPES 10 mM.
5. Os inibidores específicos das V-ATPases, Bafilomicina A_1 e Concanamicina A, provocam uma diminuição do pH_i. A inibição do transporte de H^+ será directamente responsável pelo aumento da concentração intracelular desse ião. O efeito da Bafilomicina A_1 (10 μM) no pH_i é mais acentuado ($\Delta pH = 0,17$) e mais rápido (15 s) do que o efeito da Concanamicina (10 μM) ($\Delta pH = 0,11$, 100 seg). Resultados semelhantes foram observados quando se estudou o efeito daqueles inibidores na Ccc.
6. O Amiloride provoca uma diminuição do pH_i para 6,58±0,01. A inibição do trocador Na^+/H^+ ou de canais específicos de Na^+ poderão ser responsáveis pela diminuição do pHi.
7. O pH intracelular é sensível a alterações na $[Ca^{2+}]$ extracelular, diminuindo para 6,35±0,06 quando a concentração varia de 1 para 0 mM e aumentando para 6,93±0,01 quando a concentração varia de 1 para 6 mM. O efeito da variação da $[Ca^{2+}]$ extracelular é, em ambos os casos, rapidamente revertido quando a concentração de $[Ca^{2+}]$ extracelular desse ião volta a 1 mM.
8. A alteração do pH_i provocada pela variação da concentração de Ca^{2+} no meio extracelular permite explicar o aumento da Ccc quando se diminui o cálcio extracelular e a sua diminuição em situação contrária. É o aumento ou diminuição da concentração de H^+ intracelular que estimula ou inibe a bomba electrogénica de protões.
9. A medição do pH_i na presença de Amiloride e alteração simultânea da $[Ca^{2+}]$ extracelular (0 ou 1 mM), não nos permite concluir se as alterações no pH_i são mediadas pelos mesmos mecanismos.

10. A adição de bicarbonato ao meio de perfusão não altera o valor controlo do pH intracelular apesar de se verificar uma acidificação inicial, rapidamente compensada.
11. Não foi possível obter uma sobrecarga ácida em células isoladas do EEM após a sua perfusão com NH_4Cl. Este efeito pode ser atribuído a uma permeabilidade celular baixa ao ião NH_4^+ ou a um tempo de incubação insuficiente.
12. A actividade da V-ATPase, medida em homogeneizados de EEM, apresenta um valor máximo de 4,6±1,1 μmol Pi/mg proteína/hora para um pH de 7,4, uma concentração de ATP de 4,5-6 mM e uma temperatura de 27°C.
13. A presença do ião sulfito (200 mM) aumenta a actividade da bomba de H^+ em cerca de 20 vezes. O poder redutor deste ião deverá ser responsável por esse efeito, através de um mecanismo que poderá estar igualmente envolvido na regulação de actividade da bomba *in vivo*.
14. A Bafilomicina A_1 (10 μM) e a Concanamicina A (10 μM), dois inibidores específicos das ATPases do tipo V, inibem 40 a 50 % da actividade total da ATPásica presente no homogenato do EEM.
15. A dose de Bafilomicina A_1 necessária para obter uma inibição máxima da actividade da V-ATPase é de 10 μM e a IC_{50} é de 14 nmoles.mg^{-1} proteína.
16. A dose de Concanamicina A necessária para obter uma inibição máxima da V-ATPase é de 10 μM e a IC_{50} é de 8 nmoles.mg^{-1} de proteína.
17. A dose de Bafilomicina A_1 necessária para obter uma inibição máxima da Ccc é de 0,5 μM e a dose necessária para obter um efeito semi-máximo é de 0,17 μM..
18. A dose de Concanamicina A necessária para obter uma inibição máxima da Ccc é de 5 μM e a dose necessária para obter um efeito semi-máximo é de 0,7 μM.
19. O DCCD (100 μM) inibe a V-ATPase de um modo não específico. Nas condições experimentais utilizadas, não foi observada inibição desta bomba pela NEM, nem pelo ião nitrato. Estes inibidores deverão actuar por um mecanismo susceptível à presença do ião sulfito.
20. A Bafilomicina A_1 (10 μM) mesmo após 2 horas de actuação não inibe a Ccc quando adicionada ao lado basolateral da preparação. Este resultado parece indicar que este inibidor, na concentração usada, não inibe a bomba de Na^+/K^+ (P-ATPase) presente na membrana basolateral deste epitélio.
21. Os resultados de voltagem controlada obtidos por Coimbra (1988), Rebelo da Costa (1993), Barrias (2003) e os resultados obtidos (capítulo 4) serviram de base

para a elaboração de um modelo matemático do sistema (capítulo 6). Em todas as simulações realizadas foi possível reproduzir os resultados experimentais obtidos para o efeito de inibidores específicos de sistemas de transporte sobre a Ccc e o pH intracelular.

