

OLIVIA BELOTO DA SILVA

**EFEITO DA GLICOSE SOBRE RECUPERAÇÃO DO pH
EM CÉLULAS HEK-293**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Fisiologia Humana
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.**

São Paulo

2008

RESUMO

BELOTO-SILVA, O. Efeito da glicose sobre a recuperação do pH_i em células HEK-293. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Os estudos foram realizados em cultura de células HEK-293 (human embryonic kidney cells). Por microscopia de fluorescência, avaliou-se a velocidade de recuperação do pH_i (dpH_i/dt). Por Western blot, avaliou-se a expressão de SGLTs e NHEs e a translocação dos SGLTs foi avaliada por imunofluorescência. **Resultados:** No controle, a dpH_i/dt foi de $0,169 \pm 0,020$ unid pH/min ($n = 6$). A glicose modula dose e tempo dependentemente a dpH_i/dt . O tratamento crônico aumentou esse parâmetro e somente Florizina (inibidor dos SGLTs), H-89 (inibidor da PKA) e BAPTA (quelante de Ca²⁺ intracelular – Ca²⁺i) reduziram esse efeito. O tratamento crônico induziu a internalização do SGLT1, manteve o SGLT2 no citosol e aumentou sua expressão. **Conclusões:** No tratamento crônico, a internalização do SGLT1 depende da PKA, independe de Ca²⁺i e a permanência do SGLT2 no citosol depende tanto da PKA quanto do Ca²⁺i. Assim, a distribuição celular do SGLT2 altera a atividade dos NHE's.

Palavras-chave: Glicose; Transporte através da Membrana; Trocador Na⁺/H⁺; Co-transportador Na⁺/Glicose; Células Epiteliais; pH intracelular.

ABSTRACT

BELOTO-SILVA, O. Effect of glucose on pH_i recovery rate in HEK-293 cells. 62 p. Master thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

In this work we used human embryonic kidney (HEK-293 cells). The pH_i recovery rate (dpH_i/dt) was evaluated through fluorescence microscopy. The expression of SGLT's and NHEs was analysed through Western blot and translocation of SGLTs was evaluated through Imunofluorescence. Results: In the control situation, the dpH_i/dt was $0,169 \pm 0,020$ units pH/min ($n = 6$). This parameter was modulated by glucose in a concentration and time dependent manner. Chronic treatment increased the dpH_i/dt and this stimulatory effect was inhibited by Phlorizin (SGLTs inhibitor), H-89 (PKA inhibitor) and BAPTA (intracellular Ca^{2+} cheleator - $Ca^{2+}i$). The chronic treatment induced internalization of SGLT1, increased the expression of SGLT2 and kept it in the cytosol. Conclusions: In chronic treatment, the internalization of SGLT1 involves a PKA-dependent and $Ca^{2+}i$ - independent mechanism. The maintenance of SGLT2 in the cytosol depends on PKA and $Ca^{2+}i$. Thus, the cellular distribution of SGLT2 is associated with NHEs activity.

Key words: Glucose; Membrane Transport; Na^+/H^+ exchanger; $Na^+/Glucose$ cotransporter; Epithelial Cells; intracellular pH.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

As células epiteliais por serem polarizadas, possuem propriedades de transporte da membrana plasmática voltada para uma das faces do epitélio (membrana luminal) diferentes das apresentadas pela membrana plasmática voltada para a face oposta (membrana basolateral). Exemplos claros de células com estas propriedades são as epiteliais do intestino delgado e do túbulo proximal renal.

A glicose é uma molécula osmoticamente ativa que entra nestas células por mecanismos de transporte ativos secundários. Basicamente, o influxo luminal de glicose é mediado por um sistema de co-transportadores $\text{Na}^+/\text{glicose}$, os quais contribuem para o aumento da concentração de glicose intracelular acima do valor de concentração extracelular desta substância. A força para concentrar glicose é derivada da soma de forças geradas pela diferença de potencial elétrico transmembrana e pelo gradiente químico para o Na^+ . Assim, o gradiente eletroquímico do Na^+ é, então, a energia requerida para aumentar a concentração de glicose intracelular para valores acima do seu equilíbrio difusional (DOMINGUEZ et al., 1989; SACKTOR et al., 1989; TUNE et al., 1971; ARONSON et al., 1975; KINNE et al., 1975). Parte da glicose é capaz de deixar as células pela membrana basolateral, por transporte facilitado. Além disso, a atividade da Na^+/K^+ -ATPase permite que a concentração intracelular de Na^+ permaneça baixa, mantendo o gradiente eletroquímico para o movimento desse íon da luz tubular para o interior da célula.

A captação de glicose nos diferentes tipos celulares pode ser modulada de acordo com as necessidades metabólicas. Estas respostas dependem da estimulação de transportadores preexistentes na membrana ou da inserção de novos transportadores de glicose na membrana plasmática (BERNE et al., 1998). Em condições normais, a concentração de glicose no plasma (glicemia) é de 4 a 5 mM (70–100 mg/dl). Estes valores são finamente ajustados por mecanismos regulados pelo hormônio insulina, entre outros.

Por possuir um diâmetro molecular de aproximadamente 0.7 nm e por não se ligar às proteínas plasmáticas, a glicose, nos rins, é livremente filtrada através da barreira de filtração na parede do capilar glomerular, aparecendo no Espaço de Bowman com a mesma concentração encontrada no plasma. O fato de normalmente quase não aparecer glicose na urina em condições normais indica que esta molécula é intensamente reabsorvida pelos

túbulos renais. Cerca de 98% da glicose filtrada é reabsorvida no túbulo proximal, principalmente em sua porção inicial (segmento S1). Entretanto, quando sua reabsorção proximal é dificultada (por expansão de volume ou diuréticos), os segmentos mais distais do néfron são capazes de reabsorver quase toda a glicose remanescente do túbulo proximal. Provavelmente, os locais de reabsorção mais tardia de glicose são a alça de Henle e o ducto coletor (AIRES et al., 2008).

