THAISSA DANTAS PESSOA

**MODULAÇÃO DO TROCADOR Na^+/H^+ APICAL, NHE3, PELO
TRANSPORTE DE GLICOSE EM TÚBULOS RENAIIS “IN VIVO”**

**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 Fisiologia Humana.**

**São Paulo
2008**

THAISSA DANTAS PESSOA

**MODULAÇÃO DO TROCADOR Na^+/H^+ APICAL, NHE3, PELO
TRANSPORTE DE GLICOSE EM TÚBULOS RENAIIS “IN VIVO”**

**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 Fisiologia Humana.**

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Gerhard Malnic

**São Paulo
2008**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pessoa, Thaíssa Dantas.

Modulação do trocador Na^+/H^+ apical, NHE3, pelo transporte de glicose em túbulos renais "in vivo" / Thaíssa Dantas Pessoa. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Gerhard Malnic.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia Renal.

Versão do título para o inglês: Modulation of apical Na^+/H^+ exchanger, NHE3, by glucose transport in rat renal proximal tubules.

Descritores: 1. Glicose 2. SGLT 3. NHE 3 4. Diabetes 5. Florizina 6. Equilíbrio ácido-base I. Malnic, Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB219/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thaissa Dantas Pessoa.

Título da Dissertação: Estudo da modulação do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, NHE3, pelo co-transportador $\text{Na}^+\text{-glicose}$ em túbulos proximais renais “*in vivo*”.

Orientador(a): Gerhard Malnic.

A comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a: ____/____/____, considerou o(a)

☐ **Aprovado**

☐ **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico:
Aos meus pais, sempre.
Ao meu mestre, de agora em diante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e em especial ao meu orientador, Professor Gerhard Malnic. Não há como expressar o quão gratificante foi tê-lo ao meu lado durante esses anos, aprendendo sobre ciência, mas acima de tudo, aprendendo sobre a vida. O Professor Gerhard Malnic é um exemplo de profissional, orientador e mais ainda, um exemplo de ser humano. Não há como descrever o quão imprescindível foi sua atenção e trabalho para o desenvolvimento da minha Dissertação.

Agradeço também a Prof^a. Nancy Amaral Rebouças pois sem suas sugestões este trabalho jamais teria existido. Agradeço a ela por me ceder parte de seu laboratório para a execução de alguns experimentos e pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho na sua forma escrita.

Não poderia deixar de agradecer quatro companheiros de laboratório muito importantes para mim. O primeiro deles a ser citado, o é, por ter sido o responsável pela apresentação do instituto, laboratório e técnica experimental. O Amorim foi muito importante, pois foi quem me fez sentir vontade de estar aqui e seguir em frente com este projeto. Agradeço por todas as conversas e explicações! Agradeço em seguida a minha querida amiga de laboratório, Lucilia Lessa, pelo apoio durante a indução de diabetes nos animais usados neste trabalho. Obrigada pelos sábados perdidos, mas também obrigada por todo o resto: respeito, consideração e principalmente, amizade. Os dois últimos colegas a receber este agradecimento são a Dra. Adriana Girardi e seu aluno Felipe Orrichio. Meu muito obrigado pela colobaração e indispensável ajuda para realização dos experimentos. Eu estimo muito a amizade que desta colaboração nasceu!

Não poderia deixar de agradecer também aos Prof. Joaquim Procópio, Margarida Mell-Aires e Maria Oliveira pelas importantes considerações realizadas em minha qualificação. Obrigada pelo apoio técnico-científico e pela presença. Agradeço também o Prof. Antonio Carlos Cassola por suas colocações críticas, pois sempre me foram importantes para que eu questionasse e melhorasse meu trabalho.

Deixo um agradecimento especial a todos os demais colegas de laboratório, que não citarei um a um com medo de, por descuido, esquecer de um nome. Mas deixo claro que este esquecimento seria somente um equívoco, porque em vários momentos a ajuda desses colegas me foram importantes. Deixo apenas um

agradecimento especial a Dra. Luciene Lacroix, colega de laboratório e amiga, que muito me acrescentou nesses anos, e principalmente, muito me incentivou. Obrigada pelo seu auxílio na revisão deste trabalho.

Por último agradeço a todas as pessoas importantes que não estão diariamente me auxiliando dentro do laboratório, mas sim fora dele. Obrigada aos meus pais, meu namorado, meus amigos e a Nalva pelo apoio em outro setor. Estas pessoas foram fundamentais para suportar as dúvidas, angustias, receios, medos e provas: sem vocês eu não poderia!

Este trabalho teve suporte financeiro técnico da FAPESP e do CNPq.

*“As palavras só têm sentido se nos ajudam a ver melhor o mundo.
Aprendemos palavras para melhorar os olhos.”*

Rubem Alves

RESUMO

Pessoa TD. Modulação do trocador Na^+/H^+ apical, NHE3, pelo transporte de glicose em túbulos renais “*in vivo*”. [Dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

No presente trabalho avaliamos se o NHE apical é modulado pelo transporte de glicose, e algumas vias de sinalização envolvidas com a reabsorção de HCO_3^- , além do efeito do tratamento com florizina e com streptozotocina. Para isso, utilizamos o método de microperfusão estacionária “*in vivo*”. Perfusões tubulares com solução de glicose 5mM aumentaram a reabsorção de bicarbonato em comparação com soluções contendo florizina sem glicose. Porém, perfusão de soluções de glicose 20mM ocasionaram efeito intermediário sobre esta reabsorção. A perfusão de solução contendo glicose 5mM com os inibidores PD169316 e LY294002 aboliu o efeito estimulatório promovido pela glicose 5mM. O tratamento com streptozotocina aboliu o efeito inibitório da perfusão de solução de glicose 20mM. Já o tratamento com florizina, não apresentou nenhum efeito adicional à inibição ocasionada pela perfusão de glicose 20mM mas inibiu o efeito estimulatório produzido pela perfusão de glicose 5 mM.

Palavras-chave: Glicose; SGLT; NHE3; Diabetes; Florizina; Microperfusão; Equilíbrio ácido-base.

ABSTRACT

Pessoa TD. Modulation of apical Na^+/H^+ exchanger, NHE3, by glucose transport in rat renal proximal tubules. [Dissertation (Master Thesis)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

We studied the modulation of bicarbonate reabsorption by the apical Na^+/H^+ exchanger of renal proximal tubule by luminal glucose, and the signaling path of this relationship. Treatment with phloridzin and streptozotocin diabetes on HCO_3^- reabsorption was also studied. We used stationary microperfusion “*in vivo*” for this purpose. Tubule perfusions with 5 mM glucose increased bicarbonate reabsorption compared to solutions without glucose plus phloridzin. Perfusion with 20 mM glucose caused an intermediate effect on JHCO_3^- compared to 0/phloridzin and 5 mM glucose. The inhibitors PD169316 and LY294002 with 5 mM glucose blocked the stimulatory effect of the latter, but H89 had no such effect. Streptozotocin diabetes abolished the inhibitory effect of 20 mM glucose perfusion. Chronic phloridzin did not produce any additional effect on JHCO_3^- during 20 mM glucose perfusion in normal rats, but blocked JHCO_3^- during perfusion with 5 mM glucose.

Keywords: Glucose; SGLT; NHE3; Diabetes; Phloridzin; Microperfusion; Acid-base balance.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	<i>Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 + Floriz) (N=9), sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato. *** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM; ** $P < 0,01$ vs Glicose 5 mM; * $P < 0,05$ vs Glicose 20 mM.</i>	55
Gráfico 2-	<i>Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 + Floriz) (N=9), sobre a meia vida de reabsorção de bicarbonato. ** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM; * $P < 0,01$ vs Glicose 5 mM.</i>	55
Gráfico 3-	<i>Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 + Floriz) (N=9), sobre o bicarbonato estacionário. * $P < 0,05$ vs Glicose 20 mM.</i>	56
Gráfico 4-	<i>Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Phlor)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato. ** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM e Glicose 5 mM + H89; * $P < 0,01$ vs Glicose 5 mM + H89.</i>	58
Gráfico 5-	<i>Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Floriz)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre meia vida de reabsorção de bicarbonato. *** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM e Glicose 5 mM + H89; ** $P < 0,01$ vs Glicose 20 mM; * $P < 0,05$ vs Glicose 5 mM.</i>	59
Gráfico 6-	<i>Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Floriz)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre a concentração estacionária de bicarbonato. *** $P < 0,01$ vs H89; ** $P < 0,05$ vs Glicose 20 mM; * $P < 0,05$ vs H89.</i>	59
Gráfico 7-	<i>Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Floriz)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre o pH estacionário. * $P < 0,05$ vs Glicose 5 mM + H89.</i>	60

Gráfico 8-	<i>Fluxo urinário, em ml/min corrigidos por Kg de peso vivo, de animais diabéticos (N=32), tratados com Florizina (N=22) e não tratados (Normal) (N=24) alojados em gaiola metabólica com coleta de urina em um intervalo de 24 horas. * P<0,001 vs tratado com Florizina e não tratado.</i>	61
Gráfico 9-	<i>Glicemia, em mg/dl, em jejum ao 6º dia de tratamento e sem jejum ao 10ª dia de tratamento, de animais com diabetes induzida por Streptozotocina, tratados com Florizina e não tratados (Normal). * P>0,001 vs Não tratados e tratados com Florizina.</i>	62
Gráfico 10-	<i>Variação de peso relativa (Peso final/ Peso inicial) em animais com diabetes induzida por Streptozotocina, tratados com Florizina e não tratados (Normal). * P<0,001 vs não tratados e Florizina.</i>	64
Gráfico 11-	<i>pH sérico ao 10º dia de tratamento em animais com diabetes induzida por Streptozotocina (N=8), tratados com Florizina (N=5) e não tratados (Normal) (N=7). * P<0,01 vs não tratados.</i>	65
Gráfico 12-	<i>Ritmo de filtração glomerular, em ml/min corrigidos por Kg de peso vivo, de animais diabéticos (N=32), tratados com Florizina (N=8) e não tratados (Normal) (N=24) alojados em gaiola metabólica com coleta de urina em um intervalo de 24 horas. * P<0,001 vs tratado com Florizina.</i>	66
Gráfico 13-	<i>Fração de excreção de Na⁺, em % corrigida por Kg de peso vivo, de animais diabéticos (32), tratados com Florizina (N=8) e não tratados (Normal) (N=24) alojados em gaiola metabólica com coleta em um intervalo de 24 horas. ** P<0,001 vs não tratados; *P<0,05 vs tratados com Florizina.</i>	67
Gráfico 14-	<i>Fração de excreção de K⁺, em % corrigida por Kg de peso vivo, de animais diabéticos (N=32), tratados com Florizina (N=8) e não tratados (Normal) (N=24) alojados em gaiola metabólica com coleta em um intervalo de 24 horas. ** P<0,001 vs diabéticos; * P<0,01 vs não tratados.</i>	68
Gráfico 15-	<i>Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16), sobre o fluxo de bicarbonato.** P<0,01 vs tratados com Florizina; * P<0,05 vs não tratados.</i>	69
Gráfico 16-	<i>Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16), sobre a meia vida de reabsorção de bicarbonato .</i>	70
Gráfico 17-	<i>Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM sobre fluxo de reabsorção de bicarbonato em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16), sobre o bicarbonato estacionário. * P<0,01 vs tratados com Florizina.</i>	71
Gráfico 18-	<i>Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM sobre fluxo de reabsorção de bicarbonato em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16). * P<0,01 vs Florizina.</i>	71
Gráfico 19-	<i>Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados (Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre o fluxo de bicarbonato.* P<0,001 vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.</i>	73

- Gráfico 20-** *Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados (Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre a meia vida de acidificação ($t_{1/2}$). * $P < 0,001$ vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.* 74
- Gráfico 21-** *Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados (Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre o bicarbonato estacionário. * $P < 0,001$ vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.* 74
- Gráfico 22-** *Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre o pH estacionário. * $P < 0,001$ vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.* 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	<i>Resumo das soluções utilizadas nos experimentos de microperfusão estacionária.</i>	39
Tabela 2-	<i>Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$), bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) e pH em túbulos proximais renais, de ratos normais, perfundidos com diferentes concentrações de glicose.</i>	54
Tabela 3-	<i>Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$) e bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) em túbulos proximais renais, de ratos normais, perfundidos com glicose 5 mM + inibidores.</i>	57
Tabela 4-	<i>Valores médios de fluxo urinário, em ml/minuto, corrigido por quilo de peso vivo, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.</i>	61
Tabela 5-	<i>Valores médios de glicemia de jejum ao 6º dia de tratamento ou sem jejum ao 10º dia de tratamento, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.</i>	62
Tabela 6-	<i>Valores médios de peso relativo (peso vivo final/ peso vivo inicial) ao 6º dia de tratamento e ao 10º dia de tratamento, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.</i>	63
Tabela 7-	<i>Valores médios de pH, pCO_2, pO_2 e HCO_3^- de sangue arterial ao 10º dia de tratamento, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.</i>	65
Tabela 8-	<i>Valores médios de ritmo de filtração glomerular (RFG), fração de excreção de sódio (FE Na^+) e fração de excreção de potássio (FE K^+), de animais não tratados (normais), diabéticos e tratados com Florizina.</i>	66
Tabela 9-	<i>Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$), bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) e pH estacionário, de túbulos proximais renais, de animais não tratados (normal), diabéticos ou tratados com Florizina, perfundidos com glicose 20 mM.</i>	69
Tabela 10-	<i>Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$), bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) e pH estacionário, de túbulos proximais renais perfundidos com solução de glicose 5 mM (G5) ou glicose 20 mM (G20), de animais não tratados (Normal) ou tratados com Florizina (Florizina).</i>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Representação esquemática do papel dos rins na regulação do pH dos fluidos corporais. CA = Anidrase carbônica (Malnic, 1989).</i>	24
Figura 2-	<i>Representação esquemática dos mecanismos de transporte, luminal e basolateral, em célula de túbulo proximal (Malnic, 1989).</i>	25
Figura 3-	<i>Representação esquemática dos mecanismos de transporte de Na⁺ e glicose, luminal e basolateral, em célula de túbulo proximal. S1 = segmento inicial do túbulo proximal; S3 = segmento final do túbulo proximal (Lee, et al., 2007).</i>	28
Figura 4-	<i>Representação esquemática da suposta estrutura dos NHEs, com doze segmentos trans-membrana e diversos sítios de fosforilação em sua longa alça C-terminal (MOE 1999).</i>	28
Figura 5-	<i>Representação esquemática da seqüência de aminoácidos e da estrutura secundária do SGLT1 humano. Foi utilizado o código de uma letra para identificar os aminoácidos presentes em sua estrutura. (Wright, 2001).</i>	30
Figura 6-	<i>Modelo de cinética do cotransportador Na⁺/glicose (Modificado de: Loo, et al., 1998).</i>	31
Figura 7-	<i>Prováveis vias de sinalização pelas quais a glicose, via SGLT1, estimula o NHE3, aumentando sua exocitose. RE = retículo endoplasmático; BML = Membrana baso-lateral; BB = membrana apical (Donowitz e Li, 2006).</i>	33
Figura 8-	<i>Representação Esquemática do Sistema Utilizado para Microperfusão Estacionária in vivo. À direita, pipeta de perfusão de dois ramos com P (solução de perfusão) e C (óleo de ricino). À esquerda, microeletrodo de dois ramos com resina de troca iônica sensível a H⁺ (IE) e solução de referência (em verde).</i>	41
Figura 9-	<i>Esquema do sistema de medida de pH através da técnica de microperfusão utilizando um eletrodo íon-seletivo. 1 = fio de prata cloretado do eletrodo indicador; 2 = solução referência tampão de pH 7,0, na qual o fio de prata cloretado encontra-se imerso; 3 = solução experimental, isto é, fluido tubular; 3' = solução interna do eletrodo de referência; 4 = fio de prata cloretado do eletrodo referência interno; 5 = fio de prata cloretado do eletrodo referência externo; 6 = solução de cloreto de potássio na qual o bastão de prata encontra-se imerso; 6' = solução fisiológica; A = resina íon-seletiva, seletiva à H⁺; B = ponte agar-KCl; C = cauda do rato cortada na extremidade e mergulhada em solução fisiológica.</i>	42
Figura 10-	<i>Registro representativo de uma calibração de eletrodo durante o experimento. O traçado representa o potencial obtido entre os ramos do eletrodo durante a superfusão do rim com soluções de pH conhecido. Em 1: potencial obtido na superfície renal; em 2: superfusão de solução de pH 6,32; em 3: superfusão de solução de pH 7,82; em 4: superfusão de solução de pH 6,99.</i>	43
Figura 11-	<i>Registro representativo de uma curva experimental. O traçado representa o potencial obtido no eletrodo durante a perfusão tubular, em um animal diabético, com solução de glicose 20 mM e bicarbonato 25 mM. Em 1: potencial que representa o pH estacionário tubular; em 2: momento em que ocorre a perfusão da solução experimental; em 3: recuperação do pH; em 4: potencial que representa o pH estacionário ao final da perfusão.</i>	44
Figura 12-	<i>Representação da estrutura química da Florizina (Ehrenkranz, et al., 2005).</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT - Protein Kinase B