22. A simulação matemática do efeito do Amiloride sobre a Ccc e o pH_i só foi possível assumindo a inibição do trocador Na^+/H^+, descrita por Coimbra e col. (1988) e de canais específicos de Na^+, ainda não descritos neste epitélio.
23. A simulação matemática do efeito do DIDS e SITS na Ccc só foi possível assumindo a inibição dos sistemas de transporte de bicarbonato descritos (Barrias 2003, Coimbra 1988) e de canais específicos de Cl^-, descritos por Barrias (2003).
24. A análise dos resultados do modelo matemático permite-nos sugerir a existência de canais específicos de sódio, potássio e bicarbonato e de um trocador de ácidos voláteis/Cl^- na membrana das células de EEM. A sua localização e propriedades terão ainda que ser esclarecidas.

8. Abreviaturas

[ ] – concentração

$[\ ]_i$ – concentração intracelular

$[\ ]_o$ – concentração extracelular

(aq) – estado aquoso

(s) – estado sólido

λem – comprimento de onda de emissão

λexc – comprimento de onda de excitação

∅ – diâmetro

ABS – albumina bovina sérica

APS – ácido picrilsulfónico

AM – acetoximetil

BCECF – 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5- carboxifluoresceína

Ccc – corrente de curto-circuito

Cps – contagens por segundo

DCCD – Diciclohexilcarbodiimida

DIDS – ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-dissulfónico

DMSO – dimetilsulfóxido

DTT – ditiotreitol

ECM – epitélio cavitário do manto

EEM – epitélio externo do manto

EGTA – ácido etileno-glicol-bis-(ß-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético de sódio

e.p.m. – erro padrão da média

e col. – e colaboradores

g – aceleração da gravidade

HEPES – ácido-4-(2-hidroxietetilo)-1-piperazinetanossulfónico

Hem – hemolinfa

IC_{50} – dose de efeito semi-máximo

Kd – constante de dissociação

LEP – liquido extrapaleal

MES – ácido morfolino-etanossulfónico

NEM – N-etilmaleimida

n – número de amostras

PAR – parâmetro

pH_i – pH intracelular

P_i – fósforo inorgânico, permeabilidade iónica

RA1Ca – ringer Anodonta 1 Ca^{2+}

RA0Ca – ringer Anodonta 0 Ca^{2+}

RA6Ca – ringer Anodonta 6 Ca^{2+}

RBic – ringer Bicarbonato

rpm – rotações por minuto

SITS – ácido 4-acetamida-4-isotiocianostilbeno-2,2'-dissulfónico

T – temperatura absoluta

TCA – ácido tricloroacético

TBTO – tributiltinóxido

TPEN – tetrakis-(2-piridilmetil)etilenodiamina

Voc – potencial em circuito aberto

9. Bibliografia

Ahearn G, Duerr J, Zhuang Z, Brown R, Aslamkhan A, Killebrew D. Ion transport processes of crustacean epithelial cells. Physiol. Biochem. Zool. 1999; 72: 1-18.

Ahearn G, Zhuang Z, Duerr J, Pennington V. Role of the invertebrate electrogenic 2Na+/1H+ antiporter in monovalent and divalent cation transport. J. Exp. Biol. 1994; 196: 319-335.

Ahearn GA, Clay LP. Kinetic analysis of electrogenic 2 Na+-1 H+ antiport in crustacean hepatopancreas. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 1989; 257: R484-493.

Ahearn GA, Franco P. Sodium and calcium share the electrogenic 2 Na(+)-1 H+ antiporter in crustacean antennal glands. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 1990; 259: F758-767.

Aickin C. Movement of acid equivalents across the mammalian smooth muscle cell membrane. Ciba Found. Symp. 1988; 139: 3-22.

Akins R, Tuan R. Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane. I. Isolation and characterization of chorionic ectoderm cells. J. Cell Sci. 1993a; 105: 369-379.

Akins R, Tuan R. Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane. II. Compartmentalization of calcium during uptake. J. Cell Sci. 1993b; 105: 381-388.

Aldridge DC. The Morphology, Growth and Reproduction of Unionidae (Bivalvia) in a Fenland Waterway. J. Mollus. Stud. 1999; 65: 47-60.

Arai H, Berne M, Forgac M. Inhibition of the coated vesicle proton pump and labeling of a 17,000- dalton polypeptide by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. J. Biol. Chem. 1987; 262: 11006-11011.

Arslan P, Di Virgilio F, Beltrame M, Tsien R, Pozzan T. Cytosolic Ca2+ homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca2+. J. Biol. Chem. 1985; 260: 2719-2727.

Ashe JR, Jr, Carter B, Thomas W, Kerr W. Diamox, a carbonic anhydrase inhibitor, as an oral diuretic in pregnancy. Obstet. Gynecol. 1956; 7: 242-248.

Barrias C. Biomineralização: mecanismos celulares e moleculares de calcificação. ICBAS: Universidade do Porto, 2003.

Bawden J. Calcium transport during mineralization. Anat. Rec. 1989; 224: 226-33.

Becker W, Marxen J, Epple M, Reelsen O. Influence of microgravity on crystal formation in biomineralization. J. Appl. Physiol. 2000; 89: 1601-7.

Beedham G. Observations on the mantle of Lamellibranchia. Quarterly Journal of Microscopical Science 1958; 99: 181-97.