1.2 Transportadores de Glicose no Rim

Morfologicamente, o túbulo proximal é dividido em três segmentos: 1, 2 e 3 (S1, S2 e S3) e nesta porção do néfron, a reabsorção de glicose ocorre por co-transportadores denominados “Sodium Glucose Transporters” (SGLTs), localizados na membrana apical da célula tubular.

Os SGLTs, são proteínas integrais de membrana, compostas por única subunidade, com cerca de 14 segmentos transmembrânicos (AIRES et al., 2008; HIRAYAMA et al., 2007; ZHAO et al., 2007). No S1, a glicose interage com a isoforma 2 ou SGLT2, que possui alta capacidade de transporte e cuja estequiometria é de 1:1 (1 Na^+ :1 Glicose). Esta estequiometria permite o aumento da concentração de glicose intracelular para valores acima dos encontrados no interstício (TUNE et al., 1971). No S3, a entrada de glicose na célula ocorre preferencialmente pelo SGLT1, com menor capacidade de transporte e estequiometria de 2:1 (2 Na^+ :1 Glicose). Neste segmento do túbulo proximal, a concentração de glicose luminal é baixa e o aumento da sua concentração intracelular é eficientemente gerado pela estequiometria do SGLT1, que dobra a força motriz para o transporte, ou seja, o gradiente eletroquímico do Na^+ (PESSIN, et al., 1992). Em vista disso, o transporte tubular luminal de glicose é chamado de processo ativo secundário (**Figura 1**).

Na **figura 1** observar-se que a saída de glicose da célula, em direção ao interstício, acontece por difusão facilitada, ou seja, através de transportadores de glicose (GLUT's), localizados na membrana basolateral. No S1 existe a isoforma 2, também conhecida como GLUT2 e no S3 a isoforma 1, ou GLUT1 (WOOD et al., 2003; BAINES et al., 2002).

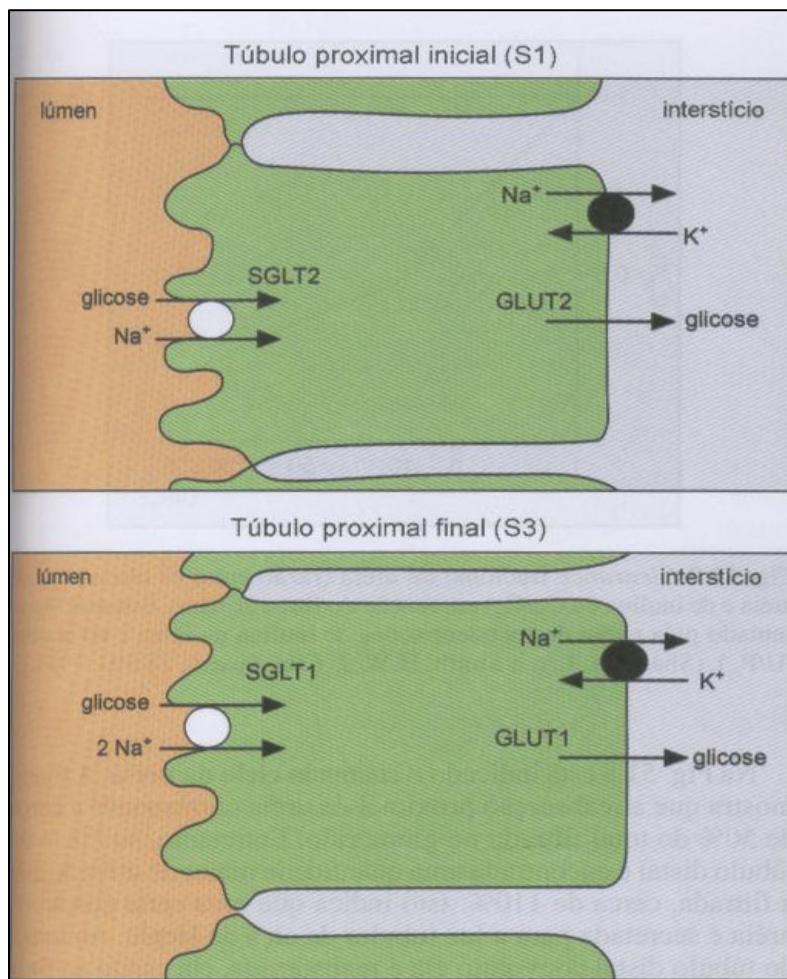


Figura 1. Esquema do transporte de glicose no néfron. Mecanismos de transporte de glicose no túbulo proximal inicial (Segmento 1 – S1) e mecanismos de transporte de glicose no túbulo proximal final (Segmento 3 – S3).

Fonte: Aires, M. M. et al., 2008, com permissão.

1.3 Trocador Na⁺/H⁺

A extrusão celular de H⁺ em troca por Na⁺ é um dos meios mais efetivos de eliminação do excesso de ácidos de células metabolicamente ativas. Esse processo considerado eletroneutro é mediado por uma família de trocadores Na⁺/H⁺ ou NHEs (ORLOWSKI et al., 1992). Quando o pH_i encontra-se próximo do valor neutro (pH = 7,0), o trocador apresenta baixa afinidade pelo H⁺ intracelular, funcionando em ritmo basal, apenas para manutenção do pH_i. No entanto, com aumento da concentração de H⁺ intracelular, o trocador é ativado, atingindo sua taxa máxima de transporte (AIRES et al., 2008).