GLUT - Glucose transporters

GLUT1 - Glucose transporters 1

GLUT2 - Glucose transporters 2

MAPKAPKinase-2 - Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2

NHE - Sodium Hydrogen Exchanger

NHE1 - Sodium Hydrogen Exchanger 1

NHE3 - Sodium Hydrogen Exchanger 3

P38-MAPKinase - p 38-Mitogen-activated protein (MAP) kinases

PI3-Kinase - Phosphoinositide 3-kinases

PKA - Proteína Cinase A

PKC - Proteína Cinase C

SGLT - Sodium Hydrogen Exchanger

SGLT1 - Sodium Glucose Transporter 1

SGLT2 - Sodium Glucose Transporter 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 O RIM E A HOMEOSTASE DO ORGANISMO	22
1.2 MECANISMOS DE REABSORÇÃO DE BICARBONATO NO TÚBULO PROXIMAL	24
1.3 REABSORÇÃO DE GLICOSE	26
1.4 NHE3	27
1.5 SGLT	29
1.6 EVIDÊNCIAS DE INTERAÇÃO ENTRE TRANSPORTE DE GLICOSE APICAL PELO SGLT E SECREÇÃO DE HIDROGÊNIO APICAL PELO NHE	31
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAIS	35
3.2 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
3.3 TÉCNICAS	37
3.3.1 Microperfusão estacionária in vivo	37
3.3.2 Indução de Diabetes por Streptozotocina	47
3.3.3 Inibição do SGLT e Indução de Glicosúria por Florizina	48
3.3.4 Medida de Clearance e Fração de Excreção	49
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS OBTIDOS	53
4.1 EFEITO DE PERFUSÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA CINÉTICA DE ACIDIFICAÇÃO TUBULAR	53
4.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SINALIZADORAS RESPONSÁVEIS PELA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO NHE3	56
4.3 CARACTERIZAÇÃO E FUNÇÃO RENAL DE ANIMAIS SEM TRATAMENTO, TRATADOS COM STREPTOZOTOCINA (DIABÉTICOS) E TRATADOS COM FLORIZINA.	60
4.4 EFEITO DE PERFUSÕES COM SOLUÇÃO DE GLICOSE 20 -mM NA CINÉTICA DE ACIDIFICAÇÃO TUBULAR DE ANIMAIS TRATADOS COM STREPTOZOTOCINA, TRATADOS COM FLORIZINA OU NÃO TRATADOS	68
5.5 AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO DE BICARBONATO NO TÚBULO PROXIMAL DE RATOS NÃO TRATADOS E TRATADOS COM FLORIZINA DURANTE PERFUSÃO DE GLICOSE 5 mM	72
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	76
5.1 TÉCNICA DE MICROPERFUSÃO ESTACIONÁRIA	76
5.2 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA REABSORÇÃO DE BICARBONATO	78
5.3 CASCATA DE SINALIZAÇÃO	81

5.4 CARACTERIZAÇÃO E FUNÇÃO RENAL DOS MODELOS EXPERIMENTAIS: ANIMAIS COM DIABETES INDUZIDA POR STREPTOZOTOCINA E TRATADOS COM FLORIZINA	83
5.5 AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO DE BICARBONATO NO TÚBULO PROXIMAL DE RATOS NÃO TRATADOS, TRATADOS COM FLORIZINA E COM DIABETES INDUZIDA POR STREPTOZOTOCINA.	86
5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM FLORIZINA SOBRE O FLUXO DE BICARBONATO DURANTE PERFUSÃO DE GLICOSE 5 mM.	88
6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 O RIM E A HOMEOSTASE DO ORGANISMO

Os rins são órgãos pares divididos macroscopicamente em córtex (região externa) e medula (região interna). Sua unidade morfofuncional, denominada nefro, é composta de regiões com características distintas umas das outras, que estão intimamente relacionadas com a função que desempenham. O primeiro segmento morfofuncional é o glomérulo. Esta porção do nefro é composta por um tufo capilar coberto por um epitélio, responsável pela ultrafiltração do plasma sanguíneo. Os glomérulos renais (cerca de 1 milhão por rim no humano) recebem 25% do débito cardíaco por minuto e filtram um quinto do conteúdo líquido e pequenas moléculas do sangue.

O segundo segmento formador do nefro é denominado de túbulo proximal. Este segmento é formado por uma monocamada de células polarizadas, que possuem, assim, diferentes transportadores na membrana apical e na membrana basolateral. É responsável pela reabsorção de 90% do bicarbonato (HCO_3^-) filtrado pelos glomérulos, 70% do sódio (Na^+) e do volume filtrados, 100% de toda a glicose e aminoácidos filtrados além de reabsorver cloreto (Cl^-), potássio (K^+) e outros íons e secretar íon hidrogênio (H^+).

O terceiro segmento do nefro, denominado alça de Henle, é formado por uma alça em forma de “U”. Este segmento é o principal segmento responsável pela manutenção da tonicidade medular. Além disso, é nele que se reabsorve grande parte dos íons que restaram no conteúdo luminal após o túbulo proximal.

O quarto e quinto segmentos do nefro são o túbulo distal e o ducto coletor. Esses segmentos têm importante papel no ajuste fino da quantidade de eletrólitos e água excretados na urina de modo a adequá-los às necessidades do organismo. Por isso, estes segmentos finais são finamente modulados por uma rede de sinais, inclusive hormônios e autacóides que modulam a permeabilidade a água e a atividade e expressão de proteínas de transporte de solutos.

Sendo assim, os rins são órgãos com importante papel na manutenção das condições do meio interno isto é, sua homeostase. Dentre estas condições, é imprescindível para a manutenção do equilíbrio ácido-base, conseguida pela manutenção da concentração de íon hidrogênio dos fluidos biológicos dentro da estreita faixa de normalidade.

A importância de se manter o pH extracelular dentro de limites estreitos está no fato de que inúmeros processos celulares dependem de um pH ótimo para ocorrerem. Sabe-se que é importante, para que os processos celulares ocorram, que os radicais carboxila ($-\text{COOH}$) e amina (NH_3^+), presentes nos aminoácidos, sejam mantidos em adequado estado de

protonação/dissociação. Sendo assim, se o meio interno estiver ácido, muitos processos fundamentais que ocorrem na maquinaria celular ficam comprometidos e o organismo tenderia a entrar em colapso, uma vez que a interação entre as proteínas deixaria de ocorrer corretamente devido à excessiva protonação desses radicais (Marx, 1981). Mudanças no metabolismo celular também podem ocorrer se o meio se tornar excessivamente alcalino.

Por esta razão, o organismo possui uma série de mecanismos que contribuem para a manutenção do pH do meio interno. O primeiro deles é composto pelos sistemas-tampões gás carbônico/bicarbonato ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$), fosfato e proteínas plasmáticas. Todo sistema que possui substâncias tamponantes age de maneira a não variar abruptamente seu pH quando uma carga ácida ou básica é adicionada ao mesmo, uma vez que uma parte dessa carga é tamponada. Quanto mais próximo do pH desejado for o pK da substância tampão, mais eficiente será o sistema em manter o pH do meio interno dentro dos parâmetros da normalidade. Sendo assim, apesar de não possuir o pK mais adequado para manter o pH do meio interno (pH do meio $\sim 7,4$; pK do sistema tampão $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^- \sim 6,1$), o sistema tampão $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ é um sistema eficaz, pois sua porção ácida (CO_2) é facilmente eliminada do organismo através dos pulmões. Podemos considerar, dessa forma, que os pulmões são o segundo sistema, presente no organismo, responsável pela manutenção do pH do meio interno.

Há também um terceiro sistema capaz de regular o pH do meio interno, formado pelos rins. Os rins são responsáveis pela manutenção da porção não volátil dos sistemas-tampões dentro de limites estreitos. Como a maior parte dos processos celulares produz mais ácidos do que bases, quase sempre, os rins, para manter o equilíbrio ácido-base do meio interno, devem excretar ácidos não voláteis que foram acrescentados ao sangue durante o metabolismo celular.

A maneira pela qual os rins realizam este balanço entre carga ácida e base é excretando urina ácida. Os principais mecanismos para produzir urina ácida estão relacionados à excreção de íon H^+ (Steinmetz, 1986). Porém, os processos pelos quais os rins transferem íons H^+ para o lúmen tubular, e assim acidificam a urina, variam dependendo do segmento do nefro em que o processo ocorre (Malnic, 1989).

Uma vez secretado, o íon H^+ sempre promove a transferência de um íon bicarbonato para o plasma. Quando o H^+ secretado reage quimicamente com o HCO_3^- filtrado, esse processo é denominado reabsorção de HCO_3^- . Porém, caso o H^+ secretado não reaja com o bicarbonato filtrado, este será tamponado por outros tampões filtrados ou secretados, como fosfato e amônia e ao final do processo será produzido bicarbonato, sendo que, neste caso, o HCO_3^- intracelular gerado e transferido para plasma é computado como HCO_3^- novo gerado pelos rins. A figura 1 elucida esse mecanismo; porém os detalhes do processo expressos nesta figura serão analisados posteriormente.

Figura 1- Representação esquemática do papel dos rins na regulação do pH dos fluidos corporais. CA = Anidrase carbônica (Malnic, 1989).

1.2 MECANISMOS DE REABSORÇÃO DE BICARBONATO NO TÚBULO PROXIMAL

Como visto, os túbulos proximais são formados por uma monocamada de células polarizadas que apresentam expressão de diferentes proteínas, receptores e/ou outros elementos de membrana, entre a membrana apical e a basolateral. Para se compreender como ocorre a reabsorção de bicarbonato nesse segmento tubular, é necessário conhecer alguns dos transportadores expressos em cada uma das membranas (apical e basolateral), uma vez que o transporte através desse epitélio, depende das diferenças de expressão de transportadores nestas. A figura 2 representa esquematicamente os mecanismos mais importantes pelos quais o túbulo proximal excreta H^+ e reabsorve bicarbonato.

Como podemos ver na figura, as células proximais expressam em sua membrana apical, o trocador sódio-hidrogênio (NHE), sendo a isoforma 3 a isoforma expressa nesta membrana (Lorenz, *et al.*, 1999). Este transportador secreta para a luz tubular íons H^+ usando a força motente do gradiente químico de Na^+ . Por esta razão, para que seja possível sua atividade, é necessário que o meio intracelular tenha baixa concentração de Na^+ . Isso é possível devido à atividade da Na^+/K^+ ATPase basolateral.

A Na^+/K^+ ATPase é expressa na membrana basolateral do epitélio tubular renal e sua atividade está vinculada a um gasto de energia metabólica, pois transporta Na^+ e K^+ contra seus gradientes eletroquímicos. O Na^+ é transportado para o meio extracelular, e o K^+ para o meio

intracelular, mantendo-se, com a atividade desse transportador, o meio intracelular pobre em Na^+ e concentrado em K^+ . Esta bomba é fundamental, portanto, para que o NHE3 apical consiga secretar H^+ utilizando o gradiente de Na^+ .

Uma vez secretado pelo NHE3 apical, através da troca com Na^+ , o H^+ intracelular será responsável pela reabsorção de bicarbonato luminal se uma série de eventos químicos ocorrer. Caso o H^+ secretado, se ligue ao HCO_3^- luminal e não a outra substância, formar-se-á espontaneamente ácido carbônico (H_2CO_3).

Figura 2- Representação esquemática dos mecanismos de transporte, luminal e basolateral, em célula de túbulo proximal (Malnic, 1989).

Depois de formado, o ácido carbônico é rapidamente transformado em água (H_2O) e gás carbônico (CO_2). Porém, ao contrário da reação anterior (formação do H_2CO_3), esta não ocorre espontaneamente no túbulo proximal. Sua cinética é acelerada em mais de 10.000 vezes por uma enzima catalisadora, a anidrase carbônica, isoforma IV, na superfície luminal da célula tubular proximal (Koeppen, *et al.*, 1985). A anidrase carbônica é uma enzima expressa de maneira quase ubíqua nas células do corpo, porém suas isoformas diferem dependendo do

tecido em que são expressas. No rim há expressão das isoformas II, IV, XII, e XIV da anidrase carbônica (Kaunisto, *et al.*, 2002). Como dito, essa enzima catalisa a reação de desidratação do ácido carbônico formado na luz tubular após secreção, pelo NHE3 apical, de H^+ . A água formada incorpora-se ao volume tubular e o CO_2 formado difunde-se livremente, através da membrana plasmática, para o meio intracelular, até que o equilíbrio de pressões parciais desse gás, entre o lúmen tubular e o meio intracelular, seja atingido.

O gás carbônico formado, assim como o gás carbônico já presente no meio intracelular é novamente transformado, ainda sob efeito da anidrase carbônica, presente em abundância no citosol das células tubulares proximais (isoforma II), em ácido carbônico. Uma vez formado, este rapidamente se dissocia em HCO_3^- e H^+ , uma vez que o equilíbrio desta reação está deslocado nesta direção, já que o H^+ agora formado no meio intracelular é transportado para fora da célula pelo NHE3 apical, o que diminui a concentração, pelo menos local, de H^+ .

O bicarbonato formado, no meio intracelular, é então transportado para o meio interno, através da membrana basolateral, principalmente pelo cotransportador sódio-bicarbonato (Na^+/HCO_3^-), mas também pelos trocadores bicarbonato-cloreto (HCO_3^-/Cl^-), bicarbonato de sódio-cloreto ($NaHCO_3/Cl^-$) e a Na^+/K^+ ATPase.

Todos os cotransportadores citados acima que transportam HCO_3^- e Na^+ , são expressos somente na membrana basolateral. Portanto, o Na^+ reabsorvido pelo NHE3 e o HCO_3^- formado a partir da reação química do CO_2 e H_2O no meio intracelular são transportados unicamente para o meio interno e nunca de volta para o lúmen. Sendo assim, o transporte desses íons pode ser considerado vetorial, com direção determinada, do lúmen para o meio interno.

1.3 REABSORÇÃO DE GLICOSE

Como visto, o transporte de bicarbonato e sódio, no túbulo proximal, é vetorial e ocorre do lúmen em direção ao interstício. O mesmo acontece durante a reabsorção de glicose no túbulo proximal. A glicose luminal, proveniente do glomérulo, é completamente reabsorvida, em uma condição de normoglicemia, no túbulo proximal. Seu transporte é mediado pelo cotransportador sódio/glicose (SGLT). Nos rins existem primariamente duas isoformas expressas do SGLT: o SGLT1, expresso na porção final do túbulo proximal e o SGLT2, expresso na porção inicial do túbulo proximal; ambos presentes na membrana apical (Sabolic, *et al.*, 2006 e Splinter, *et al.*, 2006).

Essas duas isoformas cumprem diferentes papéis na reabsorção de glicose. O SGLT2 é responsável pela reabsorção de 90% da glicose filtrada pelos glomérulos, possuindo este transportador baixa afinidade, porém alta capacidade de transporte, isto é, são necessárias maiores concentrações de glicose para que ocorra ligação da mesma a seu sítio (que possui

baixa afinidade pela glicose), porém, quando a glicose encontra-se em altas concentrações, este transportador carrega grandes quantidades de substrato (Mackenzie, *et al.* 1994). Já o SGLT1 é responsável pela reabsorção do restante da glicose, já no final do túbulo proximal (segmentos S2 e S3). Como sua expressão é restrita a esta região, recebe solução tubular pobre em glicose e, por isso, sua cinética é de alta afinidade, porém baixa capacidade (You, *et al.*, 1995).

Para que os SGLTs reabsorvam a glicose, transportando-a do lúmen para o meio intracelular, é necessário que haja gradiente de sódio, com o lúmen mais concentrado que o meio intracelular. Isto porque, os SGLTs transportam sódio e glicose, concomitantemente, do lúmen para o meio intracelular utilizando a força movente do Na^+ como energia eletromotriz. Como visto, é a bomba de Na^+/K^+ , expressa na membrana basolateral, que confere este gradiente.

Uma vez transportados para o meio intracelular, esse íon e a glicose são transportados para o meio intersticial por outros transportadores. O Na^+ é transportado, para o interstício, principalmente pela Na^+/K^+ ATPase presente na membrana basolateral. Já a glicose é transportada pelo transportador de glicose (GLUT) isoformas 1 e 2. Estas são proteínas expressas exclusivamente na membrana basolateral da célula tubular, transportam glicose sem gasto de energia, a favor do gradiente de concentração de glicose. O GLUT2 é expresso principalmente na porção inicial do túbulo proximal e é responsável pela reabsorção, junto ao SGLT2, de 90% da glicose filtrada. Já o GLUT1 transporta a glicose residual (reabsorvida pelo SGLT1 apical do lúmen para o meio intracelular), em direção ao interstício (Lee, *et al.*, 2007). A figura 3 esquematiza os mecanismos envolvidos no transporte de glicose em células proximais.

1.4 NHE3

Existem 9 diferentes isoformas de NHEs descritas na literatura (Zachos, *et al.*, 2005). A figura 4 representa, esquematicamente, a estrutura putativa dos NHEs. Todos os membros da família dos NHEs, de mamíferos, compartilham de uma estrutura comum com aproximadamente 400 aminoácidos em sua porção N-terminal e formando seus 12 segmentos trans-membrana; e a porção C-terminal, também composta de aproximadamente 400 aminoácidos, com importantes funções regulatórias. Esta alça citoplasmática contém diversos sítios de fosforilação que são alvo de várias cinases e domínios de interação com muitos fatores regulatórios. Todos os NHEs possuem uma estequiometria de 1:1 para Na^+/H^+ (Aronson, 1982).

O trocador Na^+/H^+ , isoforma 3 (NHE3), é a isoforma expressa no epitélio renal cujo gene identificado foi denominado SLC26A3 (Brett, *et al.*, 2005) e é um polipeptídeo de 80 kDa (Biemmesderfer, *et al.*, 1993). Sendo a isoforma 3, a expressa no epitélio renal, o conhecimento

de todos os fatores que a modulam é de fundamental importância para se compreender o processo de reabsorção de íons, em especial o sódio, que em grande parte é reabsorvido, no túbulo proximal, por este transportador.

Figura 3- Representação esquemática dos mecanismos de transporte de Na^+ e glicose, luminal e basolateral, em célula de túbulo proximal. S1 = segmento inicial do túbulo proximal; S3 = segmento final do túbulo proximal (Lee, et al., 2007).

Figura 4- Representação esquemática da suposta estrutura dos NHEs, com doze segmentos trans-membrana e diversos sítios de fosforilação em sua longa alça C-terminal (MOE 1999).

Por este motivo, atualmente, essa isoforma tem sido largamente estudada. Sabe-se hoje, por exemplo, que o NHE3 é modulado, entre outros fatores, pelo estado em que a actina do citoesqueleto se encontra (Chalumeau, *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, várias proteínas reguladoras de diferentes isoformas do permutador Na^+/H^+ foram descobertas, incluindo o grupo das NHERF, as Map-quinases, a ezrina, e outras. Algumas, como as duas últimas, estão envolvidas em um sistema cuja função principal é a incorporação de NHE3 na membrana apical de células de mucosa intestinal e túbulo renal. Os estudos que avançaram o conhecimento destas proteínas reguladoras foram realizados principalmente com células epiteliais em cultura (Klasic, *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004).