Beirão P. Sodium and Calcium- Dependent Mechanisms in the Action Potential of a Secretory Epithelium of a Clam Mantle. J. Exp. Biol. 1989; 145: 395-402.

Benos D, Saccomani G, Sariban-Sohraby S. The epithelial sodium channel. Subunit number and location of the amiloride binding site. J. Biol. Chem. 1987; 262: 10613-10618.

Bevelander G, Nakahara H. Correlation of lysosomal activity and ingestion by the mantle epithelium. Biol. Bull. 1966; 131: 76-82.

Bicho A, Ferreira H, Ferreira K. Chloride channels in the eel intestine. J. Exp. Biol. 1999; 202: 39-46.

Bielefeld U, Zierold K, Kortje K, Becker W. Calcium localization in the shell-forming tissue of the freshwater snail, Biomphalaria glabrata: a comparative study of various methods for localizing calcium. Histochem. J. 1992; 24: 927-38.

Blair H. How the osteoclast degrades bone. Bioessays 1998; 20: 837-46.

Blair H, Teitelbaum S, Tan H, Schlesinger P. Reversible inhibition of osteoclastic activity by bone-bound gallium (III). J. Cell Biochem. 1992; 48: 401-10.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. Physiol. Rev. 1999; 79: 763-854.

Bleher R, Machado J. Examination of the paracellular pathway of the outer mantle epithelium of Anodonta cygnea. Braz. J. Morphol. Sci. 2000; 17.

Boer H, Witteveen J. Ultrastructural localization of carbonic anhydrase in tissues involved in shell formation and ionic regulation in the pond snail Lymnaea stagnalis. Cell Tissue Res. 1980; 209: 383-90.

Boron W. Sodium-coupled bicarbonate transporters. JOP 2001; 2: 176-81.

Boron W, Boulpaep E. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO3- transport. J. Gen. Physiol. 1983; 81: 53-94.

Boron W, De Weer P. Active proton transport stimulated by CO2/HCO3-, blocked by cyanide. Nature 1976; 259: 240-1.

Boron W, Fong P, Hediger M, Boulpaep E, Romero M. The electrogenic Na/HCO3 cotransporter. Wien Klin Wochenschr 1997; 109: 445-56.

Boron WF. Intracellular pH transients in giant barnacle muscle fibers. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1977; 233: C61-73.

Boron WF, McCormick WC, Roos A. pH regulation in barnacle muscle fibers: dependence on extracellular sodium and bicarbonate. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1981; 240: C80-89.

Bowman B, Dschida W, Harris T, Bowman E. The vacuolar ATPase of Neurospora crassa contains an F1-like structure. J. Biol. Chem. 1989; 264: 15606-15612.

Bowman E, Bowman B. Identification and properties of an ATPase in vacuolar membranes of Neurospora crassa. J. Bacteriol. 1982; 151: 1326-37.

Boyarsky G, Ganz MB, Sterzel RB, Boron WF. pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na+-dependent and -independent Cl(-)-HCO3- exchangers. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1988; 255: C857-869.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976; 72: 248-54.

Bronner F. Renal calcium transport: mechanisms and regulation--an overview. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 1989; 257: F707-711.

Bronner F. Calcium Absorption - A Paradigm for Mineral Absorption. J. Nutr. 1998; 128: 917-920.

Cabantchik ZI, Greger R. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1992; 262: C803-827.

Capuano P, Capasso G. The importance of intracellular pH in the regulation of cell function. G. Ital. Nefrol. 2003; 20: 139-50.

Cheng P, Pritzker K. Inhibition of calcium pyrophosphate dihydrate crystal formation: effects of carboxylate ions. Calcif. Tissue. Int. 1988; 42: 46-52.

Coimbra A, Fernandes P, Ferreira K, Ferreira H. Intracellular calcium in the cells of the outer mantle epithelium of Anodonta cygnea. Comp. Biochem. Physiol. A 1992; 103: 497-500.

Coimbra A, Ferreira K, Fernandes P, Ferreira H. Calcium exchanges in Anodonta cygnea: barriers and driving gradients. J. Comp. Physiol. B 1993; 163: 196-202.

Coimbra J, Machado J, Fernandes P, Ferreira H, Ferreira K. Electrophysiology of the mantle of Anodonta cygnea. J. Exp. Biol. 1988; 140: 65-88.

Counillon L, Pouyssegur J. The Expanding Family of Eucaryotic Na+/H+ Exchangers. J. Biol. Chem. 2000; 275: 1-4.

Dacke CG, Arkle S, Cook DJ, Wormstone IM, Jones S, Zaidi M, Bascal ZA. Medullary bone and avian calcium regulation. J. Exp. Biol. 1993; 184: 63-88.

Deitmer J, Schlue W. An inwardly directed electrogenic sodium-bicarbonate co-transport in leech glial cells. J. Physiol. 1989; 411: 179-194.

Delaissé J, Eeckhout Y, Neff L, Francois-Gillet C, Henriet P, Su Y, G V, Baron R. (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. J Cell Sci 1993; 106: 1071-82.