Várias isoformas do trocador Na⁺/H⁺ já foram clonadas (NHE₁ – NHE₉) (SARDET et al., 1989; TSE et al., 1992; TSE et al., 1993; ORLOWSKI et al., 1992; WANG et al., 1993;

KLANKE et al., 1995; NUMATA et al., 2001; GOYAL et al., 2003). Essas diversas isoformas de NHE possuem similaridades quanto a porção N-terminal (10 a 12 segmentos transmembrânicos) e a porção C-terminal (**Figura 2**).

A porção C-terminal dos NHEs é importante na modulação do transporte iônico por interagir com diversos agentes (fatores de crescimento, hormônios e alterações osmóticas). Além disso, este domínio possui sítios de fosforilação para várias proteínas quinases, tais como proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA). A PKC fosforila praticamente todas as isoformas do trocador Na^+/H^+ , enquanto a PKA, parece fosforilar apenas as isoformas NHE1 e NHE3 (WAKABAYASHI et al., 1992; SALAMANCA et al., 2005). Além disso, o NHE1 apresenta 2 sítios de ligação para o complexo cálcio-calmodulina (WAKABAYASHI et al., 1994; BERTRAND et al., 1994; IKEDA et al., 1994). Segundo Wakabayashi et al. (1994), o sítio de alta afinidade (**sítio A**), quando ligado a este complexo, é estimulador do trocador. Por outro lado, o sítio de baixa afinidade (**sítio B**) somente liga-se ao complexo cálcio-calmodulina quando o cálcio citosólico encontra-se em alta concentração, podendo nesta condição, inibir o trocador.

Atualmente, sabe-se que a PKC faz parte de uma grande família de proteínas, com várias isoformas que apresentam características enzimológicas sutilmente individuais. A família PKC é atualmente classificada em 4 grupos (SALAMANCA et al., 2005): 1) convencionais (cPKCs) alfa beta e gama (α , β e γ , respectivamente) as quais são ativadas por Ca^{2+} , fosfatidilserina (PS) e diacilglicerol (DAG) ou éster de forbol; 2) novas (nPKCs) delta, epsilon, eta e teta (δ , ϵ , η e θ , respectivamente) as quais são ativadas por PS e DAG ou éster de forbol, mas são independentes de Ca^{2+} ; 3) atípicas (aPKCs) zeta, lambda e iota (ζ , λ e τ , respectivamente) as quais são independentes de Ca^{2+} e insensíveis ao DAG ou éster de forbol, mas são ativadas por PS.

No rim, as diferentes isoformas de PKC estão relacionadas com o controle hemodinâmico e de vários mecanismos de transporte. Dados da literatura mostram que células do túbulo proximal de rim de rato expressam as isoformas de PKC α , βI , βII , δ , ϵ e ζ (KANG et al., 1999), sendo que as isoformas α e βI encontram-se predominantemente na membrana basolateral (PTAFF et al., 1999). Por outro lado, em células de túbulos proximais de rins de camundongos somente a isoforma ϵ foi encontrada (REDLING et al., 2004). Adicionalmente, outros estudos em células de túbulo proximal de rins de ratos demonstram alterações nos níveis de expressão das PKCs α , βI e ϵ , em resposta a altas concentrações de glicose (KANG et al., 1999; HSIEH et al., 2006).

Contudo, o trocador Na^+/H^+ não participa apenas da regulação do pHi , mas também do volume e divisão celular (NOËL et al., 1995). Entretanto, sabe-se que a regulação do pH_i é feita principalmente pela isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (NHE1), cuja distribuição é ubíqua em células de vertebrados, além de ser a isoforma mais sensível ao amiloride bem como seus análogos (WAKABAYASHI et al., 1997).

No rim, o NHE1 encontra-se preferencialmente na membrana basolateral de todas as células dos múltiplos segmentos do néfron (NOËL et al., 1995; BIEMESDERFER et al., 1992). No entanto, as células do túbulo proximal expressam além do NHE1 na membrana basolateral, o NHE3 na membrana luminal. O NHE3 é menos sensível ao amiloride e apresenta particular relevância, pois secreta H^+ para a luz tubular e reabsorve Na^+ para o meio intracelular (AZARANI et al., 1995; D'SOUZA et al., 1998; MOE et al., 1997). Com isso o NHE3 contribui para a manutenção dos níveis adequados de Na^+ , do volume intravascular, além de participar na manutenção do equilíbrio ácido-base (SCHULTHEIS et al., 1998; GEKLE et al., 2004).