1.5 SGLT

Além do NHE3, os SGLTs também exercem importante função na reabsorção de glicose e Na^+ na membrana apical do túbulo proximal. Como dito anteriormente, existem 2 isoformas identificadas que são expressas ao longo do túbulo proximal: o SGLT 2, de baixa afinidade, e o SGLT 1, de alta afinidade (existe ainda, uma terceira isoforma descrita mas cuja expressão ainda não foi elucidada) (Wright, 2001).

A família dos SGLTs é codificada por três famílias de genes denominadas SLC5A1 (SGLT1), SLC5A2 (SGLT2) e SLC5A4 (SGLT3). As proteínas formadas a partir desses loci possuem entre 659-672 aminoácidos e aproximadamente 73-kDa, sendo que existe uma identidade de 75% entre o SGLT2 e o SGLT3 e 59% destes com o SGLT1. Esta proteína apresenta 14 segmentos transmembrana e ambas as alças, C-terminal e N-terminal, estão voltadas para o meio extracelular. A figura 5 é uma representação da sequência de aminoácidos para o SGLT1 humano. Acredita-se que o SGLT2 tenha estrutura semelhante (Wright, 2001).

A principal diferença encontrada entre as isoformas desses transportadores é relativa à afinidade que cada uma possui para glicose. O SGLT1 possui maior afinidade a glicose que aquela apresentada pelo SGLT2. Além disso, suas estequiometrias diferem: o SGLT1 transporta dois íons Na^+ para cada molécula de glicose, enquanto que o SGLT2 transporta apenas um íon Na^+ para cada glicose. Outra diferença existente, entre esses transportadores, é que o SGLT1 transporta tanto galactose quanto glicose, enquanto que o SGLT2 transporta apenas glicose (Mackenzie, *et al.*, 1996).

Suas diferenças também estão relacionadas com a afinidade que a Florizina, inibidor específico para SGLT, possui por esses cotransportadores. A Florizina apresenta quase duas vezes mais afinidade ao SGLT1 que ao SGLT2 (Panayotova-Heiermann, *et al.*, 1995).

Quanto à atividade desses transportadores, muito já foi elucidado acerca da isoforma 1 dos SGLTs. Acredita-se que o SGLT1 tenha 6 diferentes estados. Nos estados de 1 a 3 o

vestíbulo encontra-se voltado para o meio extracelular. Nesses estados ocorre a ligação do Na^+ e da glicose presentes no lúmen. Nos estados 4 a 6, o vestíbulo encontra-se voltado para o meio intracelular, e nestes estados ocorre liberação do Na^+ e da glicose para o meio intracelular. A figura 6 esquematiza a cinética de transporte do SGLT1.

Na figura, em C1, está representada a proteína na ausência do ligante Na^+ . Nesta condição não ocorre a ligação de glicose, uma vez que, seu sítio de ligação não fica evidente. Em C2 temos a representação da exposição do sítio de ligação para a glicose após a ligação de dois sódios ao sítio de ligação de sódio. Em C3 está representado o modo de lotação do transportador, com os dois substratos ligados. A partir deste momento, o transportador sofre uma mudança alostérica, para o estado representado em C4. Neste o vestíbulo abre-se para o meio interno. Nessa conformação a afinidade pela glicose é menor e, portanto, ela se solta de seu sítio de ligação liberando o Na^+ (C5), que também se solta de seu sítio movido pelo gradiente favorável (baixa concentração de sódio intracelular) (C6). A seta ligando o estado C2 ao estado C5 mostra a possibilidade de transporte de Na^+ na ausência de transporte de glicose (Loo, *et al.*, 1998).

Figura 5- Representação esquemática da seqüência de aminoácidos e da estrutura secundária do SGLT1 humano. Foi utilizado o código de uma letra para identificar os aminoácidos presentes em sua estrutura. (Wright, 2001).

Figura 6- Modelo de cinética do cotransportador Na^+ /glicose (Modificado de: Loo, *et al.*, 1998).

Muitos fatores já foram implicados na regulação dos SGLTs. As proteínas cinase A e C (PKA e PKC respectivamente), por exemplo, regulam o número de cotransportadores expressos na membrana, modulando a endocitose ou exocitose dos mesmos (Wright, 1997). Altas concentrações de glicose, por exemplo, podem inibir os SGLTs, pois geram sinais que aumentam a concentração de PKC ativa, e também promovem aumentos de cálcio intracelular (Lee, *et al.*, 2007)

1.6 EVIDÊNCIAS DE INTERAÇÃO ENTRE TRANSPORTE DE GLICOSE APICAL PELO SGLT E SECREÇÃO DE HIDROGÊNIO APICAL PELO NHE

Como visto até o momento, tanto o NHE3 quanto o SGLT1 apicais realizam transporte em função de um gradiente de Na^+ . Por este motivo, foi levantada a hipótese de que poderia haver algum tipo de interação entre eles. A primeira suposição foi de que estes transportadores teriam efeitos depressores um em relação ao outro. Essa suposição levava em consideração que estes transportadores competiriam pelo gradiente de sódio. Por isso, acreditava-se que quanto maior a atividade de um dos transportadores, menor seria a do outro.

Nascimento-Gomes, *et al.*, (1990) demonstraram através de microperfusão que a perfusão intratubular de solução com alta concentração de glicose gera uma significativa queda da reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal, o que poderia corroborar com a hipótese de que um transportador tende a inibir o outro em caso de hiperatividade de um deles. Porém, Harris, *et al.*, (1986) já haviam determinado, em experimentos com vesículas de borda em

escova, que o gradiente de sódio não interfere com o aumento da atividade do NHE3, em condição de diabetes.

Turner & Black (2001), por sua vez, utilizando células Caco-2 (intestinais), demonstraram que após início do transporte de glicose, ocorre alcalinização intracelular das células epiteliais e que enquanto houver transporte acoplado de Na^+ /glicose, o pH atingido se mantém, até que este transporte cesse, momento em que o pH retorna ao valor inicial. Eles também constataram que o aumento do pH acompanha o “up-take” de glicose até atingir um platô. Utilizando um glicídio não metabolizável, a α -D-metil glicose, constataram que a alcalinização do citoplasma depende do transporte e não do metabolismo celular da glicose. Estes autores também comprovaram que a alcalinização intracelular promovida pela glicose está intimamente ligada ao NHE3 e não a outras isoformas do trocador. A inibição de p38-MAPKinase previne a alcalinização dependente do NHE3. Além disso, a ativação da p38-MAPKinase pela anisomicina, na ausência do transporte de glicose, promove alcalinização dependente de NHE3, apesar desta ser quantitativamente menor que a alcalinização promovida durante o transporte de glicose.

Estudos posteriores, também utilizando células Caco-2, demonstraram que a alcalinização durante absorção de glicose depende da fosforilação da ezrina, uma proteína do citoesqueleto. A ativação da ezrina ocorre paralela à ativação da p38-MAPKinase. A inibição da ezrina não inibe a p-38, porém a inibição da p-38 inibe a fosforilação da ezrina e, portanto, inibe a alcalinização. Sendo assim, o aumento da atividade de NHE3, pós-captação de glicose pela célula, parece depender da fosforilação de ezrina. Nesse processo há ativação de p38-MAPkinase, embora ezrina não seja diretamente fosforilada por esta (Turner, *et al.*, 2004). Foi demonstrado que é a AKT2 a responsável pela fosforilação de ezrina nessas circunstâncias. (Shiue, *et al.*, 2005). Além disso, a MAPKAPKinase-2 controla a fosforilação da AKT2, servindo de ponte entre a p38-MAPkinase, ezrina e a ativação do NHE3 após início do transporte de glicose pelo SGLT1 (Hu, *et al.*, 2006). Estes dados mostraram, através da análise do pH celular de epitélio intestinal, que há importante interação entre o transporte de H^+ e de glicose, envolvendo o NHE3, e elucidaram alguns dos mecanismos desse processo, que envolve a fosforilação de diversas proteínas intracelulares. No entanto, não há ainda estudos a respeito desse mecanismo em células de túbulo renal “in vivo” e pouco há a esse respeito “in vitro”.

A figura 7 elucidada o que já há descrito sobre a regulação do NHE3 pelo SGLT1 em células intestinais.

Figura 7- Prováveis vias de sinalização pelas quais a glicose, via SGLT1, estimula o NHE3, aumentando sua exocitose. RE = retículo endoplasmático; BML = Membrana basolateral; BB = membrana apical (Donowitz e Li, 2006).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar se em túbulos proximais de rins de rato normais o trocador sódio-hidrogênio (isoforma 3) é modulado pela glicose e/ou seu transporte. Uma vez verificada tal modulação, procuramos determinar suas vias de sinalização.

Tivemos também como objetivo verificar se na vigência de diabetes – condição que ocasiona acentuada glicosúria, por sobrecarga do transporte de glicose através do SGLT tubular –, ou durante tratamento com Florizina – condição de inibição do SGLT – a atividade do trocador sódio-hidrogênio de túbulos proximais é modulada. Para isto, realizamos a caracterização de nossos modelos experimentais através da análise da função renal e outros parâmetros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

- Origem dos reagentes:

- Sigma: DMSO (dimethyl sulfoxide); Etanol; Phloridzin; Streptozotocina; H89
- Calbiochem: PD 169316; LY 294002; H-89
- Fluka: Hidrogen Ionophore I; Hexamethyldisilazane;
- Roche: Heparina Lique mine
- Vetbrands: Anasedan
- Syntec: Cetamin
- Synth: sais utilizados para a preparação dos meios

- Origem dos animais:

Foram utilizados ratos da raça Wistar machos, com pese entre 150 e 350g, para a execução deste trabalho. Esses animais foram obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Neste biotério, os animais foram colocados em gaiolas de polietileno com tampa de grade metálica contendo água filtrada e comida (Nuvilab, São Paulo) *ad libitum* numa lotação de até 5 ratos por gaiola, com 15 a 20 trocas de ar por hora e um ciclo de claro/escuro de 12 horas.

3.2 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

- 1ª fase: Medida da atividade do trocador Na^+/H^+ através da mensuração da reabsorção de bicarbonato em diferentes concentrações de glicose ou na ausência de transporte de glicose.

Nesta fase avaliamos se a atividade do trocador é modulada pela reabsorção de glicose em túbulo proximal de ratos *in vivo*. Para isso, foi utilizada a técnica de microperfusão estacionária de túbulos proximais. O primeiro grupo teve os túbulos perfundidos com solução contendo glicose 5 mM para determinar a reabsorção de

bicarbonato frente a solução com concentração fisiológica de glicose. O segundo grupo foi perfundido com solução Glicose 20 mM para determinar a atividade do trocador sódio-hidrogênio em condição de sobrecarga aguda do SGLT tubular. O terceiro grupo foi perfundido com solução Florizina 0,5 mM, inibidor do SGLT-1, sem glicose. Esse grupo foi utilizado para determinar a reabsorção de bicarbonato na ausência de transporte de glicose.

- 2ª fase: Medida da atividade do trocador Na^+/H^+ através da mensuração da reabsorção de bicarbonato na presença de glicose e inibidores da cascata de sinalização intracelular.

Esta fase visou determinar algumas vias de sinalização envolvidas no mecanismo estimulatório da glicose em concentração fisiológica (5 mM) sobre a atividade do trocador Na^+/H^+ . Para isso, foi utilizada a técnica de microperfusão estacionária in vivo. Os animais foram perfundidos com solução contendo glicose a 5 mM e inibidores. Foram utilizados 3 inibidores: PD169316 10 μM , inibidor da p38 MAPkinase; LY 294002 50 μM , inibidor da PI-3 kinase, H89 50 μM , inibidor da PKA.

- 3ª fase: Determinação da função renal em ratos normais, diabéticos e tratados com inibidor do co-transportador sódio-glicose (SGLT) in vivo.

Nesta fase determinamos a taxa de filtração glomerular (medida através do clearance de creatinina) e a taxa de reabsorção de sódio e potássio em diferentes condições glicêmicas. Para isso, ratos Wistar foram tratados com Streptozotocina ou Florizina, havendo um grupo de ratos não tratados. Foi mensurada a glicemia de jejum (8 horas de jejum) ao 6º dia de tratamento, bem como a glicemia sem jejum ao 10º dia de tratamento de todos os grupos. Além disso, foi determinada a variação de peso desses animais em função do tempo e suas concentrações séricas de Na^+ , K^+ , creatinina, pH, pCO_2 , pO_2 e bicarbonato. Entre o 6º e o 9º dia de tratamento, os animais foram colocados em gaiola metabólica e sua urina foi coletada para medida de volume, Na^+ , K^+ , creatinina e posterior cálculo de fluxo urinário, clearance de creatinina (RFG), fração de excreção de Na^+ e K^+ .

- 4ª fase: Medida da atividade do trocador Na^+/H^+ através da mensuração da reabsorção de bicarbonato em ratos com diabetes induzido por Streptozotocina, tratados com Florizina e não tratados durante perfusão com solução de glicose 20 mM

Nesta fase analisamos se a atividade do trocador é modulada, durante perfusão com alta concentração de glicose (20 mM), por estímulo crônico do SGLT (hiperglicemia crônica) ou inibição crônica do SGLT tubular. Para isso, foi utilizada a técnica de microperfusão estacionária in vivo em animais diabéticos (hiperglicêmicos), tratados com Florizina (inibição do SGLT) ou não tratados. Todos os grupos tiveram os túbulos perfundidos com solução contendo glicose 20 mM para determinar a reabsorção de bicarbonato, na presença destes tratamentos, quando o túbulo é perfundido com solução com alta concentração de glicose (20 mM).

- 5ª fase: Medida da atividade do trocador Na^+/H^+ através da mensuração da reabsorção de bicarbonato em ratos tratados com Florizina e normais com solução de glicose 5 mM.

Nesta fase analisamos se a atividade do trocador é modulada, durante perfusão de solução de glicose 5 mM em condição de inibição crônica do SGLT tubular. Para isso, foi utilizada a técnica de microperfusão estacionária in vivo em animais tratados com Florizina (inibição do SGLT) ou não tratados. Os dois grupos tiveram os túbulos perfundidos com solução contendo glicose 5 mM para determinar a reabsorção de bicarbonato, na presença e ausência de tratamento, quando o túbulo é perfundido com solução de concentração fisiológica de glicose (5 mM).

3.3 TÉCNICAS

3.3.1 Microperfusão estacionária in vivo

Foram utilizados Ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 350 g, alimentados com dieta normal de laboratório em pellets e com água ad libitum até o momento do procedimento.

Para o procedimento de microperfusão, os animais foram anestesiados com Pentobarbital e hidantoína na dose de 40 mg/kg (dose base do pentobarbital) – para realizar a 1ª e a 2ª etapa deste trabalho – e com Quetamina (0,1 ml/100 g de peso vivo) associada a Xylasina (0,1 ml/300 g de peso vivo) – para realizar a 4ª e 5ª etapa deste trabalho. Após anestesiados, os animais foram levados a uma gaiola de Faraday e colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica aquecida a 37 °C por meio de uma placa térmica. Foi realizada incisão na porção ventral do pescoço a fim de se expor a musculatura que recobre a traquéia. Esta musculatura foi então separada com o auxílio de pinças adequadas e a traquéia foi exposta. Realizou-se assim a traqueostomia a partir de uma incisão perpendicular aos anéis traqueais. Em seguida, separou-se, a partir da mesma incisão no pescoço do animal, a musculatura que recobre a jugular. Através de um pequeno orifício na jugular, realizado com uma tesoura para cirurgia oftálmica, esta foi canulada para a infusão de uma solução fisiológica com manitol 3%, a 0,1 ml/min, com o intuito de tornar os túbulos mais visíveis, uma vez que o manitol é um diurético osmótico.

Os animais foram, então, colocados em decúbito lateral direito e o rim esquerdo foi exposto através de uma incisão para-lombar. Este rim foi liberado da gordura perirrenal através de divulsão utilizando-se uma tesoura oftálmica e pinças pequenas. Depois de separado, o rim foi fixado e imobilizado com solução de Ringer Agar 5% *in situ* em um suporte para rim de Lucite.

A mesa cirúrgica foi então posicionada abaixo de um microscópio estereoscópio (Olympus SZPT, Japão) para a visualização da superfície renal. Como fonte de luz utilizou-se uma lâmpada de projetor de tungstênio que teve sua luz canalizada ao rim através de um bastão de quartzo. Os túbulos renais foram observados utilizando-se um aumento de 40 à 100 vezes. O rim foi, durante todo o período, banhado por solução Ringer à 37 °C.

A cauda do rato foi seccionada na extremidade e mergulhada em becker contendo solução salina e fazia contato elétrico por ponte de agar de KCl com uma hemicélula de Ag/AgCl. Desta forma, o compartimento extracelular do animal foi utilizado como nível de referência das medidas realizadas.

Após este prévio preparo, foram iniciados os experimentos de microperfusão estacionária que foram realizados da forma descrita anteriormente por Malnic e Mello-Aires, 1971 e Amorim e Malnic, 2000. Com o auxílio de uma micropipeta dupla, um túbulo proximal foi puncionado. Um ramo da micropipeta foi utilizado para injetar

solução de perfusão corada com verde-FDC, e o outro para injetar óleo de rícino corado com Sudan-black, utilizado para bloquear as colunas de fluido injetadas no lúmen (Figura 8). Para se injetar o conteúdo das micropipetas no lúmen do túbulo punccionado, estas foram conectadas, através de tubos de polietileno, a seringas de vidro para aplicação de ar sob pressão. Os tubos de polietileno foram acoplados a pipeta através de agulhas de metal hipodérmicas vedadas com um lacre. Para a punção dos túbulos, as pipetas foram colocadas em micromanipuladores mecânicos (Leitz, Wetzlar, Alemanha).

Tabela 1- Resumo das soluções utilizadas nos experimentos de microperfusão estacionária.