Delaissé J, Vaes G. Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone degradation. In: Rifkin B and Gay C, editors. Biology and physiology of the osteoclast. Boca Raton: CRC Press, 1992: 259-88.

Dick GM, Kong ID, Sanders KM. Effects of anion channel antagonists in canine colonic myocytes: comparative pharmacology of Cl-, Ca2+ and K+ currents. Br. J. Pharmacol. 1999; 127: 1819-1831.

Dietz T. Ionic Regulation in Freshwater Mussels: a Brief Review. American Malacological Bulletin 1985; 2: 233-242.

Dong Z, Saikumar P, Griess G, Weinberg J, Venkatachalam M. Intracellular Ca2+ thresholds that determine survival or death of energy-deprived cells. Am. J. Pathol. 1998; 152: 231-240.

Drose S, Altendorf K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. J. Exp. Biol. 1997; 200: 1-8.

Dschida WJA, Bowman BJ. The Vacuolar ATPase: Sulfite Stabilization and the Mechanism of Nitrate Inactivation. J. Biol. Chem. 1995; 270: 1557-1563.

Duerr J, Ahearn G. Characterization of a basolateral electroneutral Na+/H+ antiporter in Atlantic lobster (Homarus americanus) hepatopancreatic epithelial vesicles. J. Exp. Biol. 1996; 199: 643-651.

Ehrenfeld J, Garcia-Romeu F, Harvey B. Electrogenic active proton pump in Rana esculenta skin and its role in sodium ion transport. J. Physiol. 1985; 359: 331-355.

Ehrenfeld J, Klein U. The key role of the H+ V-ATPase in acid-base balance and Na+ transport processes in frog skin. J. Exp. Biol. 1997; 200: 247-256.

Ellington WR. Studies of Intracellular pH Regulation in Cardiac Myocytes From the Marine Bivalve Mollusk, Mercenaria campechiensis. Biol. Bull. 1993; 184: 209-215.

Enns T, Hill EP. CO2 diffusing capacity in isolated dog lung lobes and the role of carbonic anhydrase. J. Appl. Physiol. 1983; 54: 483-490.

Feher JJ, Fullmer CS, Wasserman RH. Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1992; 262: C517-526.

Feng Y, Forgac M. Inhibition of vacuolar H(+)-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. J. Biol. Chem. 1994; 269: 13224-13230.

Fernandes P, Ferreira H. A mathematical model of rabbit cortical thick ascending limb of the Henle's loop. Biochim. Biophys. Acta 1991; 1064: 111-23.

Fillingame R. Coupling H+ transport and ATP synthesis in F1F0-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. J. Exp. Biol. 1997; 200: 217-224.

Flik G, Schoenmakers T, Groot J, van Os C, Wendelaar Bonga S. Calcium absorption by fish intestine: the involvement of ATP- and sodium-dependent calcium extrusion mechanisms. J Membr Biol 1990; 113: 13-22.

Folbergrova J, MacMillan V, Siesjo B. The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH-NAD+ ratio of the rat brain. J. Neurochem. 1972; 19: 2497-2505.

Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H+)-ATPases. FEBS Lett. 1998; 440: 258-63.

Forgac M. Structure and Properties of the Vacuolar (H+)-ATPases. J. Biol. Chem. 1999; 274: 12951-4.

Fossat B, Porthe-Nibelle J, Pedersen S, Lahlou B. Na+/H+ exchange and osmotic shrinkage in isolated trout hepatocytes. J. Exp. Biol. 1997; 200: 2369-2376.

Furimsky M, Moon T, Perry S. Evidence for the role of a Na(+)/HCO(3)(-) cotransporter in trout hepatocyte pHi regulation. J. Exp. Biol. 2000; 203: 2201-2208.

Grassl S, Holohan P, Ross C. Cl(-)-HCO3- exchange in rat renal basolateral membrane vesicles. Biochim Biophys Acta 1987; 905: 475-84.

Green J, Kleeman CR. Role of calcium and cAMP messenger systems in intracellular pH regulation of osteoblastic cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1992; 262: C111-121.

Greenaway P, Farrelly C. Trans-epidermal transport and storage of calcium in *Holthuisana transversa* (Brachyura; Sundathelphusidae) during premoult. Acta Zoologica (Stockholm) 1991; 72: 29-40.

Grinstein S, Smith J. Asymmetry of the Na+/H+ antiport of dog red cell ghosts. Sidedness of inhibition by amiloride. J. Biol. Chem. 1987; 262: 9088-9092.

Gruber G, Wieczorek H, Harvey W, Muller V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. J. Exp. Biol. 2001; 204: 2597-605.

Guyton A, Hall J. Textbook of Medical Physiology: W B Saunders, 2000.

Harvey B. Energization of sodium absorption by the H+-ATPase pump in mitochondria-rich cells of frog skin. J. Exp. Biol. 1992a; 172: 289-309.

Harvey W. Physiology of V-ATPases. J. Exp. Biol. 1992b; 172: 1-17.