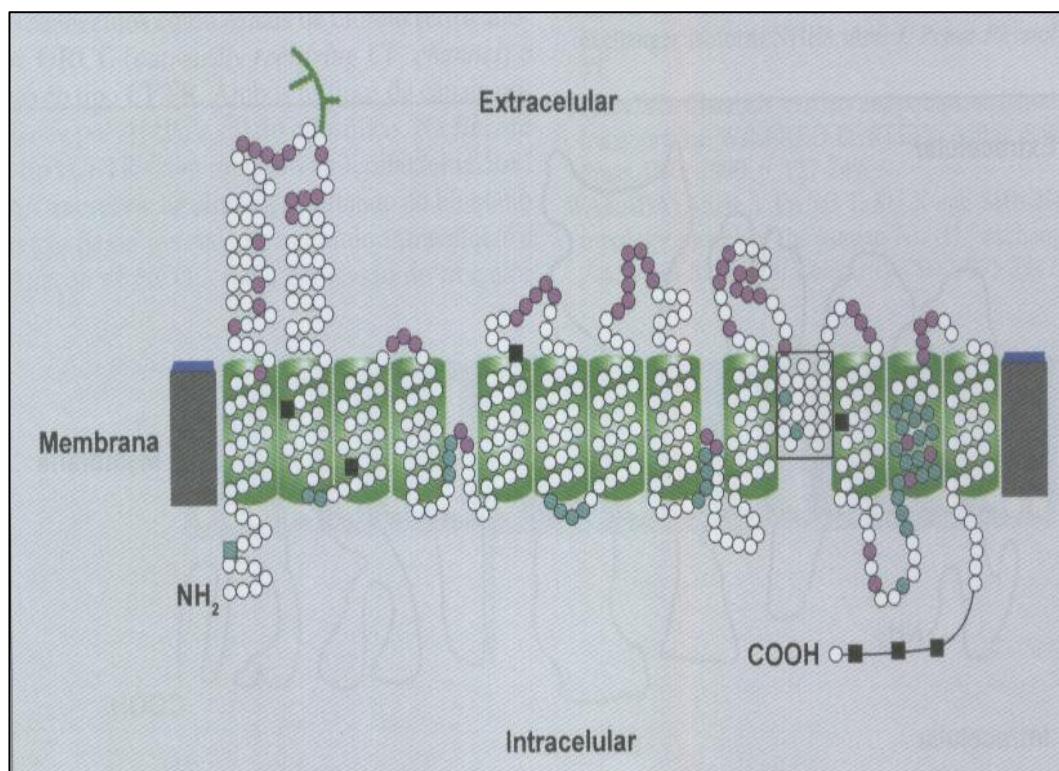


Figura 2. Estrutura da isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (NHE1). Porção N-terminal (NH_2) e porção C-terminal (COOH).

Fonte: Aires, M. M. et al., 2008, com permissão.

1.4 Efeito da hiperglicemiasobre os mecanismos de transporte de Na⁺

A manutenção dos níveis plasmáticos de glicose próximos a 100 mg/dl é fundamental para a homeostase. Entretanto, a hiperglicemias (glicose plasmática ≥ 200 mg/dl) induz alterações metabólicas, entre as quais está a acidose metabólica. Nas células do túbulo proximal renal, a hiperglicemias induz também a saturação dos transportadores de glicose (SGLT1 e SGLT2), caracterizando o transporte máximo de glicose ou Tm de glicose, o que resulta em glicosúria (perda de glicose na urina) acompanhada de diurese osmótica. Em casos mais graves, a glicosúria crônica leva a perda de potássio, queda do volume plasmático e consequentemente, queda da pressão arterial (NORMAN et al., 1997).

Por outro lado, Harris et al. (1986) sugerem um efeito coordenado entre SGLTs e os trocadores Na⁺/H⁺. Ambühl et al. (1998) observaram que, em ratos a recuperação do pH_i é modificada diante de variações na concentração plasmática de glicose. Nascimento-Gomes et al. (1997), estudando ratos diabéticos, observaram que a velocidade de acidificação tubular renal é modificada, sendo este efeito dependente do grau hiperglicêmico do animal. Posteriormente, o mesmo grupo observou que animais diabéticos apresentaram aumento da produção de radicais livres e oxidação. Esta resposta, entretanto, foi abolida pelo anti-oxidante (D-alfa-tocoferol) (NASCIMENTO-GOMES et al., 2005).

Baines et al. (2002) observaram em túbulos proximais de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, um aumento da expressão de eNOS (Endothelial Nitric Oxide Syntase) e consequentemente de óxido nítrico (NO). Os mesmos autores, entretanto, sugerem que o aumento de NO em condições hiperglicêmicas pode modular a atividade do NHE3 na membrana luminal de células do túbulo proximal. Schann et al. (2003) demonstraram que na hiperglicemias, a alteração de radicais livres e estado de oxidação ativam a via do diacilglicerol e proteína quinase C (DAG-PKC). Esses autores também demonstraram que a inibição dessa via previne complicações vasculares no *Diabetes mellitus*, independentemente do controle glicêmico. Hu et al. (2006), observaram que, em células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma de cólon humano, a p38 mitogen-acticated protein quinase (MAPK-p38) participa de eventos intracelulares responsáveis pela modulação do transporte de Na⁺ mediado pelo NHE3 e SGLT1.

2 CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos resultados indicam que no tratamento crônico, a internalização do SGLT1 está associada com a atividade da PKA, mas é independente de cálcio citosólico e a permanência do SGLT2 no citosol depende tanto da atividade da PKA quanto do cálcio (**Figura 18 A e B**). Assim, podemos afirmar que a distribuição celular do SGLT2 contribui para alterações na atividade dos NHE's.