Reagentes	Solução padrão para calibração de eletrodo	Solução perfusora glicose 0mM + Florizina 0,5mM	Solução luminal de glicose 5mM	Solução luminal de glicose 20mM	Solução luminal de glicose 5mM + PD169316	Solução luminal de glicose 5mM + LY 294002	Solução luminal de glicose 5mM + H89	Solução referência - eletrodo de referência interno	Solução de complemento - eletrodo indicador	Solução de infusão venosa de Manitol
NaCl (mM)	130	100	100	100	100	100			130	0,9%
KCl (mM)		5	5	5	5	5		1M		
CaCl ₂ (mM)		1	1	1	1	1				
MgSO ₄ (mM)		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2				
NaHCO ₃ (mM)		25	25	25	25	25				
NaH ₂ PO ₄ (mM)	10								10	
Na ₂ HPO ₄ (mM)	10								10	
Glicose (mM)			5	20	5	5				
Florizina (mM)		0,5								
PD169316 (μM)					10					
LY294002 (μM)						50				
Manitol (%)										3
Rafinose		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim				
FDC Green		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim			Sim	

No mesmo nefro, reconhecido pela perfusão com solução corada, foi implantado um microeletrodo de dois ramos, assimétrico, para a medida de pH. Para a implantação deste microeletrodo foi utilizado um micromanipulador mecânico (Leitz, Wetzlar, Alemanha). Este microeletrodo é usado para medir o pH intratubular a partir da mensuração da variação do potencial elétrico. Por esta técnica cerca de 8 curvas são obtidas a cada túbulo perfundido. Para cada túbulo se obteve um valor médio de pH estacionário, bicarbonato estacionário (HCO_3^-), meia-vida de acidificação ($t^{1/2}$) e fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-) (veja abaixo). Em cada rato foram perfundidos de 1 a 4 túbulos proximais, desta maneira, o valor de “N” indicado para as médias obtidas corresponde ao número de túbulos perfundidos.

Para se medir o potencial elétrico utilizando-se o eletrodo de dois ramos descrito acima, utilizou-se um sistema de medição experimental constituído por hemicélulas eletro-químicas ligadas a um voltímetro de alta impedância. Uma das hemicélulas era formada pelo ramo de maior diâmetro do eletrodo, seletivo ao H^+ , uma vez que sua ponta estava preenchida por uma resina sensível a H^+ . Esta hemicélula era ligada, através de um fio de cobre, ao voltímetro de resistência de entrada de 10^{16} Ohm, amplificação variável e com dois canais (WPI, Sarasota, FL, USA), tendo sido ligada ao canal A deste amplificador.

A outra hemicélula era formada pelo ramo fino do microeletrodo. Em seu interior era colocado um fio de prata devidamente cloretado. Este ramo, era preenchido de solução de KCl e estava ligado ao canal B do mesmo amplificador através do fio de prata cloretado e correspondia ao ramo de referência.

As medidas eram realizadas, para cada canal, comparando-se a diferença de potencial entre o eletrodo ligado ao canal em questão e o terra do aparelho. O terra do aparelho estava conectado, através de um fio de cobre, à gaiola de Faraday utilizada para realizar o experimento. A gaiola por sua vez, estava conectada, através de uma placa de liga de cobre e zinco e um fio de cobre, a uma terceira hemicélula. Esta hemicélula era constituída de um fio de prata cloretado imerso em uma solução de cloreto de potássio 3M. Ligado a esta solução através de uma ponte agar de KCl estava a cauda do animal imersa em uma solução de NaCl 0,9%. Desta forma, o terra do aparelho, utilizado como referência para as demais hemicélulas (canais A e B do voltímetro), estava eletricamente ligado à cauda do rato e, portanto, representava o potencial do meio interno do mesmo. Sendo assim, a solução intratubular (representada

pelos dois ramos do eletrodo ligados ao canal A e B) era comparada com a solução extratubular, ou meio interno (representada pelo terra).

Figura 8- Representação Esquemática do Sistema Utilizado para Microperfusão Estacionária in vivo. À direita, pipeta de perfusão de dois ramos com P (solução de perfusão) e C (óleo de ricino). À esquerda, microeletrodo de dois ramos com resina de troca iônica sensível a H^+ (IE) e solução de referência (em verde).

A medida da DDP entre o ramo do microeletrodo preenchido com resina foi obtida com o intuito de se saber, a partir da DDP entre este ramo e o terra, o pH da solução. O potencial de equilíbrio de um eletrodo íon-seletivo sensível à pH varia de acordo com a concentração de íon H^+ na solução. Para que a medida seja possível de ser obtida, já que não é possível se obter a DDP absoluta, um dos eletrodos deve ter um potencial constante. Dessa forma, qualquer mudança de potencial do sistema ocorrerá apenas por variação no pH da solução, medida pelo outro eletrodo. Arbitrariamente, o potencial transmitido ao aparelho pelo terra foi considerado zero, e portanto o aparelho exibe o potencial obtido pelos dois ramos do microeletrodo, tendo como referência, o valor Zero (terra).

O que obtemos ao colocar o microeletrodo duplo na solução experimental, isto é, no interior do túbulo, é um intercâmbio de H^+ no eletrodo preenchido com resina e intercâmbio iônico no ramo do microeletrodo duplo sem resina, que originará uma diferença de potencial em relação ao terra.

O sistema criado pode ser representado quimicamente da seguinte maneira:

Ag/AgCl, KCl, Ag/AgCl, pH tampão interno/ Membrana /pH da solução experimental // KCl, Ag/AgCl

Ou representado esquematicamente como na figura abaixo (figura 9). Observando-se a figura verifica-se que o potencial medido no canal A é o potencial medido entre o ramo preenchido com resina e o eletrodo que representa o terra. O potencial obtido no canal B é o potencial medido entre o eletrodo sem resina e o terra. O potencial obtido no canal A corresponde ao potencial gerado no eletrodo preenchido com resina que se deve a dois fatores: uma diferença de potencial entre a superfície do metal recoberto pelo sal insolúvel e a solução na qual este metal está imerso e uma diferença de potencial entre a solução tubular e a solução que preenche o eletrodo, uma vez que apenas cátions H^+ são detectados pela resina. Podemos dizer que o eletrodo ligado ao canal A está eletricamente interligado à solução tubular apenas pelas cargas positivas, correspondentes aos íons H^+ .

Figura 9- Esquema do sistema de medida de pH através da técnica de microperfusão utilizando um eletrodo ion-seletivo. 1 = fio de prata cloretado do eletrodo indicador; 2 = solução referência tampão de pH 7,0, na qual o fio de prata cloretado encontra-se imerso; 3 = solução experimental, isto é, fluido tubular; 3' = solução interna do eletrodo de referência; 4 = fio de prata cloretado do eletrodo referência interno; 5 = fio de prata cloretado do eletrodo referência externo; 6 = solução de cloreto de potássio na qual o bastão de prata encontra-se imerso; 6' = solução fisiológica; A = resina íon-seletiva, seletiva à H^+ ; B = ponte agar-KCl; C = cauda do rato cortada na extremidade e mergulhada em solução fisiológica.

Já o potencial obtido no canal B se deve ao potencial gerado no eletrodo de referência, isto é, apenas à diferença de potencial formada entre a interface metálica

recoberta pelo sal insolúvel e a solução que a banha. Esta solução está eletricamente conectada ao fluido tubular, uma vez que está ligada a solução presente na luz tubular por meio de um capilar de vidro de ponta fina, no qual há troca de cátions e ânions entre o túbulo e a solução é livre. Isto significa que o potencial gerado na interface metálica deve-se à composição do fluido tubular, isto é, a todos os íons que o compõe.

O valor absoluto de cada uma dessas DDP pode ser calculado, pois seguem a equação do potencial de equilíbrio de Nerst, desde que se saiba a concentração de cloreto nas soluções que banham os eletrodos. Porém, em nosso caso, este cálculo não é necessário. Para se obter um valor de pH fizemos calibrações do eletrodo, ainda na superfície renal, com três valores diferentes de pH, obtendo para cada valor um potencial medido pelo voltímetro (figura 10). Os microeletrodos para a medida do pH, portanto, foram calibrados antes e depois da superfusão do rim com solução tampão ringer-fosfato contendo 20 mM de fosfato e 130 mM de NaCl a 37 °C. Os valores de pH dos padrões foram ajustados para 6,5; 7,0 e 8,0 por meio de 0,1 N de NaOH ou HCl, obtendo-se a partir daí um valor de potencial para cada pH conhecido. Tem-se, assim, um potencial para cada pH de calibração e, a partir desses potenciais é possível calcular o quanto o potencial medido no voltímetro varia para cada unidade de pH. A variação do potencial por unidade de pH, à mesma temperatura e na faixa de pH estudada, é linear, e portanto, pode-se chegar a um valor de pH desconhecido (luminal) a partir de um potencial medido.

Figura 10- Registro representativo de uma calibração de eletrodo durante o experimento. O traçado representa o potencial obtido entre os ramos do eletrodo durante a superfusão do rim com soluções de pH conhecido. Em 1: potencial obtido na superfície renal; em 2: superfusão de solução de pH 6,32; em 3: superfusão de solução de pH 7,82; em 4: superfusão de solução de pH 6,99.

As voltagens referidas acima e a diferença de potencial transepitelial (medida a partir do ramo sem resina e com resina do microeletrodo duplo) foram lidas em um eletrômetro, de dois canais, como exposto anteriormente. A saída desse eletrômetro foi continuamente digitalizada em intervalos de 0,5 s por um microcomputador PC acoplado a um conversor análogo-digital (Lynx, São Paulo), através do qual os dados foram obtidos e processados. As curvas de DDP foram obtidas a partir da solução perfusora inicial (pH_0) até um valor estacionário da DDP, correspondente ao nível mais ácido do pH luminal. Temos então, que a microperfusão origina uma curva que atinge um valor estacionário (figura 11). Assim, a reabsorção de bicarbonato do túbulo proximal (P), segmentos S2 e S3, foi calculada através da medida contínua do pH luminal por meio de microeletrodos em uma coluna de fluido contendo bicarbonato 25 mM (portanto alcalina) isolada do fluido tubular, observando-se a queda do pH intratubular (e do bicarbonato) em direção a um nível estável (Malnic e Mello Aires, 1971).

Figura 11- Registro representativo de uma curva experimental. O traçado representa o potencial obtido no eletrodo durante a perfusão tubular, em um animal diabético, com solução de glicose 20 mM e bicarbonato 25 mM. Em 1: potencial que representa o pH estacionário tubular; em 2: momento em que ocorre a perfusão da solução experimental; em 3: recuperação do pH; em 4: potencial que representa o pH estacionário ao final da perfusão.

O valor de pH obtido da maneira exposta acima foi utilizado para determinar a concentração de bicarbonato na solução tal como demonstra a equação de Henderson-Hasselbach, considerando a pCO_2 tubular igual ao do sangue arterial (Mello-Aires, *et al.*, 1990 e Malnic; 1980).

A taxa de acidificação tubular foi expressa como a meia vida da redução da concentração de íon bicarbonato (HCO_3^-) ao nível estacionário ($t^{1/2}$). O nível de reabsorção de HCO_3^- ($J_{\text{HCO}_3^-}$) foi calculado através da equação:

$$J_{\text{HCO}_3^-} = \frac{\ln 2}{t^{1/2}} (\text{HCO}_3^-_o - \text{HCO}_3^-_s) * \frac{r}{2}$$

Onde $t^{1/2}$ é a meia vida da reabsorção de bicarbonato, r é o raio do túbulo, e $[\text{HCO}_3^-]_o$ e $[\text{HCO}_3^-]_s$ são as concentrações de HCO_3^- injetada e HCO_3^- a nível estacionário, respectivamente.

Após a obtenção das curvas experimentais e da aquisição de valores de $t^{1/2}$, $J_{\text{HCO}_3^-}$, HCO_3^- estacionário e pH estacionário foi realizada análise estatística para determinar a significância das diferenças entre os grupos experimentais.

Porém, para se realizar a técnica de microperfusão é necessário que se prepare as micropipetas e os microeletrodos com antecedência. Os microeletrodos foram preparados seguindo o método descrito por Ammann *et al.*, 1981. Foram utilizados, para confeccionar os microeletrodos, capilares duplos do tipo Hilgenbeg (Malsfeld, Alemanha), assimétricos, com o ramo de maior raio medindo 1,6 mm de diâmetro e o ramo de menor raio medindo 0,8 mm de diâmetro. Estes capilares foram estirados verticalmente utilizando-se um estirador de micropipetas/microeletrodos (Narishige, modelo P2, Japan), de forma a obter-se diâmetro de ponta de aproximadamente 1 μm .

Devido à natureza apolar da resina que foi utilizada no ramo de maior diâmetro, este ramo passou pelo processo de silanização (hidrofobização). Este processo consiste na reação dos grupos hidroxila do vidro com o átomo de silício do composto orgânico Hexamethyldisilano (Fluka Chemika, Buchs, Suíça). Para realizar a silanização, as extremidades sem ponta dos capilares devidamente estirados (pelo processo acima citado), foram colocadas em uma tampa com uma vedação de borracha perfurada adaptada à fixação dos microeletrodos. Para isso, o ramo de menor diâmetro teve de ser seccionado na extremidade sem ponta reduzindo-se seu comprimento (o ramo de maior diâmetro ficou com um comprimento maior que o de menor diâmetro), uma vez que o ramo menor não deve sofrer o processo de silanização para obter uma medida experimental adequada. A tampa contendo os eletrodos foi então rosquiada a um frasco de vidro de 15 cm de altura e 5 cm de diâmetro contendo em seu interior 0,2 ml de Hexamethyldisilano. O frasco com os microeletrodos foi colocado em uma capela de

fluxo por 30 minutos. O vapor do composto entra em contato com a parede do vidro para que a reação de hidrofobização ocorra.

O microeletrodo assim preparado era então preenchido com uma resina hidrofóbica sensível ao H^+ (Fluka Chemika, Buchs, Suíça) em seu maior ramo. A adição dessa resina foi realizada utilizando-se um capilar de vidro estirado manualmente em chama no bico de Bunsen. Estes eletrodos, preenchidos com resina, apresentam uma boa resposta à atividade do íon H^+ em uma faixa de pH de 5,5 a 12, sem interferência de outros íons (Ammann, *et al.*, 1981 e Lopes e Malnic, 1988). Devido à resistência elétrica do eletrodo de pH ser relativamente baixa (10^8 a 10^{10} ohm), para pontas entre 0,8-1,0 μm , seu tempo de resposta é rápido, sendo de aproximadamente 0,5 s. Esta última característica os faz particularmente adequados para estudos da cinética da acidificação ou alcalinização tubular, como os realizados neste trabalho. Após ser preenchido com resina, o microeletrodo foi colocado em dissecador para ser utilizado no dia do experimento.

No momento do experimento, foi adicionado, no ramo de menor diâmetro, também com o auxílio de um capilar de vidro estirado, solução de KCl 1 M corada com verde FDC. Neste mesmo ramo foi colocado um fio de prata de 0,5 mm previamente cloretado. O processo de cloretação foi realizado fixando o fio de prata a um jacaré ligado ao pólo positivo de uma bateria de 9 volts. O fio foi então mergulhado em uma solução de HCl 0,2 N. No outro pólo da bateria havia um arame de prata que também foi mergulhado na solução de HCL 0,2 N. Ocorre, desta maneira, deposição de cloreto de prata no fio de prata através de reação de oxiredução entre a solução e o fio. Este ramo do microeletrodo é utilizado como referência para a medida de diferença de potencial transtubular e possui resistência de aproximadamente 10 μ Ohm e potencial de ponta de menos de 10 mV.

No ramo previamente preenchido com resina, no dia do experimento, foi adicionada acima da resina, com o auxílio de um capilar de vidro estendido manualmente em chama no bico de Bunsen, solução salina contendo NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 10 mM e NaH_2PO_4 10 mM e ajustada para um pH 7,0.

Para confeccionar as micropipetas duplas, foram utilizados capilares duplos do tipo Theta (R&D. optical systems, Inc., Spencerville, MD, USA), com 2 mm de diâmetro total e divididos ao meio formando dois ramos simétricos. Estes capilares foram estirados verticalmente utilizando-se um estirador de micropipetas/microeletrodos (Narishige, modelo P2, Japan), de forma a obter-se

diâmetro de ponta de aproximadamente 12 a 15 μm . A pipeta foi então afiada utilizando-se um microesmeril (Fabricado na oficina do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, USP) para permitir a obtenção de um bixel. Esta foi então guardada em uma caixa e fixada com massa de modelar.

No dia do experimento a micropipeta dupla é preparada para se dar início ao procedimento. Um dos ramos foi preenchido com óleo de ricínio corado com negro Sudan (Sudan-black). O outro ramo foi preenchido com as soluções perfusoras, descritas anteriormente.

A aquisição de dados foi feita por programa da Lynx (InsSyS Corp, USA), sendo os dados depois exportados para o Excell (Microsoft, USA). No Excell, a partir dos valores tubulares e de calibração obtidos para cada eletrodo, os valores de pH, HCO_3^- , $t^{1/2}$ e JHCO_3^- foram calculados por um programa VisualBasic elaborado por um técnico de computação.

3.3.2 Indução de Diabetes por Streptozotocina

A indução de diabetes mellitus em ratos Wistar foi realizada de acordo com Allen e Tesch (2007). Ratos Wistar pesando entre 150 g e 250 g foram deixados em jejum alimentar por 24 horas, com livre acesso a água, antes da indução. No dia da aplicação da droga foram pesados e marcados. Utilizando um frasco com tampa, os animais foram sedados com éter. A veia peniana foi a via utilizada para a aplicação de Streptozotocina na dose de 60 mg/Kg de peso vivo.

A diluição da droga foi realizada no próprio dia do experimento. Para realizar a diluição utilizou-se tampão de citrato de sódio 10 mM (preparado na hora ou congelado em alíquotas), que teve seu pH ajustado em 4.5 utilizando HCl. A quantidade de Streptozotocina a ser utilizada foi calculada de acordo com o peso corporal dos animais.