Hasse B, Ehrenberg H, Marxen J, Becker W, Epple M. Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail Biomphalaria glabrata. Chem. Eur. J. 2000; 6: 3679-85.

Hattan S, Laue T, Chasteen N. Purification and Characterization of a Novel Calcium-binding Protein from the Extrapallial Fluid of the Mollusc, Mytilus edulis. J. Biol. Chem. 2001; 276: 4461-4468.

Heming T, Traber D, Hinder F, Bidani A. Effects of bafilomycin A1 on cytosolic pH of sheep alveolar and peritoneal macrophages: evaluation of the pH-regulatory role of plasma membrane V-ATPases. J. Exp. Biol. 1995; 198: 1711-1715.

Hogan E, Cohen M, Boron W. K(+)- and HCO3(-)-dependent acid-base transport in squid giant axons. I. Base efflux. J. Gen. Physiol. 1995; 106: 821-844.

Hogg R, Wang Q, Large W. Effects of Cl channel blockers on Ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. Br. J. Pharmacol. 1994; 111: 1333-1341.

Holm L, Berg C, Brunstrom B, Ridderstrale Y, Brandt I. Disrupted carbonic anhydrase distribution in the avian shell gland following in ovo exposure to estrogen. Arch. Toxicol. 2001; 75: 362-8.

Hudson R. Ion transport by the isolated mantle epithelium of the freshwater clam, Unio complanatus. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 1992; 263: R76-83.

Hudson R. Bafilomycin-sensitive acid secretion by mantle epithelium of the freshwater clam, Unio complanatus. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 1993; 264: R946-951.

Husted R, Cohen L, Steinmetz P. Pathways for bicarbonate transfer across the serosal membrane of turtle urinary bladder: studies with a disulfonic stilbene. J. Membr. Biol. 1979; 47: 27-37.

Im W, Sih J, Blakeman D, McGrath J. Omeprazole, a specific inhibitor of gastric (H+-K+)-ATPase, is a H+- activated oxidizing agent of sulfhydryl groups. J. Biol. Chem. 1985; 260: 4591-4597.

Jaisser F, Beggah AT. The nongastric H+-K+-ATPases: molecular and functional properties. Am J Physiol Renal Physiol 1999; 276: F812-824.

Jensen BL, Skott O. Blockade of chloride channels by DIDS stimulates renin release and inhibits contraction of afferent arterioles. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 1996; 270: F718-727.

Johnson J, Epel D. Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation. Nature 1976; 262: 661-4.

Jones R, Davis W. Calcium-containing lysosomes in the outer mantle epithelial cells of Amblema, a fresh-water mollusc. Anat. Rec 1982; 203: 337-43.

Kadar E, Salanki J, Jugdaohsingh R, Powell J, McCrohan C, White K. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve Anodonta cygnea. Aquat. Toxicol. 2001; 55: 137-48.

Kadar E, Salanki J, Powell J, White K, McCrohan C. Effect of sub-lethal concentrations of aluminium on the filtration activity of the freshwater mussel Anodonta cygnea L. at neutral pH. Acta Biol. Hung. 2002; 53: 485-93.

Kettenmann H, Schlue W. Intracellular pH regulation in cultured mouse oligodendrocytes. J. Physiol. 1988; 406: 147-162.

Kinoshita T, Nishimura M, Shimazaki K. Cytosolic Concentration of Ca2+ Regulates the Plasma Membrane H+-ATPase in Guard Cells of Fava Bean. Plant Cell 1995; 7: 1333-1342.

Kirshner N. Uptake of Catecholamines by a Particulate Fraction of the Adrenal Medulla. J. Biol. Chem. 1962; 237: 2311-2317.

Klein U, Timme M, Zeiske W, Ehrenfeld J. The H+ pump in frog skin (Rana esculenta): identification and localization of a V-ATPase. J. Membr. Biol. 1997; 157: 117-26.

Kopito R, Lodish H. Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. Nature 1985; 316: 234-8.

Kyozuka K, Deguchi R, Yoshida N, Yamashita M. Change in intracellular Ca2+ is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve Crassostrea gigas. Dev. Biol. 1997; 182: 33-41.

Lagadic-Gossmann D, Buckler K, Vaughan-Jones R. Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. J. Physiol. 1992; 458: 361-384.

Lakowicz J. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Nova Iorque: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 1999.

Lee Y, Sayeed M, Wurster R. Intracellular Ca2+ mediates the cytotoxicity induced by bepridil and benzamil in human brain tumor cells. Cancer Lett. 1995; 88: 87-91.

Lees RL, Heersche JNM. Differences in regulation of pHi in large (>= 10 nuclei) and small (<= 5 nuclei) osteoclasts. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2000; 279: C751-761.

Li J, Duncan R, Burr D, Turner C. L-type calcium channels mediate mechanically induced bone formation in vivo. J. Bone Miner. Res. 2002; 17: 1795-800.

Linton S, O'Donnell M. Contributions of K+:Cl- cotransport and Na+/K+-ATPase to basolateral ion transport in malpighian tubules of Drosophila melanogaster. J. Exp. Biol. 1999; 202: 1561-1570.