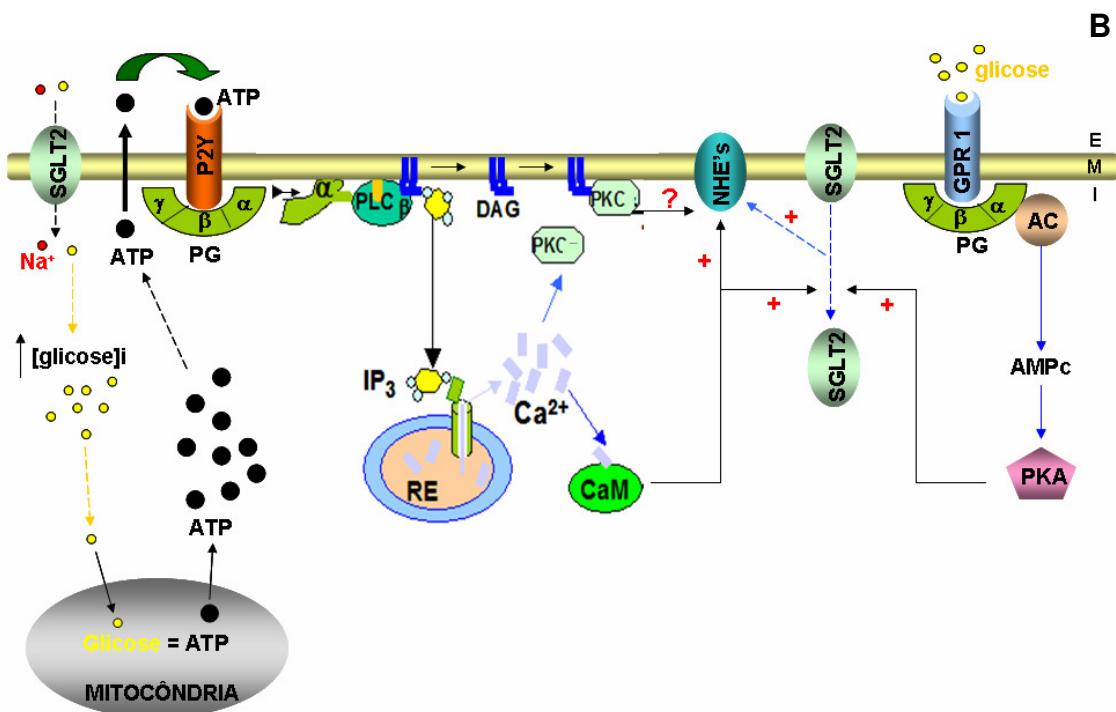
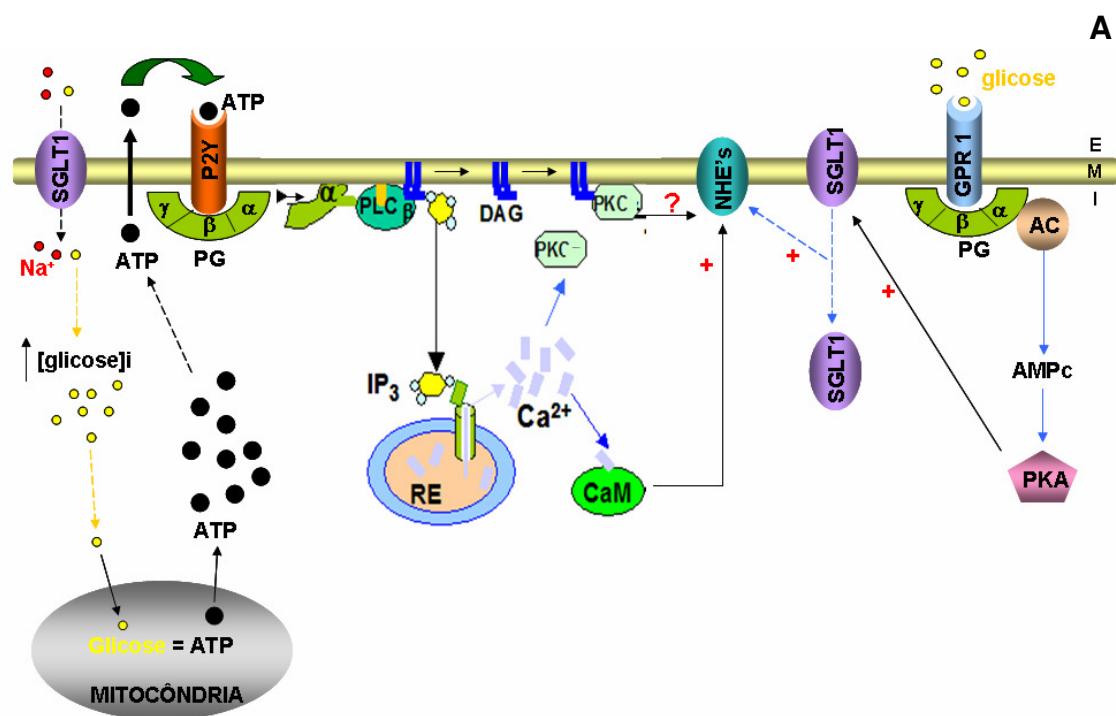


Figura 18: Vias de sinalização propostas para o efeito do tratamento crônico com glicose sobre a modulação da localização do SGLT1 (A) ou SGLT2 (B) e atividade dos NHE's. E=Extracelular, M=Membrana, I=Intracelular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232 p.

ALEXANDER, R.T.; GRINSTEIN, S. Na^+/H^+ exchangers and the regulation of volume. **Acta Physiol.**, v. 187, p. 159–167, 2006.

AMBÜHL, P.; AMEMIYA, M.; PREISIG, P. A.; MOE, O. W.; ALPERN, R.J. Chronic Hyperosmolality increase NHE3 activity in OKP cells. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 170-177, 1998.

ARONSON, P.S.; SACKTOR, B. The Na^+ gradient-dependent transport of D-glucose in renal BBMV. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6032-6039, 1975.

AVIV, A. Citosolic Ca^{2+} , Na^+/H^+ antiport, protein kinase C trio in essential hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 7, n. 2, p. 205-212, 1994.

AZARANI, A.; GOLTZMAN, D.; ORLOWSKI, J. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide inhibit the apical Na^+/H^+ exchanger NHE-3 isoform in renal cells (OK) via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 34, p. 20004-20010, 1995.

BAINES, A.; HO, P. Glucose stimulates O_2 consuption, NOS and Na^+/H^+ exchange in diabetic rat proximal tubules. **Am. J. Renal Physiol.**, v. 283, p. 286-293, 2002.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Physiology**. 4. ed. St. Louis: Mosby, 1998. 1131 p.