Seis dias após a administração da droga, os animais foram deixados em jejum de 8 horas, pela manhã, para mensuração da glicemia utilizando-se um glicosímetro (Accucheck Advantage II, Roche, USA). A amostra de sangue foi obtida através de um corte, produzido com uma tesoura, na ponta da cauda. Animais com glicemia de jejum inferior a 200 mg/dl foram excluídos dos experimentos. Neste mesmo dia, os animais eram pesados para posterior análise de ganho de peso entre os grupos. No 10º dia após o tratamento, os animais eram novamente pesados e posteriormente anestesiados com quetamina (0,1 ml/100g de peso vivo) e xilazina (0,1 ml/300g de peso vivo) para coleta

de sangue ventricular, utilizado para medida de pH, pCO₂, pO₂ e HCO₃⁻ séricos. Após a coleta do sangue os animais tiveram seus rins retirados para futura realização de procedimento de Western Blot. Um grupo de animais não tratados foi submetido aos mesmos procedimentos.

Uma parte dos animais tratados foi submetida ao procedimento de microperfusão estacionária após o 6º dia de tratamento para avaliação de pH, HCO₃⁻, t^{1/2} e JHCO₃⁻ conforme descrito anteriormente (grupos experimentais).

3.3.3 Inibição do SGLT e Indução de Glicosúria por Florizina

Para se obter glicosúria por inibição do transporte tubular de glicose, ratos Wistar, pesando entre 150 e 250 g, foram tratados com Florizina. A Florizina (glucose,1-[2-(beta.D-glucopyranosyloxy)-4,6-dihydroxyphenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanone) é um membro da família dos dihidrocalcones extraído de diversas árvores frutíferas, sendo encontrado em altas concentrações na macieira. Sua molécula consiste de uma glicose e dois anéis aromáticos unidos por um radical alquila entre eles (figura 12). Essa substância é inibidora do co-transportador sódio-glicose intestinal e renal e seu uso resulta em glicosúria (Roth *et al.*, 2005).

Figura 12- Representação da estrutura química da Florizina (Ehrenkranz, *et al.*, 2005).

A indução de glicosúria em ratos Wistar por Florizina foi realizada através de aplicações diárias de Florizina na dose de 0,4 g/Kg de peso corporal (Leroith, *et al.*, 2004 e Defronzo, *et al.*, 1987), pela via subcutânea, uma vez ao dia (Leroith, *et al.*, 2004). A utilização deste fármaco via oral não foi realizada devido a evidências apontadas por Deeds, *et al.*, (1958) e Rémésy, *et al.*, (2001) de que este é biodegradado no intestino e biotransformado em Floretin, um análogo da Florizina sem atividade

sobre os SGLTs. Portanto, a Florizina não induz glicosúria quando administrada por esta via.

A Florizina foi diluída em solução composta por 20% de etanol, 30% de DMSO e 50% de salina (cloreto de sódio 0,9%). Para cada 100 g de animal foi administrado um volume de 0,2 ml de solução que correspondia a dose necessária para este peso, isto é, 40 mg de Florizina.

No sexto dia de tratamento os animais foram deixados em jejum por 8 horas, pela manhã, para mensuração da glicemia utilizando-se um glicosímetro (Accucheck Advantage II, Roche, USA). A amostra de sangue foi obtida através de um corte, produzido com uma tesoura, na ponta da cauda. Nesse mesmo dia os animais tiveram seu peso anotado para posterior análise de ganho de peso entre os grupos. No 10º dia de tratamento os animais foram pesados e posteriormente anestesiados com quetamina (0,1ml/100g de peso vivo) e xilazina (0,1ml/300g de peso vivo) para coleta de sangue ventricular, utilizado para medida de pH, pCO₂, pO₂ e HCO₃⁻ séricos. Após a coleta do sangue os animais tiveram seus rins retirados para futura realização de procedimento de Wersten Blot. Um grupo de animais não tratados foi submetido aos mesmos procedimentos.

Uma parte dos animais tratados foi submetida ao procedimento de microperfusão estacionária após o 6º dia de tratamento para avaliação de pH, HCO₃⁻, t^{1/2} e JHCO₃⁻ conforme descrito anteriormente (grupos experimentais).

3.3.4 Medida de Clearance e Fração de Excreção

Animais normais ou tratados com Streptozotocina ou Florizina, após 6 dias do tratamento, foram colocados em gaiolas metabólicas (Tecniplast, Buguggiate, Italy) para separar amostras de urina das fezes. O consumo de água e o volume de urina produzido foram medidos em intervalos de 24 horas por 2 a 4 dias consecutivos. Foram utilizados um total de 4 a 8 ratos para cada grupo experimental. Foram mensuradas as concentrações de Na⁺, K⁺ e creatinina urinária.

Ao final dos 2 a 4 dias em que foram deixados na gaiola metabólica, os animais foram sedados com éter para coleta de sangue do plexo ocular. Esse sangue foi colocado em tubos contendo heparina e centrifugados para obtenção do plasma. Foram mensuradas as concentrações de Na⁺, K⁺, e creatinina plasmática.

Após a coleta da urina produzida em intervalos de 24 horas, fez-se média do volume urinado por minuto, dependendo do intervalo de tempo que cada animal permaneceu na gaiola entre o início do armazenamento da urina e o momento da coleta, calculando-se portanto, o fluxo urinário. Temos que, o fluxo urinário, em ml/min, é obtido dividindo-se o volume urinário total pelo intervalo de tempo, em minutos, entre o início do armazenamento da urina e o momento de sua coleta, como demonstra a equação abaixo:

$$\bar{V} = \frac{V}{t}$$

Em que:

$\bar{V}$ = Fluxo, ml / min

V = volume de urina total, ml

t = tempo, min.

A partir do valor de fluxo obtido, para cada animal, foi calculado o ritmo de filtração glomerular. O valor de ritmo de filtração glomerular foi calculado através do clearance de creatinina, em ml/min. Este é obtido multiplicando-se o fluxo urinário, em ml/min, pela concentração urinária de creatinina (em mg/L) e dividindo-se o resultado desta multiplicação pela concentração plasmática de creatinina (mg/L), como descrito na equação abaixo:

$$C_{creat} = \frac{\bar{V} \cdot U_{Creat}}{P_{Creat}}$$

Em que:

C_{Creat} = Clearance de Creatinina, ml / min

$\bar{V}$ = Fluxo urinário, ml / min

U_{Creat} = concentração urinária de Creatinina, mg / L

P_{Creat} = concentração plasmática de Creatinina, mg / L

A partir dos valores de Na^+ e K^+ plasmático e urinário, foi calculada a fração de excreção de sódio e potássio. A fração de excreção é a razão entre a quantidade excretada e filtrada da substância em questão. Para tanto, divide-se a carga excretada pela carga filtrada do composto. A carga excretada (em, mmoles/min ou mEq/min) é a quantidade do composto que foi excretada, por unidade de tempo. A carga excretada é obtida multiplicando-se o fluxo urinário (em ml/min) pela concentração urinária (mM

ou mEq/L) do composto. Carga filtrada (em mmoles/min ou mEq/min), por sua vez, é a quantidade do composto que é filtrada no glomérulo por unidade de tempo. A carga filtrada é obtida multiplicando-se a concentração plasmática (mM ou mEq/L) do composto pelo ritmo de filtração glomerular (este é obtido a partir do clearance de creatinina, como exposto anteriormente). A equação abaixo representa a fração de excreção de um composto X qualquer:

$$FE_X = \frac{\bar{V} \cdot U_X}{RFG \cdot P_X}$$

Em que:

FE_X = Fração de excreção da substância X (mmol ou mEq / min)

$\bar{V}$ = fluxo urinário (ml / min)

U_X = concentração urinária de X (mmol ou mEq / L)

RFG = ritmo de filtração glomerular (ml / min)

P_X = concentração plasmática de X (mmol ou mEq / L)

A creatinina urinária foi mensurada, para obtenção dos dados relacionados acima, pelo método de Jaffé, a partir da leitura da absorção de comprimento de onda com leitura a 520 nM em um espectrofotômetro (μ-Quant, BioTech Instruments, London). Os gases e pH séricos foram medidos em um analisador de gases (ABL5, Radiometer, Brasil). A creatinina sérica foi mensurada em laboratório veterinário (Núcleo Diagnóstico, São Paulo, Brasil) pelo método cinético (Bio 200 F, São Paulo, Brasil). A mensuração de Na⁺ e K⁺ urinários e séricos foi realizada em um analisador de eletrólitos (9180 Electrolyte Analyser, Roche, USA).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas foram feitas por análise de variância com contrastes por Tukey, tendo a probabilidade de 0,05 (5%) como o limite de significância (exceto para fluxo urinário, ver abaixo). Em experimentos nos quais havia resultados de mais de um intervalo de tempo, para os mesmos grupos (pe. glicemia, peso), as médias de cada grupo foram comparadas apenas para o mesmo intervalo de tratamento. Em experimentos que apenas dois grupos foram analisados (tratado com Florizina VS não tratado com solução de glicose 5 mM) utilizou-se teste T não pareado.

Para análise estatística de fluxo urinário foi utilizado ANOVA não paramétrica utilizando o teste de Dunn como pós-teste, pois havia uma diferença muito grande entre os grupos.

4 RESULTADOS OBTIDOS

4.1 EFEITO DE PERFUSÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA CINÉTICA DE ACIDIFICAÇÃO TUBULAR

Para realizar estes experimentos, foram utilizados ratos Wistar machos. Cada animal utilizado teve de 1 a 4 túbulos renais perfundidos, sendo realizadas, em cada túbulo perfundido, 3 a 15 perfusões estacionárias. Estas deram origem, cada uma, a um valor de pH estacionário, bicarbonato estacionário, $\frac{1}{2}$ vida de acidificação e a partir desses, fluxo de próton por cm^2 de superfície tubular.

O protocolo experimental padrão envolvia a microperfusão com uma solução contendo 20 mM de bicarbonato. A esta solução foi acrescido: 5 mM de glicose, 20 mM de glicose ou 0 mM de glicose e Florizina 0,5 mM, para obtenção dos parâmetros citados no parágrafo anterior. Os valores médios (tabela 2) foram comparados entre si e estão plotados nos gráficos de 1 a 3 (exceto pH estacionário), que expressam as médias de fluxo de bicarbonato, $t^{1/2}$ e HCO_3^- estacionário, para cada um dos grupos.

Podemos observar no gráfico 1, que a microperfusão com soluções contendo três diferentes concentrações de glicose: glicose 5 mM, 20 mM e 0 mM acrescida de inibidor do transporte de glicose, ocasiona modificação do fluxo de reabsorção de bicarbonato no seguimento proximal do túbulo renal. Verificamos um efeito bifásico: a perfusão com solução sem glicose e inibidor do SGLT ocasionou um decréscimo de fluxo de bicarbonato se comparada com a perfusão com solução contendo glicose 5 mM (concentração fisiológica de glicose). Porém, perfusões com solução contendo alta concentração de glicose (glicose 20 mM), que ocasiona sobrecarga aguda do SGLT tubular, provocaram diminuição do fluxo de bicarbonato e portanto, queda na atividade do NHE (tendo em vista que a maior parte do bicarbonato reabsorvido o seja por este transportador (Malnic, 1988)). Podemos, com esses experimentos, observar que o NHE é modulado pela perfusão com diferentes concentrações de glicose, em um animal normal, de maneira a inibir sua atividade tanto com aumentos da concentração de glicose quanto na ausência de glicose e inibidor do co-transportador responsável por seu transporte, se comparado com a perfusão com solução contendo glicose 5 mM.

Além de avaliar o fluxo de reabsorção de bicarbonato, avaliamos também a meia vida de reabsorção de bicarbonato, que indica a velocidade de reabsorção de HCO_3^- ($t^{1/2}$

é inversamente proporcional a esta velocidade). Observamos, como mostra o gráfico 2, que perfusões com 0 mM de glicose e Florizina ou com glicose 20 mM aumentam a meia vida de acidificação, se comparada com perfusões com glicose 5 mM. Porém, a magnitude desse aumento difere entre os grupos, sendo mais acentuado no grupo perfundido com solução sem glicose. Esses resultados refletem os resultados encontrados para fluxo de bicarbonato, como discutido anteriormente e, portanto, são esperados. Sendo assim, verificamos que além de haver modificações do fluxo de bicarbonato, perfusões com diferentes concentrações de glicose modificam a meia vida de acidificação tubular.

Tabela 2- Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$), bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) e pH em túbulos proximais renais, de ratos normais, perfundidos com diferentes concentrações de glicose.

Parâmetro avaliado	Glicose 5mM	Glicose 20mM	Glicose 0mM + Florizina
JHCO_3^- (nmol/cm ² /s)	2,87 ±0,25	1,84 ±0,15 **	0,89 ±0,11 ***
$t^{1/2}$ (s)	2,67 ±0,22	4,85 ±0,39	6,07 ±0,63
HCO_3^- estacionário (mM)	8,07 ±1,32	5,34 ±0,53	11,58 ±2,27 *
pH estacionário	6,83 ±0,15	6,77 ±0,04	7,08 ±0,09
Médias ± erro padrão, *** P<0,001 vs Glicose 5mM; ** P<0,01 vs Glicose 5mM			
* P<0,05 vs Glicose 20mM			

Além da meia vida e do fluxo de bicarbonato, aferimos também a concentração estacionária de bicarbonato em mM (gráfico 3). Verificamos que perfusões sem glicose com Florizina 0,5 mM diminuem a reabsorção global de bicarbonato, evidenciada pela elevação da concentração final de bicarbonato. Esse resultado confirma os dados de fluxo e $t^{1/2}$, indicando que, além de ocorrer queda do fluxo de bicarbonato e da meia vida de acidificação, há também queda do gradiente final de bicarbonato.

Perfusões com glicose 20 mM, por sua vez, nos forneceram resultados que demonstram uma tendência em reduzir o bicarbonato estacionário, o que nos leva a acreditar que, apesar de inibir o fluxo e reduzir o $t^{1/2}$ e portanto, diminuir a atividade do NHE, a perfusão com solução

Glicose 20 mM eleva o gradiente final de bicarbonato. Ainda não há dados suficientes para determinar o motivo pelo qual essas alterações ocorreram.

Gráfico 1- Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 + Floriz) (N=9), sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato. *** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM; ** $P < 0,01$ vs Glicose 5 mM; * $P < 0,05$ vs Glicose 20 mM.

Gráfico 2- Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 + Floriz) (N=9), sobre a meia vida de reabsorção de bicarbonato. ** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM; * $P < 0,01$ vs Glicose 5 mM.

Gráfico 3- Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 + Floriz) (N=9), sobre o bicarbonato estacionário. * $P < 0,05$ vs Glicose 20 mM.

4.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SINALIZADORAS RESPONSÁVEIS PELA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO NHE3

O experimento anterior demonstrou que perfusões com diferentes concentrações de glicose modulam o fluxo de bicarbonato, a meia vida de acidificação tubular e o bicarbonato estacionário do túbulo proximal de ratos normais. Com este experimento verificou-se que a perfusão com solução de glicose 5 mM estimula a atividade do NHE3, se comparado com a perfusão com solução sem glicose com Florizina 0,5 mM ou com glicose 20 mM. Com o intuito de verificar se a atividade do NHE foi modulada, durante perfusão de solução contendo glicose 5 mM, através da p38-MAPKAPKinase, da PI3-Kinase e da PKA, foi realizada a perfusão de túbulos renais com soluções contendo glicose 5 mM porém adicionadas de inibidores dessas proteínas de sinalização. Para se obter um efeito inibitório dessas vias é necessário um período de tempo, por isso, as curvas iniciais obtidas pela perfusão da solução experimental contendo essas drogas foram excluídas, e somente as curvas experimentais finais foram usadas para calcular as médias. A tabela 3 mostra os valores médios para perfusões com Glicose 5 mMol, Glicose 5 mM + PD169316 10 μ M, Glicose 5 mM + LY294002 50 μ M e Glicose 5 mM + H89 10 μ M. As médias de perfusões com solução sem glicose + Florizina 0,5 mM e de glicose 20 mM foram adicionadas para efeito de comparação. Esses dados foram diagramados nos gráficos de 4 a 7.

Tabela 3- Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$) e bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) em túbulos proximais renais, de ratos normais, perfundidos com glicose 5 mM + inibidores.

Parâmetro avaliado	Glicose 5mM	Glicose 20mM	Glicose 0mM + Florizina	Glicose 5mM + PD169316	Glicose 5mM + LY294002	Glicose 5mM + H89
JHCO_3^- (nmol/cm ² /s)	2,87 ± 0,25	1,84 ± 0,15 [#]	0,89 ± 0,11 *	0,72 ± 0,09 *	0,83 ± 0,10 *	3,46 ± 0,45 [#]
$t^{1/2}$ (s)	2,67 ± 0,22 ^{&}	4,85 ± 0,39	6,07 ± 0,63 *	7,70 ± 0,69 *, [#]	6,96 ± 0,77 *	2,98 ± 0,30
HCO_3^- estacionário (mM)	8,07 ± 1,32	5,34 ± 0,53	11,58 ± 2,27 *, [@]	12,60 ± 1,60 ^{&,\$}	12,93 ± 1,04 ^{&,\$}	5,15 ± 1,03
pH estacionário	6,83 ± 0,15	6,77 ± 0,04	7,08 ± 0,09	7,15 ± 0,70 [@]	7,18 ± 0,03 [@]	6,66 ± 0,10

Médias ± erro padrão, * P<0,001 vs Glíc 5 e H89; [#] P<0,01 vs Glíc 20; & P<0,05 vs Glíc 20; [@] P<0,05 vs H89; \$ P<0,01 vs H89.

Como dito anteriormente, a atividade do NHE é estimulada durante perfusão com glicose 5 mM, se comparada à perfusão com solução sem glicose e Florizina 0,5 mM; sendo que a perfusão de glicose 20 mM possui um efeito intermediário. Foi possível verificar, como mostra o gráfico 4, que o uso de inibidores da p38-MAPKAPKinase (PD169316 10 µM) e PI3-Kinase (LY294002 50 µM) em solução contendo glicose 5 mM inibiram o fluxo de bicarbonato na mesma proporção que o fez a utilização de inibidor do co-transportador SGLT (Florizina 0,5 mM) na ausência de glicose. Porém, perfusões com inibidor da PKA não inibiram o fluxo de bicarbonato.