Liu Q, Kane PM, Newman PR, Forgac M. Site-directed Mutagenesis of the Yeast V-ATPase B Subunit (Vma2p). J. Biol. Chem. 1996; 271: 2018-2022.

Lowenstam H, Weiner S. On Biomineralization: Oxford University Press, 1989.

Ludens J, Fanestil D. Acidification of urine by the isolated urinary bladder of the toad. Am J Physiol -- Legacy Content 1972; 223: 1338-1344.

Machado J, Castilho F, Coimbra J, Monteiro E, Sa C, Reis M. Ultrastructural and cytochemical studies in the mantle of Anodonta cygnea. Tissue & Cell 1988a; 20: 797-807.

Machado J, Ferreira K, Ferreira H, Coimbra J. Substrate activation of the short-circuit current of the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea*. Comp. Biochem. Physiol. A 1988b; 91: 487-492.

Machado J, Ferreira K, Ferreira H, Fernandes P. The acid-base balance of the outer mantle epithelium of Anodonta cygnea. J. Exp. Biol. 1990; 150: 159-69.

Madshus I, Olsnes S. Selective inhibition of sodium-linked and sodium-independent bicarbonate/chloride antiport in Vero cells. J. Biol. Chem. 1987; 262: 7486-7491.

Mahnensmith R, Aronson P. Interrelationships among quinidine, amiloride, and lithium as inhibitors of the renal Na+-H+ exchanger. J. Biol. Chem. 1985; 260: 12586-12592.

Mann S. Biomineralization: Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry: Oxford University Press, 2001.

Marin F, Corstjens P, de Gaulejac B, de Vrind-De Jong E, Westbroek P. Mucins and Molluscan Calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel Pinna nobilis (Bivalvia, Pteriomorphia). J Biol Chem 2000; 275: 20667-20675.

Martinez-Zaguilan R, Lynch R, Martinez G, Gillies R. Vacuolar-type H+-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1993; 265: 1015-29.

Marxen JC, Becker W. Calcium binding constituients of the organic shell matrix from the freshwater snail Biomphalaria glabrata. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2000; 127: 235-42.

Marxen JC, Hammer M, Gehrke T, Becker W. Carbohydrates of the Organic Shell Matrix and the Shell-Forming Tissue of the Snail Biomphalaria glabrata (Say). Biol. Bull. 1998; 194: 231-240.

Mason NP, Petersen M, Melot C, Imanow B, Matveykine O, Gautier M-T, Sarybaev A, Aldashev A, Mirrakhimov MM, Brown BH, Leathard AD, Naeije R. Serial changes in nasal potential difference and lung electrical impedance tomography at high altitude. J. Appl. Physiol. 2003; 94: 2043-2050.

Massaubau J, Burtin B, Wheathly M. How is O2 consumption maintained independent of ambient oxygen in mussel Anodonta cygnea? Respir. Physiol. 1991; 83: 103-113.

McCabe Jr M, Jiang S, Orrenius S. Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes. Lab. Invest. 1993; 69: 101-10.

Moser H, Mair N, Fresser F. Extracellular Ca2+ and its effect on acid extrusion in the crayfish stretch receptor neurone. J. Exp. Biol. 1996; 199: 1781-1789.

MP_1. Acetoxymethil (AM) and Acetate Esters: Molecular Probes, 2002: 1-2.

MP_2. Calcium Calibrating Buffer Kits - Product Information: Molecular Probes, 2002: 1-4.

MP_3. Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators - Product Information: Molecular Probes, 2003: 1-6.

MP_4. Fluorescent Magnesium Indicators - Product Information: Molecular Probes, 2003: 1-4.

MP_5. Pluronic ® F-127. 2003: 1-2.

Murer H, Hopfer U, Kinne R. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. Biochem. J. 1976; 154: 597-604.

Nagy I. Adenosine phosphate concentrations and carbohydrate consumption in the tissues of Anodonta cygnea L. (Mollusca, Pelecypoda) under normal and anoxic conditions. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 1973; 8: 143-51.

Nelson N. Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles. J. Exp. Biol. 1992; 172: 149-153.

Nelson N, Harvey WR. Vacuolar and Plasma Membrane Proton-Adenosinetriphosphatases. Physiol. Rev. 1999; 79: 361-385.

Njus D, Radda G. Bioenergetic processes in chromaffin granules a new perspective on some old problems. Biochim. Biophys. Acta 1978; 463: 219-44.

Nordström T, Rotstein OD, Romanek R, Asotra S, Heersche JNM, Manolson MF, Brisseau GF, Grinstein S. Regulation of Cytoplasmic pH in Osteoclasts. J. Biol. Chem. 1995; 270: 2203-2212.

Orchard C, Boyett M, Fry C, Hunter M. The use of electrodes to study cellular Ca2+ metabolism. In: McCormack J and Cobold P, editors. Cellular Calcium. Oxford: IRL Press, 1991: 83-114.

Orrenius S, Nicotera P. The calcium ion and cell death. J. Neural Transm. Suppl. 1994; 43: 1-11.