BERTAND, B.; WAKABAYASHI, S.; IKEDA, T.; POUYSSÉGUR, J.; SHIGEKAWA, M. The Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. **J. Bioch. Chem.**, v. 269, p.13703-13709, 1994.

BEVENSEE, M. O.; SCHWIENING, C. J.; BORON, W. F. Use of BECEF and propidium to assess membrane integrity of acutely isolated CA1 neurons from rat hippocampus. **J. Neurosci. Methods**, v. 48, p. 61–75, 1995.

BIEMESDERFER, D.; REILLY, R. F.; EXNER, M.; IGARASHI, P.; ARONSON, P. S. Immunocytochemical characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE1 in rabbit kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. F833–F840, 1992.

BORON, W. Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO_2 , NH_3 and metabolic inhibitors. **J. Gen. Physiol.**, v. 67, p. 91- 112, 1976.

* De acordo com:

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

BOYARSKY, G.; GANZ, M. B.; STERNZEL, R. B.; BORON, W. F. pH regulation in single glomerular mesangial cells I. Acid extrusion in absence and presence of HCO_3^- . **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. C844–C856, 1988.

BRITTEN, J.; BLANK, M. Thallium activation of the Na^+/K^+ activated ATPase of rabbit kidney. **Biochem. Biophys. Acta**, p. 159–160, 1968.

CHAILLETT, J. R.; BORON, W. F. Intracellular calibration of a pH-sensitive dye in isolated, perfused salamander proximal tubules. **J. Gen. Physiol.**, v. 86, n. 6, p. 765–794, 1985.

D'SOUZA, S.; GARCIA-CABADO, A.; YU, F.; TETER, K.; LUKACS, G.; SKORECKI, K.; MOORE, H. P.; ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na^+/H^+ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 4, p. 2035 – 2043, 1998.

DOMINGUEZ, J. H.; ROTHROCK, J.K.; MACIAS, W.L.; PRICE, J. Na^+ electrochemical gradient and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in rat proximal tubule. **Am. J. Physiol.**, v. 35, p. 1290–1294, 1989.

DOMINGUEZ, J.H.; CAMP, K.; MAIANU, L.; GARVEY, W.T.; The glucose transporters of rat proximal tubule: differential expression and subcellular distribution. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. F807–F812, 1992.

DUQUETTE, P. P.; BISSONNETTE, P.; LAPOINTE, J. Y. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na^+ /glucose cotransport. **PNAS**, v. 98, n. 7, p. 3796–3801, 2001.

DYER, J.; VAYRO, S.; KING, T. P.; BEECHEY, S. P. S. Glucose sensin in the intestinal epithelium. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 3377–3388, 2003.

FINE, L.G.; BADIE-DEZFOOLY, B.; LOWE, A.G.; HAMZEH, A.; WELLS, J.; SALEHMOGHADDAM, S. Stimulation of Na^+/H^+ antiport is an early event in hypertrophy of renal proximal tubular cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 1736–1740, 1985.

FORGAC, M.; CANTLEY, L.; WIEDENMANN, B.; ALTSTIEL, L.; BRANTON, D. Clathrin-coated vesicles contain an ATP-dependent proton pump. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 1300–1303, 1983.

GANZ, M. B.; HAWKINS, K.; REILLY, R. F. High glucose induces the activity and expression of Na^+/H^+ exchange in glomerular mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 278, p. F91-F96, 2000.

GEKLE, M.; VOLKER, K.; MILDENBERGER, S.; FREUDINGER, R.; SHULL, G.E.; WIEMANN, M. NHE3 Na^+/H^+ exchanger supports proximal tubular protein reabsorption in vivo. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 287, p. F469–F473, 2004.

GOYAL, S.; VANDER HEUVEL, G.; ARONSON P. S. Renal expression of novel exchanger isoform NHE8. **Am. J. Renal Physiol.**, v. 284, n. 3, p. F467-F473, 2003.

GOOD, D.W.; Di MARI, J.F.; WATTS, B.A.III. Hyperosmolality stimulates Na^+/H^+ exchange and HCO_3^- absorption in thick ascending limb via PI 3-kinase. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 279, p. C1443–C1454, 2000.

GREEN, J.; FOELLMER, O.; KLEEMAN, C. R. Collagen type 4 substratum (coll-4) inhibits the Na^+/H^+ exchanger (NHE) in OKP cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, p. 254, 1994.

HAN, H. J.; PARK, S. H.; LEE, Y. J.; LEE, J. C.; LEE, J. H. Effect of ATP on Ca^{2+} uptake in the presence of high glucose in renal proximal tubule cells. **Clin. Exper. Pharm. Physiol.**, v. 30, p. 694-701, 2003.

HANNAN, K. M.; LITTLE, P. J. Mechanisms regulating the vascular smooth muscle Na/H exchanger (NHE-1) in diabetes. **Biochem. Cell Biol.**, v. 76, n. 5, p. 751–759, 1998.

HARRIS, R. C.; BRENNER, B. M.; SEIFTER, J. L. Sodium-hydrogen exchange and glucose transport in renal microvillus membrane vesicles from rats with diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v. 77, n. 3, p. 724–733, 1986.

HIRAYAMA, B. A.; LOO, D. D. F.; DÍEZ-SAMPEDRO, A.; LEUNG, D. W.; MEINILD, A. K.; LAI-BING, M.; TURK, E.; WRIGHT, E. M. Sodium-dependent reorganization of the sugar-binding site of SGLT1. **Biochemistry**, v. 46, p. 13391–13406, 2007.

HU, Z.; WANG, Y.; GRAHAM, W. V.; SU, L.; MUSCH, W. AND TURNER, J. R. MAPKAPK-2 Is a Critical Signaling Intermediate in NHE3 Activation Following Na^+ -Glucose Cotransport. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 24247-24253, 2006.