Os experimentos de microperfusão, como esperado pela observação dos resultados de fluxo de bicarbonato (gráfico 5), indicam que a meia vida de acidificação aumentou consideravelmente nos grupos com inibidores (exceto H89, o qual não ocasionou alteração), uma vez que o trocador foi inibido, com conseqüente diminuição da velocidade de extrusão de íons H^+ .

Além do fluxo e da meia vida de acidificação, é possível se verificar uma tendência de aumento do bicarbonato estacionário (gráfico 6), indicando que, não só a velocidade da atividade do trocador foi modulada, mas também o potencial eletroquímico de equilíbrio, com a utilização dos inibidores PD169316 e LY294002. Estes dados corroboram com a possibilidade de haver uma diminuição da quantidade de proteínas transportadoras inseridas na membrana, diminuindo assim, a massa de bicarbonato que pode ser reabsorvida, e nos indicam o papel de proteínas de

citoesqueleto e a provável endocitose/inserção das proteínas transportadoras, na membrana apical, como forma de modulá-las. Porém, os túbulos perfundidos com H89 10 μ M apresentaram tendência de decréscimo da concentração estacionária de bicarbonato, a um valor semelhante ao encontrado para o grupo perfundido com solução de glicose 20 mM. Aparentemente, a utilização de inibidor da PKA com glicose 5 mM, aumenta o potencial eletroquímico para secreção de hidrogênio, tal como a perfusão aguda de solução concentrada em glicose (glicose 20 mM).

Gráfico 4- Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Phlor)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre o fluxo de reabsorção de bicarbonato. ** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM e Glicose 5 mM + H89; * $P < 0,01$ vs Glicose 5 mM + H89.

É possível se perceber, como diagramado no gráfico 7, que não há diferenças no pH final do túbulo em nenhum dos grupos em relação a glicose 5 mM (condição fisiológica), porém houve diferenças entre os grupos com os inibidores PD169316 e LY294002 e o grupo com H89. Este resultado é esperado, pois o grupo perfundido com inibidores apresentou redução da reabsorção de bicarbonato (tal como o grupo perfundido com Florizina e sem glicose), enquanto que o grupo com H89 apresentou maior reabsorção de bicarbonato (tal como o grupo com glicose 20 mM).

Gráfico 5- Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Floriz)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre meia vida de reabsorção de bicarbonato. *** $P < 0,001$ vs Glicose 5 mM e Glicose 5 mM + H89; ** $P < 0,01$ vs Glicose 20 mM; * $P < 0,05$ vs Glicose 5 mM.

Gráfico 6- Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Floriz)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre a concentração estacionária de bicarbonato. *** $P < 0,01$ vs H89; ** $P < 0,05$ vs Glicose 20 mM; * $P < 0,05$ vs H89.

Gráfico 7- Efeito de perfusões de solução com diferentes concentrações de glicose: 5 mM (Glic 5 mM) (N=13), 20 mM (Glic 20 mM) (N=8) e sem glicose com o inibidor de SGLT Florizina 0,5 mM (Glic 0 Floriz)(N=9) e de perfusões de solução de glicose 5 mM contendo inibidores de: p38-MAPKAPKinase (PD169316) (N=9), PI3-Kinase (LY2940020) (N=8), PKA (H89) (N=11), sobre o pH estacionário. * $P < 0,05$ vs Glicose 5 mM + H89.

4.3 CARACTERIZAÇÃO E FUNÇÃO RENAL DE ANIMAIS SEM TRATAMENTO, TRATADOS COM STREPTOZOTOCINA (DIABÉTICOS) E TRATADOS COM FLORIZINA.

Como descrito nos métodos, ratos wistar machos foram submetidos a dois diferentes protocolos de tratamento com o intuito de se obter glicosúria por duas causas distintas: por hiperglicemia, cuja consequência é a sobrecarga do SGLT tubular com consequente excreção de glicose; e por inibição do transporte de glicose no túbulo proximal, que também ocasiona glicosúria. A fim de se caracterizar os grupos experimentais, mediram-se diversos parâmetros. O primeiro parâmetro avaliado foi o fluxo urinário (após 6º dia de tratamento, em gaiola metabólica) com o intuito de determinar a ocorrência de poliúria. A tabela 4 apresenta as médias de fluxo para cada grupo e seus valores estão expressos no gráfico 8. Os primeiros sinais de poliúria, evidenciados pelo aumento significativo da umidade da serragem presente nas caixas, puderam ser observados já nos 2 primeiros dias de tratamento em ambos os tratamentos. Porém, apenas após o 6º dia de tratamento, os animais foram colocados em gaiola metabólica para coleta de urina de 24 horas para então ser calculado o fluxo urinário em ml/min (que foi posteriormente corrigido pelo peso vivo em Kg). Animais diabéticos

tratados com Streptozotocina apresentaram poliúria acentuada, já os animais tratados com Florizina apresentaram poliúria menos acentuada com a dose utilizada neste trabalho.

Tabela 4- Valores médios de fluxo urinário, em ml/minuto, corrigido por quilo de peso vivo, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.

Grupo	Fluxo Urinário (ml/min/Kg Peso)
Normal	0,03 ±0,001
Diabético	0,66 ±0,03 *
Florizina	0,07 ±0,004 #

Médias ± erro padrão,
 * P<0,001 vs Normal e Florizina
 # P<0,01 vs Normal

Gráfico 8- Fluxo urinário, em ml/min corrigidos por Kg de peso vivo, de animais diabéticos (N=32), tratados com Florizina (N=22) e não tratados (Normal) (N=24) alojados em gaiola metabólica com coleta de urina em um intervalo de 24 horas. * P<0,001 vs tratado com Florizina e não tratado.

Além de se avaliar o aumento de fluxo urinário, mediu-se também a glicemia de jejum, ao 6º dia de tratamento e a glicemia sem jejum ao 10º dia de tratamento. A tabela 5 apresenta as médias das glicemias para cada um dos grupos nos dias e condições citados anteriormente e seus valores foram plotados no gráfico 9.

Tabela 5- Valores médios de glicemia de jejum ao 6º dia de tratamento ou sem jejum ao 10º dia de tratamento, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.

Grupo	Glicemia (mg/dl) 6º dia	Glicemia (mg/dl) 10º dia
Normal	86,68 ±2,29	96,87 ±2,75
Diabético	382,74 ±20,23 *	553,5 ±23,68 *
Florizina	90,66 ±3,99	89,16 ±4,51
Média ± erro padrão, * P<0,001 vs não tratados e Florizina

Gráfico 9- Glicemia, em mg/dl, em jejum ao 6º dia de tratamento e sem jejum ao 10º dia de tratamento, de animais com diabetes induzida por Streptozotocina, tratados com Florizina e não tratados (Normal). * P>0,001 vs Não tratados e tratados com Florizina.

Como esperado, os animais tratados com Streptozotocina, mesmo em jejum, apresentaram elevada concentração sérica de glicose, demonstrando-se incapazes de manter a glicemia e, portanto, apresentando poliúria por sobrecarga de glicose no

SGLT1. Já os animais tratados com Florizina não perderam sua capacidade de manter a glicemia dentro dos parâmetros da normalidade e, portanto, apresentaram glicemias semelhantes aos dos animais não tratados. Verificamos que esses animais apresentaram então, poliúria com glicosúria mesmo estando normoglicêmicos.

Outro parâmetro avaliado foi o ganho de peso relativo (Peso vivo final / Peso vivo inicial) ao 6º dia e ao 10º dia. A tabela 6 mostra os valores médios de ganho de peso relativo para os grupos e condições citados e os mesmos estão plotados no gráfico 10. Como descrito por outros autores, animais tratados com Streptozotocina e portanto diabéticos, apresentaram acentuada perda de peso ($11,41\% \pm 1\%$) até o 6º dia e não apresentaram ganho de peso adicional até o 10º dia. Ao contrário, animais não tratados e tratados com Florizina apresentaram, respectivamente, $8,6\% \pm 1\%$ e $4\% \pm 1\%$ de ganho de peso até o 6º dia, e apresentaram até o 10º dia, $19,1\% \pm 1\%$ e $16,0\% \pm 1\%$ de ganho de peso em relação ao peso inicial, respectivamente. Sendo assim, animais diabéticos inicialmente perdem peso e mantêm-se sem ganho de peso até o 10º dia após início do tratamento, enquanto que animais tratados com Florizina apresentam ganho de peso semelhante ao de animais não tratados.

Tabela 6- *Valores médios de peso relativo (peso vivo final/ peso vivo inicial) ao 6º dia de tratamento e ao 10º dia de tratamento, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.*

Grupo	Δ Peso relativo 6º dia	Δ Peso relativo 10º dia
Normal	$1,08 \pm 0,01$	$1,19 \pm 0,01$
Diabético	$0,88 \pm 0,01$ *	$0,88 \pm 0,02$ *
Florizina	$1,04 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,03$
Média $\pm$ erro padrão, * $P < 0,001$ vs não tratados e Florizina

Gráfico 10- Variação de peso relativa (Peso final/ Peso inicial) em animais com diabetes induzida por Streptozotocina, tratados com Florizina e não tratados (Normal). * $P < 0,001$ vs não tratados e Florizina.

Mediu-se também o pH, pCO_2 , pO_2 e HCO_3^- séricos (sangue arterial) dos animais ao 10º dia de tratamento. As médias obtidas encontram-se na tabela 7 e as médias de pH sérico estão apresentadas no gráfico 11. Os resultados obtidos revelam que animais diabéticos, após o 10º dia de tratamento, apresentam comprometimento do estado ácido-base do organismo com acidose metabólica uma vez que apresentam queda do pH arterial. Animais tratados com Florizina, por sua vez, não apresentam alterações significativas do pH sérico, mantendo portanto, seu estado ácido-base.

Após essa caracterização dos modelos a serem utilizados, fez-se avaliação da função renal na qual mediu-se: ritmo de filtração glomerular (RFG), fração de excreção de sódio ($FE Na^+$) e fração de excreção de potássio ($FE K^+$) como descrito nos métodos. Os valores médios desses parâmetros estão apresentados na tabela 8 e plotados nos gráficos de 12 a 14.

Tabela 7- Valores médios de pH, pCO₂, pO₂ e HCO₃⁻ de sangue arterial ao 10º dia de tratamento, de animais não tratados, diabéticos e tratados com Florizina.

Grupo	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mM)
Normal	7,33 ±0,01	44 ±3,78	39 ±4,1	23 ±2,38
Diabético	7,22 ±0,01 *	50 ±2,57	38 ±6,0	19 ±0,74
Florizina	7,27 ±0,03	42 ±2,99	58 ±6,17	18 ±0,74

Média ± erro padrão, * P<0,001 vs não tratados e Florizina

Gráfico 11- pH sérico ao 10º dia de tratamento em animais com diabetes induzida por Streptozotocina (N=8), tratados com Florizina (N=5) e não tratados (Normal) (N=7). * P<0,01 vs não tratados.

Tabela 8- Valores médios de ritmo de filtração glomerular (RFG), fração de excreção de sódio ($FE\ Na^+$) e fração de excreção de potássio ($FE\ K^+$), de animais não tratados (normais), diabéticos e tratados com Florizina.

Grupo	RFG (ml/min/Kg de peso vivo)	$FE\ Na^+$ (%/Kg de peso vivo)	$FE\ K^+$ (%/Kg de peso vivo)
Normal	21,66 ± 1,30	0,0131 ± 0,004	1,32 ± 0,15
Diabético	29,93 ± 3,62 *	0,040 ± 0,003 **.#	1,55 ± 0,14
Florizina	10,41 ± 1,30	0,162 ± 0,003	0,18 ± 0,03 & @

Média ± erro padrão, * $P < 0,001$ vs tratado com Florizina
 ** $P < 0,001$ vs não tratados; # $P < 0,05$ vs tratados com Florizina
 & $P < 0,001$ vs diabéticos; @ $P < 0,01$ vs não tratados

Gráfico 12- Ritmo de filtração glomerular, em ml/min corrigidos por Kg de peso vivo, de animais diabéticos (N=32), tratados com Florizina (N=8) e não tratados (Normal) (N=24) alojados em gaiola metabólica com coleta de urina em um intervalo de 24 horas. * $P < 0,001$ vs tratado com Florizina.

Podemos verificar, ao olharmos as médias de RFG (gráfico 12) que animais diabéticos apresentam tendência a hiperfiltração se comparado a animais não tratados (não significativo) e que animais tratados com Florizina, na dose utilizada neste trabalho, apresentam tendência de reduzir a filtração glomerular (não significativo).

Ao se observar os valores de $FE\ Na^+$ (gráfico 13), que animais diabéticos apresentam acentuado aumento desse parâmetro. A $FE\ Na^+$ renal é modulada por sistemas hormonais (renina-angiotensina-aldosterona) volume extracelular e pela ingestão e perdas de Na^+ por outros sistemas. É razoável imaginar que animais diabéticos excretem mais Na^+ , uma vez que seu consumo de alimentos é significativamente maior e, conseqüentemente, também seu consumo de sódio. Além disso, animais diabéticos apresentam vasopatias que podem levar a um aumento da resistência vascular e instaurar um quadro hipertensivo no animal. Nesta situação, hormônios e fatores regulatórios podem inibir a reabsorção de sódio, principalmente distal.

Gráfico 13- Fração de excreção de Na^+ , em % corrigida por Kg de peso vivo, de animais diabéticos (32), tratados com Florizina (N=8) e não tratados (Normal) (N=24) alojados em gaiola metabólica com coleta em um intervalo de 24 horas. ** $P < 0,001$ vs não tratados; * $P < 0,05$ vs tratados com Florizina.

Quanto à $FE\ K^+$ (gráfico 14), verificamos que o tratamento com Florizina inibe acentuadamente a $FE\ K^+$ se comparado com animais não tratados e diabéticos. Este efeito modulatório da excreção de potássio deve ocorrer por modulação do transporte apical de K^+ ou por modulação do gradiente de K^+ intracelular por alterar o transporte de K^+ basolateral. Não houve diferenças entre a $FE\ K^+$ dos animais não tratados e a dos animais diabéticos.

Gráfico 14- Fração de excreção de K^+ , em % corrigida por Kg de peso vivo, de animais diabéticos ($N=32$), tratados com Florizina ($N=8$) e não tratados (Normal) ($N=24$) alojados em gaiola metabólica com coleta em um intervalo de 24 horas. ** $P<0,001$ vs diabéticos; * $P<0,01$ vs não tratados.

4.4 EFEITO DE PERFUSÕES COM SOLUÇÃO DE GLICOSE 20 -mM NA CINÉTICA DE ACIDIFICAÇÃO TUBULAR DE ANIMAIS TRATADOS COM STREPTOZOTOCINA, TRATADOS COM FLORIZINA OU NÃO TRATADOS

Animais normais e tratados com Streptozotocina ou com Florizina, foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária “in vivo”, como descrito nos métodos. Foi perfundido, nos três grupos experimentais, solução com glicose 20 mM para avaliar a cinética de acidificação tubular. Obteve-se assim, valores médios de $JHCO_3^-$, $t^{1/2}$, HCO_3^- estacionário e pH estacionário. As médias obtidas para cada grupo dos parâmetros elencados anteriormente estão apresentados na tabela 9 e estão diagramados nos gráficos de 15 a 18.

Como já havia sido descrito anteriormente, a perfusão com solução de glicose 20 mM no túbulo proximal de animais não tratados inibe o fluxo de bicarbonato se comparado com o fluxo de bicarbonato em concentração fisiológica (5 mM) (Gráfico 1). Animais diabéticos perfundidos com esta mesma solução apresentaram reversão desse efeito. Animais tratados com doses diárias de Florizina subcutâneo, não apresentaram efeito inibitório adicional ou qualquer reversão desse efeito (gráfico 15), ao contrário do que se observou durante perfusão na ausência de glicose e utilizando esta mesma droga na luz tubular (Gráfico 1). Nesta condição (perfusão intratubular de Florizina sem glicose), a inibição do fluxo de bicarbonato foi mais pronunciada que a obtida pela perfusão de glicose 20 mM.

Tabela 9- Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$), bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) e pH estacionário, de túbulos proximais renais, de animais não tratados (normal), diabéticos ou tratados com Florizina, perfundidos com glicose 20 mM.

Parâmetro avaliado	Normal	Diabético	Florizina
JHCO_3^- (nmol/cm ² /s)	1,56 ± 0,11	2,02 ± 0,11 * #	1,45 ± 0,12
$t^{1/2}$ (s)	6,76 ± 0,68	6,57 ± 0,36	8,04 ± 0,81
HCO_3^- estacionário (mM)	4,17 ± 0,53	2,00 ± 0,39 *	5,46 ± 0,99
pH estacionário	6,62 ± 0,06	6,11 ± 0,15 *	6,68 ± 0,07

*Médias ± erro padrão, * $P < 0,01$ vs Florizina; # $P < 0,05$ vs Normal.*

Gráfico 15- Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16), sobre o fluxo de bicarbonato. ** $P < 0,01$ vs tratados com Florizina; * $P < 0,05$ vs não tratados.

Anteriormente foi descrito também, que a meia vida de acidificação tubular de animais normais submetidos à perfusão de solução contendo glicose 20 mM era maior que aquela observada em animais normais perfundidos com solução 5 mM (concentração fisiológica) (gráfico 2). A perfusão com solução 20 mM nos túbulos de animais diabéticos ou tratados com Florizina, não ocasionou alterações na meia vida de acidificação tubular (gráfico 16).

Gráfico 16- Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16), sobre a meia vida de reabsorção de bicarbonato .

Além disso, animais normais quando perfundidos com solução contendo alta concentração de glicose (20 mM) apresentavam uma tendência a diminuir o bicarbonato estacionário (Gráfico 3). Ao perfundirmos solução de glicose 20 mM em túbulos de animais diabéticos verificou-se que o bicarbonato estacionário reduziu-se significativamente (gráfico 17). É necessário fazer um paralelismo com os valores séricos de pH desses animais ao 10º dia de tratamento (Gráfico 11) e considerar que o equilíbrio ácido-base nesse modelo experimental está deslocado. Sendo assim, a queda da concentração de HCO_3^- pode estar sendo influenciado pelo estado acidótico em que o animal se encontra.