Ortmann C, Grieshaber MK. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam Corbicula fluminea. J. Exp. Biol. 2003; 206: 4167-4178.

Pace CS, Tarvin JT, Smith JS. Stimulus-secretion coupling in beta-cells: modulation by pH. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 1983; 244: E3-18.

Paddle B. A cytoplasmic component of pyridine nucleotide fluorescence in rat diaphragm: evidence from comparisons with flavoprotein fluorescence. Pflugers Arch. 1985; 404: 326-31.

Pedersen P, Carafoli E. Ion motive ATPases. Ubiquity, properties and significance to cell function. TIBS 1987; 12: 146-50.

PTI. Fluorescence System User's Manual. 1997: 1-137.

Puscas I, Coltau M, Baican M, Domuta G, Hecht A. Calcium, carbonic anhydrase and gastric acid secretion. Physiol. Res. 2001; 50: 359-64.

Pynnonen K. Physiological responses to severe acid stress in four species of freshwater clams (unionidae). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1990; 19: 471-8.

Ravera O, Cenci R, Beone G, Dantas M, Lodigiani P. Trace element concentrations in freshwater mussels and macrophytes as related to those in their environment. J. Limnol. 2003; 62: 61-70.

Rebelo da Costa A. Movimentos de Cálcio em Anodonta cygnea. ICBAS: Universidade do Porto, 1994.

Rebelo da Costa A, Barrias C, Oliveira P, Ferreira H. The Na+-K+ ATPase in the outer mantle epithelium of Anodonta cygnea. Comp. Biochem. Physiol. A 1999a; 122: 337-340.

Rebelo da Costa A, Oliveira P, Barrias C, Ferreira H. Identification of a V-type ATPase in the Outer Mantle Epithelium of Anodonta cygnea. Comp. Biochem. Physiol. A 1999b; 123: 337-342.

Riffeser M, Hock B. Vitellogenin levels in mussel hemolymph--a suitable biomarker for the exposure to estrogens? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2002; 132: 75-84.

Rink T, Tsien R, Pozzan T. Cytoplasmic pH and free Mg2+ in lymphocytes. J. Cell Biol. 1982; 95: 189-196.

Ritchie C, Maercklein P, Fitzpatrick L. Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function: alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. Endocrinology 1994; 135: 996-1003.

Robillard S, Beauchamp G, Laulier M. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel Anodonta cygnea at three different exposure sites. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2003; 135: 49-59.

Roos A, Boron WF. Intracellular pH. Physiol. Rev. 1981; 61: 296-434.

Russell J, Boron W. Role of choloride transport in regulation of intracellular pH. Nature 1976; 264: 73-4.

Saliba KJ, Kirk K. pH Regulation in the Intracellular Malaria Parasite, Plasmodium falciparum. H+ extrusion via a V-type H+-ATPase. J. Biol. Chem. 1999; 274: 33213-33219.

Schlue W, Deitmer J. Ionic mechanisms of intracellular pH regulation in the nervous system. Ciba Found. Symp. 1988; 139: 47-69.

Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, Schoner W. Bovine Adrenals Contain, in Addition to Ouabain, a Second Inhibitor of the Sodium Pump. J. Biol. Chem. 1998; 273: 784-792.

Schoenmakers T, Verbost PM, Flik G, Wendelaar Bonga SE. Transcellular intestinal calcium transport in freshwater and seawater fish and its dependence on sodium/calcium exchange. J. Exp. Biol. 1993; 176: 195-206.

Shimizu T, Nakanishi T, Uemura S, Jarmakani JM. Effect of hypoxia on ouabain inhibition of sodium pump in newborn rabbit myocardium. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 1983; 244: H756-762.

Smith T, Herlihy J, Robinson S. The effect of the fluorescent probe, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. J. Biol. Chem. 1981; 256: 1108-1110.

Soleimani M, Hattabaugh Y, Bizal G. pH sensitivity of the Na+:HCO3- cotransporter in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit kidney cortex. J. Biol. Chem. 1992; 267: 18349-18355.

Soler A, Rota R, Hannaert P, Cragoe E, Jr, Garay R. Volume-dependent K+ and Cl- fluxes in rat thymocytes. J. Physiol. 1993; 465: 387-401.

Sotz E, Niederstatter H, Pelster B. Determinants of intracellular pH in gas gland cells of the swimbladder of the European eel Anguilla anguilla. J. Exp. Biol. 2002; 205: 1069-1075.

Steinmetz P, Andersen O. Electrogenic proton transport in epithelial membranes. J. Membr. Biol. 1982; 65: 155-74.

Stricker S, Centonze V, Paddock S, Schatten G. Confocal microscopy of fertilization-induced calcium dynamics in sea urchin eggs. Dev. Biol. 1992; 149: 370-80.

Sumner J-P, Dow JAT, Earley FGP, Klein U, Jäger D, Wieczorek H. Regulation of Plasma Membrane V-ATPase Activity by Dissociation of Peripheral Subunits. J. Biol. Chem. 1995; 270: 5649-5653.