HSIEH, Y. J.; CHEN, R.; ZHANG, S. L. Upregulation of osteopontin gene expression in diabetic rat proximal tubule cells revealed by microarray profiling. **Kidney Int.**, v. 69, p. 1005-1015, 2006.

IKEDA, M.; YOSHITOMI, K.; IMAI, M.; KUROKAWA, K. Cell Ca^{2+} response to luminal vasopressin in cortical collecting tubule principal cells. **Kidney Int.**, v. 45, p. 811-816, 1994.

KANG, N.; ALEXANDER, G.; PARK, J. K. Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetics rats. **Kidney Int.**, v. 56, p. 1737-1750, 1999.

KAPUS, A.; GRINSTEIN, S.; WASAN, S.; KANDASAMY, R.; ORLOWSKI, J. Functional characterization of three isoforms of Na^+/H^+ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 23544–23552, 1994.

KIM, J. H.; JOHNSTON, M. Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 36, p. 26144-26149, 2006.

KINNE, R.; MURER, H.; KINNE-SAFFRAN, E.; THREES, M.; SACHS, G. Sugar transport by renal plasma membrane vesicles. Characterizations of the systems in the brush border microvilli and basolateral plasma membranes. **J. Membr. Biol.**, v. 21, p. 375-395, 1975.

KLANKE, C. A.; SU, Y.; CALLEN, D. F.; WANG, Z.; MENETON, P.; BAIRD, N. ; KANDASAMY, R. A.; ORLOWSKI, J.; LEPPERT, M.; SHULL, G. E.; MENON, A. G. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na^+/H^+ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16p22.1, **Genomics**, v. 25, p. 615-622, 1995.

KOCINSKY, H. S.; GIRARDI, A. C. C.; BIEMESDERFER, D.; HGUYEN, T.; MENTONE, S.; ORLOWSKI, J.; ARONSON, P. S. Use of phosphor-specific antibodies to determine the phosphorylation of endogenous Na^+/H^+ exchanger NHE3 at PKA consensus sites. **Am J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, p. F249–F258, 2005.

KOYA, D.; KING, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, v. 47, p. 859–866, 1998.

KRUMP, E.; NIKITAS, K.; GRINSTEIN, S. induction of tyrosine phosphorylation and Na^+/H^+ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. **J. Biol Chem.**, v. 272, p. 17303–17311, 1997.

LAGRANHA, C. J.; FIORINO, P.; CASARINI, D. E.; SCHAAAN, B. D. A.; IRIGOYEN, M. C. Bases moleculares da glomerulopatia diabética. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 6, p. 901-912, 2007.

LANG, K.; WAGNER, C.; HADDAD, G.; BURNEKOVA, O.; GEIBEL, J. Intracellular pH Activates Membrane-Bound Na^+/H^+ Exchanger and Vacuolar H^+ -ATPase in Human Embryonic Kidney (HEK) Cells. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 13, n. 5, p. 257–262, 2003.

LAZAROWSKI, E. R.; BOUCHER, R. C.; HARDEN, T. K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, n. 4, p. 785–795, 2003.

LOIKE, J. D.; HICKMAN, S.; KUANG, K.; XU, M.; CAO, L.; VERA, J. C.; SILVERSTEIN, S.; FISCHBARG, J. Sodium-glucose cotransporters display sodium and phlorizin-dependent water permeability. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. C1774-C1779, 1996.

MOE, O. W. Sodium-hydrogen exchange in renal epithelia: mechanisms of acute regulation. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 6, n. 5, p. 440–446, 1997.

NAFTALIN, R. J. Osmotic water transport with glucose in GLUT2 and SGLT. **Biophys. J. Biofast.**, p. 1-20, 2008.

NASCIMENTO-GOMES, G.; ZALADEK, G. F.; MELLO-AIRES, M. Alterations of the renal handling of H^+ in diabetic rats. **Kidney Blood Press. Res.**, v. 20, n. 4, p. 251–257, 1997.

NASCIMENTO-GOMES, G.; BARBOSA, F. T.; RADAELI, R. F.; CAVANAL, M. F.; MELLO-AIRES, M.; ZALADEK, G. F. Effect of D-alpha-tocopherol on tubular nephron acidification by rats with induced diabetes mellitus. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 7, p. 1043–1051, 2005.

NOËL, J.; POUYSSÉGUR, J. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na^+/H^+ exchanger isoforms. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C283–C296, 1995.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2. ed. California: Academic Press, 1997.

NUMATA, M.; ORLOWSKI, J. Molecular cloning characterization of a novel $(\text{Na}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ exchanger localized to the trans-Golgi network. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 20, p. 17387–17394, 2001.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Atrial natriuretic peptide impairs the stimulatory effect of angiotensin II on H^+ -ATPase. **Kidney Int.**, v. 62, n. 5, p. 1693–1699, 2002.

ORLOWSKI, J.; KANDASAMY, R. A.; SHULL, G. E. Molecular cloning of putative members of the Na^+/H^+ exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na^+/H^+ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9331–9339, 1992.

OSTROM, R. S.; GREGORIAN, C.; INSEL, P. A. Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 11735–11739, 2000.

PAJOR, A. M.; RANDOLPH, K. M.; KERNER, S. A.; SMITH, C. D. Inhibitor binding in the human renal low and high affinity $\text{Na}^+/\text{glucose}$ cotransporter. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 324, n. 3, p. 985–991, 2008.

PESSIN, J.E.; BELL, G.I. Mammalian facilitative glucose transporter family: Structure and molecular regulation. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 54, p. 911–930, 1992.