Os animais tratados com Florizina, que apresentavam-se em equilíbrio ácido-base, demonstram uma tendência de elevação do bicarbonato estacionário, se comparados com animais não tratados (gráfico 17). Isso indica que o tratamento com Florizina subcutâneo diminui o gradiente trans-epitelial final de bicarbonato. O mesmo resultado foi obtido durante perfusão de Florizina na ausência de glicose (gráfico 3), como relatado anteriormente neste trabalho.

Em relação ao pH estacionário, como esperado, animais diabéticos apresentaram tendência a redução do pH estacionário intratubular, enquanto que animais tratados com Florizina apresentaram pH intratubular estacionário semelhante ao controle (gráfico 18). Esse achado é condizente com os valores obtidos para bicarbonato estacionário. Em animais diabéticos, tanto as alterações de pH estacionário quanto de bicarbonato estacionário, podem ser atribuídas ao estado ácido-base do organismo. Porém, em animais tratados com Florizina não observou-se mudanças do equilíbrio ácido-base que justifiquem a tendência de elevação do bicarbonato estacionário sem elevação do pH estacionário.

Gráfico 17- Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM sobre fluxo de reabsorção de bicarbonato em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16), sobre o bicarbonato estacionário. * $P < 0,01$ vs tratados com Florizina.

Gráfico 18- Efeito de perfusões de solução de glicose 20 mM sobre fluxo de reabsorção de bicarbonato em animais diabéticos (N=15), tratados com Florizina (N=17) e não tratados (Normal) (N=16). * $P < 0,01$ vs Florizina.

5.5 AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO DE BICARBONATO NO TÚBULO PROXIMAL DE RATOS NÃO TRATADOS E TRATADOS COM FLORIZINA DURANTE PERFUSÃO DE GLICOSE 5 mM

Animais normais ou tratados com Florizina, utilizando-se a técnica de microperfusão estacionária ‘in vivo’, tiveram seus túbulos proximais perfundidos com solução de glicose 5 mM para se avaliar se a cinética de reabsorção de bicarbonato se altera, durante perfusão desta solução, em animais tratados com Florizina.

Obteve-se com este experimento valores de JHCO_3^- , $t^{1/2}$, HCO_3^- estacionário e pH estacionário. As médias obtidas para cada grupo dos parâmetros elencados acima encontram-se na tabela 10 e foram projetados nos gráficos 19 a 22. Os valores médios (para estes parâmetros) durante perfusão de glicose 20 mM em animais tratados com Florizina e não tratados foram projetados no mesmo gráfico para facilitar a comparação dos dados aqui avaliados com os dados anteriores.

Tabela 10- Valores médios de fluxo de bicarbonato (JHCO_3^-), meia vida de reabsorção de bicarbonato ($t^{1/2}$), bicarbonato estacionário (HCO_3^- estacionário) e pH estacionário, de túbulos proximais renais perfundidos com solução de glicose 5 mM (G5) ou glicose 20 mM (G20), de animais não tratados (Normal) ou tratados com Florizina (Florizina).

Parâmetro avaliado	Normal G5	Florizina G5	Normal G20	Florizina G20
JHCO_3^- (nmol/cm ² /s)	2,87 ±0,25	1,46 ±0,06 *	1,56 ±0,11	1,45 ±0,12
$t^{1/2}$ (s)	2,67 ±0,22	8,06 ±0,37 *	6,76 ±0,68	8,04 ±0,81
HCO_3^- estacionário (mM)	8,07 ±1,32	3,35 ±0,71 #	4,17 ±0,53	5,46 ±0,99
pH estacionário	6,83 ±0,15	6,42 ±0,12 §	6,62 ±0,06	6,68 ±0,07
Médias ± erro padrão, * $P < 0,0001$ vs Normal; # $P < 0,005$ vs Normal; § $P < 0,05$ vs Normal.				

No gráfico 19 podemos verificar que os animais que foram tratados com Florizina apresentaram acentuada queda do fluxo de reabsorção de bicarbonato durante perfusão com glicose 5 mM se comparado com os animais não tratados perfundidos com esta mesma solução. Este efeito inibitório foi de mesma magnitude que o observado anteriormente durante perfusão de glicose 20 mM em animais normais, sendo

que não foi visto efeito inibitório adicional quando animais tratados com Florizina foram perfundidos com solução de glicose 20 mM.

Como expresso no gráfico 20, a meia vida de reabsorção de bicarbonato foi elevada no grupo que foi tratado com injeções subcutâneas de Florizina se comparada com animais não tratados. O mesmo efeito inibitório para $t^{1/2}$ foi observado durante perfusão de solução 20 mM de glicose em animais normais ou tratados com Florizina.

A partir destes dados de JHCO_3^- e $t^{1/2}$ podemos sugerir que a via que promove a queda da reabsorção de bicarbonato durante perfusão de glicose 20 mM em animais normais é a mesma que ocasiona a inibição do fluxo e do $t^{1/2}$ durante perfusão de glicose 5 mM em animais tratados com Florizina uma vez que não houve efeito inibitório adicional durante perfusão de glicose 20 mM em animais tratados com este fármaco.

Gráfico 19- Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados (Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre o fluxo de bicarbonato. * $P < 0,001$ vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.

Gráfico 20- Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados (Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre a meia vida de acidificação ($t_{1/2}$). * $P < 0,001$ vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.

Gráfico 21- Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados (Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre o bicarbonato estacionário. * $P < 0,001$ vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.

No gráfico 21 podemos observar que o tratamento com Florizina diminuiu o gradiente de reabsorção de bicarbonato durante perfusão com glicose 5 mM sendo este efeito semelhante ao observado durante perfusão de glicose 20 mM em animais não

tratados ou tratados com Florizina, uma vez que não houve queda adicional do bicarbonato estacionário neste grupo. O pH estacionário apresenta as mesmas alterações e é compatível com queda da concentração de bicarbonato final no túbulo proximal dos três grupos citados: animais tratados com Florizina e perfundidos com solução de glicose 5 mM, animais não tratados e tratados com Florizina e perfundidos com solução de glicose 20 mM.

Estes dados também sugerem que as alterações promovidas pela perfusão com glicose 20 mM apresentam as mesmas vias que as alterações que o tratamento com Florizina promove, durante perfusão de glicose 5 mM, já que não houve efeito adicional durante perfusão de glicose 20 mM em animais tratados com Florizina para estes efeitos (quedas do HCO_3^- estacionário e pH).

Gráfico 22- Efeito de perfusões de solução de glicose 5 mM em animais não tratados (Norm G5) (N=13), tratados com Florizina (Floriz G5) (N=13) e de solução de glicose 20 mM em animais não tratados (Norm G20) (N=16) e tratados com Florizina (Floriz G20) (N=17), sobre o pH estacionário. * $P < 0,001$ vs Norm G. Não foi realizada análise estatística para os grupos plotados apenas para efeito de comparação.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 TÉCNICA DE MICROPERFUSÃO ESTACIONÁRIA

Para desenvolver esse trabalho utilizamos a técnica de microperfusão estacionária “in vivo”. Para fazer uma adequada interpretação dos dados, é necessário primeiramente avaliar as condições técnicas nas quais os resultados foram obtidos. Considerando que a metodologia de microperfusão de túbulos renais “in vivo” é uma técnica não muito difundida em Fisiologia realizaremos, como dito acima, uma análise crítica do método utilizado bem como de suas implicações para a análise funcional do transporte iônico através do epitélio tubular.

O primeiro fator a ser considerado em relação à técnica de microperfusão é o equipamento utilizado. Para realizar as medidas de pH por esta técnica, utilizamos um eletrodo seletivo a H^+ composto por um eletrodo de vidro preenchido com uma resina de troca iônica seletiva a este íon. Muitos são os fatores que podem interferir na medida adequada obtida por este tipo de eletrodo. Entre eles podemos citar: coeficiente de seletividade, a adesão da resina ao vidro do eletrodo e o tempo de resposta a alterações de concentração do íon a ser estudado.

Uma vez elencados esses fatores, podemos agora analisá-los em separado para determinar se estes fatores interferiram em nossos resultados. O coeficiente de seletividade de um eletrodo de resina depende da composição da resina utilizada. Ammann, et al., 1981 realizaram experimentos com eletrodos íon seletivos para H^+ semelhantes aos utilizados em nosso trabalho e verificaram que a resposta, em mV, desses eletrodos, a variações de pH, em soluções contendo concentrações fisiológicas e até mesmo superiores às fisiológicas de Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} e Ca^{2+} , varia de maneira linear e está próxima à resposta teórica esperada para um eletrodo seletivo a H^+ (cálculo teórico de variação de potencial por unidade de pH). Esta resposta linear ocorre em pHs que variam entre 12 e 5. Em pHs abaixo de 5 a resposta já não é mais linear e portanto, esse tipo de eletrodo não deve ser utilizado para determinar o pH de soluções de pHs tão baixos.

Experimentos realizados por Schulthess, et al., (1981) utilizando eletrodos de resina seletivos a H^+ tais como os utilizados por nós, verificaram, tal como Ammann, et al., 1981, que estes eletrodos possuem uma resposta linear em pHs que variam entre 4,5-

11 com um “slop” próximo ao teórico (57,8 mV/pH em seu experimento vs 58,17 mV/pH a 20 °C teórico). De acordo com estes autores, a seletividade dessa resina é tão alta quanta a seletividade observada em eletrodos de membrana de vidro. Por isso, podemos dizer que o eletrodo utilizado em nosso trabalho é extremamente seletivo ao H^+ e pouco influenciado pelos outros íons presentes na solução tubular nas concentrações encontradas em nosso trabalho.

Outro fator a ser considerado para certificar a confiabilidade dos nossos dados, é a adesão da resina ao vidro do eletrodo. A falta de adesão da resina ao eletrodo é um fator que influencia a resposta deste, pois pode criar uma área de troca iônica não seletiva ao íon estudado entre a solução de preenchimento e a solução tubular (Armstrong e Garcia-Diaz, 1980). Para impedir que a resina fique sem adesão é necessário tornar o vidro do microeletrodo hidrofóbico usando uma substância silanizadora. De acordo com Armstrong e Garcia-Diaz, o processo de silanização pode ocorrer de maneira ineficiente se a ponta do eletrodo for fina demais para entrar em contato com a substância silanizadora. Estes autores acreditam que o processo de silanização, para que surta o efeito esperado, tem que ser realizado na base de tentativa e erro/acerto, pois dependerá da resina usada, do diâmetro de ponta do microeletrodo, etc. Em nosso laboratório, o procedimento de microperfusão já é realizado há mais de 30 anos e o processo de silanização já está bem padronizado. Possíveis erros de silanização podem ocorrer, é claro, mas antes de realizar os experimentos eletrodos pouco responsivos às soluções de calibração são descartados.

Além desses fatores, o tempo de resposta do eletrodo a mudanças de concentração do íon estudado também interfere muito nos resultados e na interpretação dos mesmos, pois pode determinar perda de sensibilidade a alterações rápidas em um período de tempo. O tempo de resposta experimental do eletrodo por nós utilizado e estudado por Armstrong e Garcia-Diaz, 1980, foi de 0,4 s para uma diferença de leitura de 1 unidade de pH, tempo relativamente curto se comparado com o tempo de resposta observado com o uso de eletrodos de membrana de vidro (0.6 a 1,5 s). Este tempo de resposta é adequado para nosso propósito, o que pode ser verificado nas figuras 10 e 11, que demonstram a resposta do eletrodo (variação de voltagem, em mV) durante curvas de calibração (figura 10) e durante a própria curva experimental (figura 11). Podemos visualizar nessas figuras que a variação muito rápida de pH na superfície renal ou na luz tubular durante a perfusão com solução alcalina (figura 11 – número 2) ou com soluções padrão (figura 10 – número 2, 3 e 4) é seguida de uma mudança extremamente rápida de

potencial e portanto, o tempo de resposta do eletrodo não deve limitar a mensuração da variação de pH durante a própria curva experimental (muito mais lenta – figura 11 – número 3). Tendo em vista que a resposta do eletrodo por nós utilizado ocorre em 0,4 s, a captação do sinal de aquisição do software por nós utilizado foi programada para 0,5 s, intervalo de tempo suficiente para que o microeletrodo já tenha respondido a uma variação de pH.

Com o exposto acima a respeito do eletrodo seletivo por nós utilizado, nos parece adequado o uso do eletrodo de resina e o equipamento de aquisição de nosso sistema para estudar a cinética de acidificação intratubular. Inclusive, tem sido possível medir meias vidas de acidificação ($t_{1/2}$) da ordem de 0,2 a 0,4 s durante a fase de equilíbrio da solução perfundida (com PCO_2 praticamente zero) com a PCO_2 do córtex renal (Malnic e Mello Aires, 1971), de velocidade muito maior que aquela correspondente à reabsorção de bicarbonato, com $t_{1/2}$ maior de 2 s.

5.2 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA REABSORÇÃO DE BICARBONATO

Sendo o objetivo do presente trabalho investigar a interação entre transporte de glicose e de bicarbonato em epitélio renal proximal, verificamos inicialmente se a glicose modula o fluxo de reabsorção de bicarbonato. Constatamos que a glicose modula o transporte de bicarbonato de maneira bifásica, durante perfusão de soluções contendo diferentes concentrações de glicose, em ratos normais. Perfusões com solução sem glicose adicionada de Florizina, inibidor específico para o SGLT e, portanto, na ausência de transporte de glicose (bloqueio do transportador), inibe a reabsorção de bicarbonato. Porém, perfusões de solução contendo 5 mM de glicose, concentração esta fisiológica, estimulam a reabsorção de bicarbonato (se comparada a reabsorção na ausência de glicose e com Florizina). Já durante perfusões de solução de glicose 20 mM, situação de sobrecarga aguda do transporte de glicose, ocorre inibição (se comparada a perfusão de glicose 5 mM) parcial (se comparada a perfusão de solução sem glicose e Florizina) do transporte de hidrogênio e, portanto, da reabsorção de bicarbonato.

Entretanto, Nascimento-Gomes e Mello-Aires (1990) realizaram experimentos de microperfusão estacionária em ratos Wistar, utilizando soluções com diferentes concentrações de glicose e verificaram que concentrações crescentes de glicose inibiam

o fluxo de bicarbonato, que era maior no grupo perfundido com solução sem glicose. Em trabalho recente de nosso laboratório, obtivemos um valor de JHCO_3^- , na ausência de glicose, de $2,4 \text{ nmol/cm}^2/\text{s}$ em túbulos proximais (Amorin, *et al.*, 2006), portanto pouco inferior ao fluxo obtido na presente pesquisa com glicose 5 mM ($\text{JHCO}_3^- 2,87 \pm 0,25$). Fica claro, assim, que a inibição do transportador SGLT, utilizando a droga Florizina, tem efeito adicional à simples ausência de glicose.

Em experimentos realizados em células OKP, cujas características são as de células proximais, Ambühl, *et al.* (1998) observaram um efeito semelhante ao determinado por nós. Em seu trabalho verificaram que células incubadas em concentrações crescentes de glicose apresentavam aumento da atividade do trocador Na^+/H^+ , porém, em concentrações superiores a 40 mM de glicose, havia inibição do transporte de hidrogênio, paralela ao aumento da concentração de glicose. Estes autores atribuíram esse efeito a mudanças de osmolaridade, mas, em seu próprio trabalho, verificaram que, ao se incubar células OKP em concentrações crescentes de manitol, ocorre aumento da atividade do trocador Na^+/H^+ , que persiste mesmo em concentrações de até 80 mM de manitol. Portanto, não verificaram o mesmo efeito inibitório com o uso de manitol, que o produzido pela glicose em altas concentrações. É necessário salientar que, em nosso trabalho, não utilizamos solução hiperosmolar (mesmo quando eram usadas soluções com altas concentrações de glicose), pois a osmolaridade sempre foi ajustada em 290 mOsmol/Kg de H_2O , ao contrário dos experimentos desenvolvidos por Ambühl, *et al.* Além disso, células em cultura, incubadas com soluções contendo diferentes concentrações de glicose, têm ambas as membranas (apical e basolateral) expostas a esta solução. No caso do nosso trabalho, as perfusões são realizadas no lúmen tubular e apenas a membrana apical é exposta à solução experimental. Portanto, durante o experimento com solução de glicose 20 mM, a membrana basolateral não está exposta a altas concentrações de glicose em seu lado extracelular, uma vez que utilizamos ratos normoglicêmicos para a execução do experimento. Sendo assim, apesar do efeito observado por Ambühl, *et al.* (1998) ser semelhante ao nosso, exceto pela concentração em que este ocorre (Glicose 20 mM em nosso trabalho e Glicose 40 mM no trabalho de Ambühl, *et al.*), os mecanismos envolvidos neste efeito podem não ser os mesmos. Turner e Black (2001), tal como Ambühl, *et al.* (1998), obtiveram resultados que indicam que, em células Caco-2 transfectadas com SGLT1, o NHE3 é estimulado quando a célula é submetida a um meio contendo 25 mM de glicose, porém esses autores não realizaram experimentos com concentrações de glicose superiores.

Tendo em vista que existem evidências de que a osmolaridade pode modular a atividade do trocador Na^+/H^+ , foi necessário avaliar se nosso protocolo experimental, apesar de utilizar solução isosmótica, ocasionou alterações de volume celular.

Alguns autores, como Charron, *et al.* (2006) acreditam que forma-se uma camada estacionária hiperosmótica, próxima ao infundíbulo do SGLT1, após transporte de glicose. Isto explicaria a entrada de água através do SGLT1, observada durante seu protocolo experimental em oócitos de *Xenopus*. Soleimani, *et al.* (1998), realizou experimentos com células LLC-PK1 (células de túbulo proximal de porco), expostas cronicamente a meios hipertônicos, e constatou que estas apresentam diminuição da atividade do trocador Na^+/H^+ . Por isso, poderíamos atribuir o efeito inibitório de fluxo de hidrogênio verificado em nosso trabalho, durante perfusão com alta concentração de glicose, à presença de uma camada estacionária hiperosmótica ocasionada pelo transporte de grande quantidade de glicose durante perfusão com solução contendo alta concentração de glicose.