Supek F, Supekova L, C B, Nelson H, Nelson N. Structure, function, and mutational analysis of V-ATPases. Ann. NY Acad. Sci. 1992; 671: 284-92.

Swallow C, Grinstein S, Rotstein O. A vacuolar type H(+)-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. J. Biol. Chem. 1990; 265: 7645-7654.

Takahashi A, Camacho P, Lechleiter J, Herman B. Measurement of Intracellular Calcium. Physiol. Rev. 1999; 79: 1089-1125.

Tambutte E, Allemand D, Mueller E, Jaubert J. A compartmental approach to the mechanism of calcification in hermatypic corals. J. Exp. Biol. 1996; 199: 1029-1041.

Thomas J. Intracellularly trapped pH indicators. Soc. Gen. Physiol. Ser. 1986; 40: 311-25.

Thomas R. The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones. J. Physiol. 1976; 255: 715-735.

Vagin O, Denevich S, Munson K, Sachs G. SCH28080, a K+-competitive inhibithor of the gastric H,K-ATPase, binds near the 5-6 luminal loop and prevents K+ access tp the ion site. Biophys. J. (Annual Meeting Abstracts) 2002; 82: 261c-.

van der Houwen J, Vaisami-Jones E. The application of calcium phosphate precipitation chemistry to phosphorus recovery: the influence of organic ligands. Environ. Technol. 2001; 22: 1325-35.

Van Slyke D, Sendroy J. Studies of Gas and Electrolyte Equilibria in Blood. J. Biol. Chem. 1928; 79: 739-819.

Wang C-Z, Yano H, Nagashima K, Seino S. The Na+-driven Cl-/HCO3- Exchanger. Cloning, tissue distribution, and functional characterization. J. Biol. Chem. 2000; 275: 35486-35490.

Wasserman R, Fullmer C. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. J. Nutr. 1995; 125: 1971S-1979S.

Wasserman R, Smith C, Brindak M, De Talamoni N, Fullmer C, Penniston J, Kumar R. Vitamin D and mineral deficiencies increase the plasma membrane calcium pump of chicken intestine. Gastroenterology 1992; 102: 886-94.

Wasserman R, Smith C, Smith C, Brindak M, Fullmer C, Krook L, Penniston J, Kumar R. Immunohistochemical localization of a calcium pump and calbindin-D28k in the oviduct of the laying hen. Histochemistry 1991; 96: 413-8.

Weber J, Senior A. Catalytic mechanism of F1-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 1997; 1319: 19-58.

Weiner S. Organization of extracellularly mineralized tissues: a comparative study of biological crystal growth. CRC Crit. Rev. Biochem. 1986; 20: 365-408.

Wheatly M, Pence R, Weil J. ATP-dependent calcium uptake into basolateral vesicles from transporting epithelia of intermolt crayfish. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 1999; 276: R566-574.

Wilbur K, Saleudin A. Shell formation in: The physiology of mollusca. Academic Press. Vol IV 1983; 236-79.

Williams D, Fay F. Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator Fura-2. Cell Calcium 1990; 11: 75-83.

Yamada H, Seki G, Taniguchi S, Uwatoko S, Nosaka K, Suzuki K, Kurokawa K. Roles of Ca2+ and PKC in regulation of acid/base transport in isolated proximal tubules. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 1996; 271: F1068-1076.

Yarbrough J, Merryman J, Barnhill M, Hahn K. Inhibitors of intracellular chloride regulation induce cisplatin resistance in canine osteosarcoma cells. In Vivo 1999; 13: 375-83.

Yip K-P, Tsuruoka S, Schwartz GJ, Kurtz I. Apical H+/base transporters mediating bicarbonate absorption and pHi regulation in the OMCD. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2002; 283: F1098-1104.

Zhang J, Feng Y, Forgac M. Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase. J. Biol. Chem. 1994; 269: 23518-23.

Zhuang Z, Duerr J, Ahearn G. Ca2+ and Zn2+ are transported by the electrogenic 2Na+/1H+ antiporter in echinoderm gastrointestinal epithelium. J. Exp. Biol. 1995; 198: 1207-1217.

Ziegler A. Ultrastructural evidence for transepithelial calcium transport in the anterior sternal epithelium of the terrestrial isopod Porcellio scaber (Crustacea) during the formation and resorption of CaCO3 deposits. Cell Tissue Res. 1996; 284: 459-66.

Agradecimentos

O realização do trabalho que conduziu à elaboração desta tese só foi possível devido ao apoio de muitas pessoas. A todas elas quero expressar o meu reconhecimento.

Quero agradecer especificamente a:

. Professora Doutora Augusta Rebelo da Costa, orientadora da minha tese de doutoramento;

. Professor Doutor Hugo Gil Ferreira;

. Professora Doutora Teresa Moura;

. Professora Doutor Ron Jacob;

. ao ICBAS;

. à Faculdade de Medicina Xavier Bichat, U.Paris, nas pessoas do Doutor Jacques Teulon e do Doutor Marc Paulais;

. ao LNIV - Delegação Norte, na pessoa do seu Director Doutour Azevedo Ramos;

. ao IBMC.