PTAFF, I. L.; WAGNER, H. J.; VALLON, V. Immunolocalization of protein kinase C isoenzymes alpha, beta 1 and beta 2 in rat kidney. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 10, p. 1861–1873, 1999.

REDLING, S.; PTAFF, I. L.; LEITGES, M.; VALLON, V. Immunolocalization of protein kinase C isoenzymes alpha, beta 1, beta 2, delta and epsilon in mouse kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 287, p. F289–F298, 2004.

RINK, T. J.; TREIN, R. Y.; POZZAN, T. Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 95, p. 189–196, 1982.

RIVERA, A. A.; WHITE, C. R.; GUEST, L. L.; ELTON, T. S.; MARCHASE, R. B. Hyperglycemia alters cytoplasmic Ca^{2+} responses to capacitive Ca^{2+} influx in rat aortic smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C1482–C1488, 1995.

SACKTOR, B. Sodium-coupled hexose transport. **Kidney Int.**, v. 36, p. 342–350, 1989.

SALAMANCA, D. A.; KHALIL, R. A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, n. 11, p. 1537–1545, 2005.

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

SAUVAGE, M.; MAZIÈRE, P.; FATHALLAH, H.; GIRAUD, F. Insulin stimulates NHE1 activity by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C ζ in human erythrocytes. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 955-962, 2000.

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do Diabetes mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 47, n. 6, 654-662, 2003.

SCHULTHEIS, P.J.; CLARKE, L.L.; MENETON, P.; MILLER, M.L.; SOLEIMANI, M.; GAWENIS, L.R.; RIDDLE, T.M.; DUFFY, J.J.; DOETSCHMAN, T.; WANG, T.; GIEBISCH, G.; ARONSON, P.S.; LORENZ, J.N.; SHULL, G.E. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na^+/H^+ exchanger. **Nat. Genet.**, v. 19, p. 282-285, 1998.

SOLEIMANI, M.; BOOKSTEIN, C.; MCARTEER, J.A.; HATTABAUGH, Y.J.; BIZAL, G.L.; MUSCH, M.W.; VILLEREAL, M.; RAO, M.C.; HOWARD, R.L.; CHANG, E.B. Effect of high osmolality on Na^+/H^+ exchange in renal proximal tubule cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 15613-15618, 1994.

STONE, D.K.; XIE, X.S.; RACKER, E. An ATP-driven proton pump in clathrin-coated vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 4059-4062, 1983.

SYMONIAN, M.; SMOGORZEWSKI, M.; MARCINKOWSKI, W.; KROL, E.; MASSRY, S. G. Mechanisms through which high glucose concentration raises $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in renal proximal tubular cells. **Kidney Int.**, v. 54, p. 1206-1213, 1998.

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

TSE, C. M.; BRANT, S. R.; WALKER, M. S.; POUYSSÉGUR, J.; DONOWITZ, M. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding a intestinal and kidney-specific Na^+/H^+ axchanger isoform (NHE-3). **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9340-9346, 1992.

TSE, C. M.; LEVINE, S.; YUN, C. H.; BRANT, S. R.; POUYSSÉGUR, J.; MONTROSE, M. H.; AND DONOWITZ, M. Functional characterization of a cloned epithelial Na^+/H^+ axchanger (NHE-3): resistance to amiloride inhibition by protein linase C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 9110-9114, 1993.

TUNE, B.M.; BURG, M.B.; Glucose transport in proximal renal tubules. **Am. J. Physiol.**, v. 221, p. 580-585, 1971.

XU, Y.; OSBORNE, B. W.; STANTON, R. C. Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, p. F1040-F1047, 2005.

WAKABAYASHI, S.; FAFOURNOUX, C.; SARDET, C.; POUYSSÉGUR, J. The Na^+/H^+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 2424-2428, 1992.

WAKABAYASHI, S; BERTRAND, B; IKEDA, T.; POUSSÉGUR, J.; SHIGEKAWA, M. Mutation of Calmodulin-binding Site Renders the Na^+/H^+ Exchanger (NHE₁). Highly H⁺sensitive and Ca²⁺ Regulation-defective. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13710-13715, 1994.

WAKABAYASHI, S.; SHIGEKAWA, M.; POUYSSEGUR, J. Molecular Physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 51-74, 1997.

WANG, Z.; ORLOWSKI, J.; SHULL, G. E. Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na⁺/H⁺ Exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 11925-11928, 1993.

WILLIAMS, B.; SCHRIER, R. W. Effect of elevated extracellular glucose concentrations on transmembrane calcium ion fluxes in cultured rat VSMC. **Kidney Int.**, v. 44, p. 344-351, 1993.

WOOD, I. S.; TRAYHURA, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT) expanded families of sugar transport proteins. **Br. J. Nutr.**, v. 89, p. 3-9, 2003.

WRIGHT, E. M.; HIRSCH, J. R.; LOO, D. D. F.; ZAMPIIGHI, G. A. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 287-293, 1997.

WRIGHT, E.M. Renal Na⁺/Glucose cotransporters. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 280, p.F10-F18, 2001.

YANG, S.; CHEEK, D. J.; WESTFALL, D. P.; BUXTON, I. L. Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. **Circ. Res.**, v. 74, p. 401-407, 1994.

ZERBINI, G.; ROTH, T.; PODESTA, F.; CAGLIERO, E.; DORIA, A.; CANESSA, M.; LORENZI, M. Activity and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger in human endothelial cells cultured in high glucose. **Diabetologia**, v. 38, p. 785-791, 1995.

ZHAO, F. Q.; KEATING, A. F. Functional properties and genomics of glucose transporters. **Curr. Gen.**, v. 2, p. 113-128, 2007.