Loo *et al.* (1996) e Zeuthen (2007), porém, não concordam com a suposição da formação de uma camada estacionária durante o transporte de glicose pelo SGLT1. Estes autores, cujo trabalho tem sido considerado controverso, afirmam que o SGLT1 transporta, juntamente com o Na^+ e a glicose, 260 moléculas de água, e que não há formação de gradiente osmótico nas imediações do transportador; ao contrário, este possuiria potencial para produzir o inchamento da célula, uma vez que transporta água contra gradiente. Caso ocorresse inchamento, após início do transporte de glicose, o NHE3 apical deveria ser estimulado, ao mesmo tempo em que o NHE1 basolateral deveria inibir-se, como demonstraram em seu trabalho Alexander, *et al.* (2006). De acordo com esses autores, os co-transportadores Na^+/H^+ renais, basolateral (NHE1) e apical (NHE3), são modulados, de maneira inversa, por inchamento celular, sendo que o NHE3 apical é estimulado nessa condição.

Portanto, se o transporte de glicose pelas células renais do túbulo proximal, ocasionasse transporte de água com conseqüente inchamento, deveríamos verificar aumento da atividade do trocador e, assim, aumento do fluxo de bicarbonato, quanto mais concentrado fosse o meio em glicose. Como o que foi observado por nós durante perfusão com alta concentração de glicose foi inibição do trocador, a suposição dos autores mencionados acima não explica os nossos dados.

Além disso, devemos considerar que as células tubulares são células polarizadas e, portanto, a reabsorção de glicose luminal é transepitelial e não simplesmente um

transporte absorptivo de consumo celular. Por isso, não é possível se assumir que ocorra inchamento celular, mesmo que o SGLT1, ao transportar glicose transporte água. Isto porque a glicose proveniente do lúmen, uma vez transportada para dentro da célula, é posteriormente transportada para o meio interno pelo GLUT basolateral, que por sua vez, também transporta água (Naftalin, 2008). Por este motivo, seria necessário desenvolver uma técnica para medir o volume de células tubulares que estejam polarizadas e simular as condições que favorecem o transporte transepitelial, isto é, seria necessário manter as diferenças que existem entre a solução que banha a membrana apical e a membrana basolateral, metodologia esta que não foi possível aplicar neste trabalho.

5.3 CASCATA DE SINALIZAÇÃO

Proteínas de membrana, tal como os transportadores de membrana, são moduladas por um grande número de fatores, entre eles: presença de hormônios, osmolaridade, fármacos, neurotransmissores, entre outros. Cada um desses fatores podem concomitantemente produzir diferentes efeitos sobre uma mesma proteína. Por isso, muitas vias intracelulares diferentes podem interferir na função de transportadores, receptores ou canais de membrana, dependendo do agente que estiver presente no meio.

Em nosso trabalho, verificamos que a glicose modula a atividade do trocador Na^+/H^+ , pois modifica o fluxo e o $t^{1/2}$ de bicarbonato. Porém, além de evidenciar o efeito da glicose sobre o fluxo de bicarbonato, tínhamos como objetivo elucidar qual a(s) via(s) de sinalização intracelular que estava envolvida na modulação da atividade do NHE3.

No presente trabalho, verificamos que tanto a via da p38 MAP Kinase quanto à via da AKT (PI3 Kinase) estão envolvidas no efeito estimulatório, exercido pela glicose em concentração fisiológica, já que a utilização de inibidores dessas vias (em solução contendo glicose 5 mM), produziu redução da atividade do NHE3 de mesma magnitude que a perfusão de solução sem glicose com inibidor do SGLT.

As alterações do transporte de bicarbonato durante perfusão com glicose 20 mM, bem menores que aquelas obtidas com glicose 0 e Florizina, podem ser tanto devidas a modificação parcial das vias acima descritas, quanto a outros fatores que ainda não conseguimos evidenciar. A suposição de que a perfusão de glicose 20 mM possa alterar

parcialmente essas vias é especialmente plausível, uma vez que as células que expressam SGLTs, após exposição a altas concentrações de glicose, sofrem inibição do transporte de glicose (Ahta, *et al.*; 1990). Sendo assim, a inibição parcial do SGLT ocasionada pela glicose em alta concentração (20 mM) pode produzir um efeito semelhante mas de menor magnitude que aquele produzido pelo uso da droga Florizina, que também inibe o SGLT.

Como descrito na introdução, à via da p38 MAP Kinase já havia sido relacionada com esse efeito estimulatório na atividade do NHE3, em células Caco-2 intestinais, durante transporte de glicose pelo SGLT1 (Turner e Black, 2001). As vias da AKT-2 (Shiue, *et al.*, 2004) e da MAPKAK-2 (Hu *et al.*, 2006) também foram responsabilizadas por este efeito. Donowitz e Li (2007), em sua revisão sobre o NHE3, atribuíram à PI3-Kinase o papel de “uma das maiores enzimas reguladoras do NHE3”.

Esses autores acreditam que a fosforilação do NHE3 por esses complexos de sinalização, servem de mediadores da rede de sinais, necessárias para alguns, mas não para todos os aspectos regulatórios do NHE3, pelas duas maneiras possíveis: mudança no número de “turn over” e tráfego da proteína.

Lee-Kwon, *et al.* (2001) demonstraram que a ativação da PI 3-Kinase e/ou da AKT é suficiente para que ocorra estímulo da atividade do NHE3; e que o aumento da atividade da PI 3-Kinase aumenta a quantidade de NHE3 na membrana plasmática. Turner e Black (2001) verificaram que a fosforilação da p38 MAP Kinase, induzida por fármacos, também ocasionava aumento da atividade do NHE3. Portanto, sabe-se que fatores que aumentem a atividade dessas proteínas devem ocasionar aumentos da atividade do NHE3. Porém, não são elas que diretamente interferem na atividade do trocador. Na verdade, sabe-se que essas vias são responsáveis pela ativação de Ezrin, uma proteína do citoesqueleto efetora do efeito descrito acima (Zhao, *et al.*, 2003).

Ezrin é uma proteína do citoesqueleto que se encontra ligada ao NHE3 na alça C terminal, entre os aminoácidos 475-589. Estudos demonstraram que mutações em aminoácidos carregados positivamente presentes nessa região (entre 475 e 589) promovem o desligamento do Ezrin e, conseqüentemente, ocasionam: 1) acentuada redução da quantidade de NHE3 presente na superfície celular e queda de sua atividade; 2) decréscimo da expressão de NHE3 na superfície celular devido à diminuição na taxa de exocitose e fornecimento de novos NHE3 sintetizados, com taxa de expressão total normal, porém decréscimo na taxa de endocitose; 3) aumento da meia-vida do NHE3 na

membrana, com manutenção da duração total da meia-vida desta proteína; 4) diminuição da fração móvel na membrana apical.

Portanto, a Ezrin parece ser responsável pelo tráfego exocitótico e fornecimento de novas proteínas (NHE3) sintetizadas para a membrana plasmática que, em parte, determinam a atividade e mobilidade do NHE3 na membrana, o que pode aumentar seu fornecimento do microvilo para as fissuras intervilares (Cha, *et al.*, 2006). Sendo assim, a Ezrin é uma proteína de fundamental importância nos processos endocitótico/exocitótico e na mobilidade do NHE3 na membrana apical do túbulo renal. Por isso, Zhao, *et al.* (2003), ao implicarem a fosforilação da p38 MAP Kinase promovida pela glicose com a concomitante fosforilação da Ezrin e aumento da atividade do NHE3, atribuíram a Ezrin esse efeito estimulatório sobre a atividade do trocador.

Além das proteínas citadas acima, a PKA é uma proteína associada ao NHE3, através da proteína PDZ da família NHERF, com importante papel modulatório da atividade do trocador (Donowitz e Li; 2007). Esta é sabidamente uma serina-treonina cinase inibitória do NHE3, sendo responsável pela fosforilação da SER⁶⁰⁵ e SER⁶³⁴ (Moe, 1999). Por esta razão, testamos um inibidor de PKA, o H89, para verificar se essa proteína está envolvida na modulação da atividade do NHE3 pela glicose.

Nossos resultados demonstraram que nenhum efeito foi verificado com o uso desse inibidor, exceto a diminuição do bicarbonato estacionário. Com os dados obtidos neste trabalho não há como avaliar o motivo pelo qual este inibidor não altera o fluxo de HCO_3^- mas, mesmo assim, promove a queda do bicarbonato estacionário. Porém, é interessante observar que perfusões de glicose 20 mM em ratos normais produziram o mesmo efeito e com magnitude semelhante, sobre o bicarbonato estacionário.

5.4 CARACTERIZAÇÃO E FUNÇÃO RENAL DOS MODELOS EXPERIMENTAIS: ANIMAIS COM DIABETES INDUZIDA POR STREPTOZOTOCINA E TRATADOS COM FLORIZINA

Em nosso trabalho, realizamos dois tipos de tratamentos em ratos Wistar, com o intuito de avaliar a reabsorção de bicarbonato em duas condições: sobrecarga de transporte de glicose (modelo de hiperglicemia - diabetes) e inibição do transporte de glicose (tratamento com Florizina). Para analisar criteriosamente nossos resultados,

fizemos medidas de peso, glicemia, pH arterial, fluxo urinário, ingestão hídrica e análise da função renal, que consistiu no cálculo do RFG (a partir do clearance de creatinina), $FE\ Na^+$ e $FE\ K^+$.

Os animais diabéticos, submetidos à análise desses parâmetros, apresentaram: perda de peso acentuada, marcado aumento do consumo de água e de ração (não mostrado), fluxo urinário elevado e aumento da glicemia sérica de jejum e sem jejum. Além disso, observamos queda do pH arterial, aumento do RFG e da $FE\ Na^+$ e tendência a aumento da $FE\ K^+$. Da mesma forma, Nascimento-Gomes, *et al.* (1997) e Klisic, *et al.* (2005) verificaram que animais com diabetes induzida por Streptozotocina apresentam: perda de peso, hiperglicemia de jejum, poliúria e polidipsia e aumento da $FE\ K^+$, mas não evidenciaram alterações na $FE\ Na^+$.

No entanto, no animal diabético ocorre diurese osmótica devido à presença luminal de um soluto não reabsorvível (no caso, não reabsorvido), a glicose. Este é um fator que eleva a diurese, o que deverá elevar a fração de excreção de Na^+ ($FE\ Na^+$, como vimos, é a razão entre Na^+ excretado e Na^+ filtrado).

Portanto, os nossos dados são compatíveis com esta interpretação fisiológica e podem ter ocorrido devido à maior excreção de glicose (glicosúria), ocasionada pela maior glicemia de nossos ratos diabéticos, que aquela encontrada em outros trabalhos. Podemos considerar também, que as diferenças de achados verificados entre nosso trabalho e de outros autores, devam-se a fatores como: idade e/ou peso inicial dos animais, raça dos animais, dose e via de administração da Streptozotocina.

Quanto à perda de peso no início do tratamento, em nosso trabalho, avaliamos a perda de peso ao 6º dia de tratamento e verificamos que esta foi acentuada. Porém, Klisic, *et al.* (2005) relatou, em seu trabalho, que a perda de peso não foi significativa, em ratos diabéticos 7 dias após o tratamento, o sendo apenas após 14 dias. Harris (1986) encontrou os mesmos resultados que Nascimento-Gomes, *et al.* (1997) e Klisic, *et al.* (2005) para todos os parâmetros citados, exceto para pH arterial e perda de peso ao 7º dia. Esse grupo verificou acentuada acidose e perda de peso já no 7º dia, tal como em nosso trabalho.

Tanto Nascimento-Gomes, *et al.* (1997) quanto Harris, *et al.* (1986) mediram a excreção urinária de ácidos e verificaram importante aumento de sua excreção. Esse parâmetro não foi analisado por nós, mas sabendo que os rins têm importante papel na regulação do equilíbrio ácido-base, esse achado sugere aumento da produção de ácidos

totais, o que condiz com a condição de acidose encontrada em nossos experimentos e nos experimentos realizados por Harris, *et al.* (1986).

Uma alteração que sempre foi observada, tanto pelos autores citados quanto em nosso trabalho, em ratos tratados com Streptozotocina (entre 7 e 14 dias de tratamento), foi o aumento do ritmo de filtração glomerular. Pollock, *et al.* (1991) e Vallon, *et al.* (1995), realizaram estudos de micropuntura de fluxo livre, para avaliar o RFG por nefro e o feed-back túbulo-glomerular. Os dois grupos verificaram que animais diabéticos, com severa hiperglicemia, apresentam hiperfiltração e aumento do balanço túbulo-glomerular, isto é, da influência da mácula densa sobre o RFG.

Segundo Pollock, *et al.* (1991), a hiperfiltração é um fenômeno precoce em ratos com diabetes severa e o aumento do feed-back túbulo-glomerular não é suficiente para normalizar o RFG por nefro e, por isso, o RFG renal se encontra elevado como um todo. Vallon, *et al.* (1995), evidenciaram que a diabetes ocasiona decréscimo do conteúdo iônico no lúmen do túbulo distal, sem afetar o “slop” de sua relação com o fluxo nesse segmento. Este resultado, de acordo com esses autores, sugere que, apesar de a resposta de feed-back estar aumentada, a eficiência homeostática do feed-back túbulo-glomerular do sistema está reduzida na diabetes, pois esta resposta não modifica, na magnitude necessária, a taxa de reabsorção tubular. Este feed-back é considerado dependente da concentração de sódio e cloreto do fluido tubular na altura da mácula densa, o que deve ser modificado em condições de elevação do fluxo tubular, como a que ocorre na diurese osmótica, como a presente no diabetes.

Em nosso trabalho, os animais tratados com Florizina, na dose de 0,4 g/Kg uma vez ao dia, apresentaram aumento de fluxo urinário, com glicosúria, diminuição acentuada da fração de excreção de K^+ e tendência a queda do RFG. Os demais parâmetros avaliados não diferiram entre os animais tratados com Florizina e os animais não tratados.

Zhao, *et al.* (2004) trataram camundongos com Florizina 0,4 g/Kg duas vezes ao dia (a mesma dose utilizada em nosso trabalho, porém, com o dobro da frequência). Verificaram, em seu trabalho, acentuado aumento da excreção de glicose, sem que houvesse alterações no peso ou gordura corporal, glicemia ou insulinemia, da mesma forma que em nosso trabalho (exceto para gordura corporal e insulina sérica, que não foram mensuradas em nosso trabalho).

Vallon, *et al.* (1999) realizaram experimentos de micropuntura de fluxo livre e verificaram que ratos diabéticos, tratados com Florizina, apresentam diminuição da

reabsorção proximal de fluido, Na^+ , K^+ e Cl^- . Esse achado não explica nosso dado de queda acentuada da fração de excreção de K^+ . Porém, esses autores não avaliaram a fração de excreção desses compostos (apenas a fração de reabsorção proximal), nem realizaram tratamento com Florizina em animais normais. Além de medir a fração de reabsorção de Na^+ , K^+ e Cl^- proximal, esse grupo também mediu o ritmo de filtração glomerular por nefro, e verificaram, que animais diabéticos que recebem Florizina apresentam queda da filtração glomerular por nefro. Em nosso trabalho, também obtivemos esse resultado, porém, em nosso caso, os animais tratados com Florizina eram animais normais e não diabéticos.

5.5 AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO DE BICARBONATO NO TÚBULO PROXIMAL DE RATOS NÃO TRATADOS, TRATADOS COM FLORIZINA E COM DIABETES INDUZIDA POR STREPTOZOTOCINA

Em nosso trabalho, verificamos que animais com diabetes induzida por Streptozotocina apresentam aumento do fluxo de bicarbonato e queda do bicarbonato e pH estacionários, quando os túbulos proximais são perfundidos com solução contendo glicose 20 mM. Por sua vez, animais tratados com Florizina apresentam diminuição do fluxo de bicarbonato, tal como ratos normais, quando perfundidos com essa mesma solução, se comparados com ratos diabéticos e com perfusão de glicose 5 mM em ratos normais (gráfico 1).

Esses resultados indicam que alterações presentes na diabetes, ou ainda, a cronicidade de sobrecarga de transporte de glicose, induzem o aumento da atividade do trocador sódio-hidrogênio em animais diabéticos. Não há como prever qual das presentes alterações funcionais verificadas em nosso modelo, tais como, acidose, hiperglicemia e hipoinsulinemia, ocasionou este efeito.

Harris *et al.* (1986) realizaram experimentos com vesículas de membrana apical de córtex renal de animais diabéticos e também verificaram aumento da atividade do trocador Na^+/H^+ nesses animais. Esses autores atribuíram o aumento dessa atividade à acidose provocada pela diabetes, uma vez que a correção da acidose com bicarbonato de sódio eliminava esse efeito. Esse grupo também realizou o tratamento dos animais diabéticos com insulina e verificou que a correção da glicemia e de todos os efeitos da

hipoinsulinemia revertem o efeito estimulatório do NHE3. Além disso, esses autores mediram a atividade do cotransportador sódio-glicose e verificaram que, em animais diabéticos, ocorre diminuição do transporte de glicose pelos túbulos renais e que esta diminuição está relacionada com o decréscimo da atividade dos transportadores apicais e não com a quantidade dos mesmos.

Nascimento-Gomes, *et al.* (1997) realizaram experimentos de microperfusão estacionária em ratos diabéticos, perfundindo com solução sem glicose. Verificaram, neste protocolo, que ocorre aumento do fluxo de bicarbonato, redução do $t^{1/2}$ e do bicarbonato estacionário (juntamente com queda do pH estacionário) em animais diabéticos, se comparados com animais normais, perfundidos com esta mesma solução.

Esses achados são compatíveis com os achados do presente trabalho, utilizando solução de glicose 20 mM. O importante de se salientar em relação aos experimentos de Nascimento-Gomes, *et al.* (1997), é que os animais diabéticos desses autores não apresentaram acidose metabólica (provavelmente por apresentarem hiperglicemia mais branda se comparada com Harris, *et al.* (1986) e com o presente trabalho).

Sendo assim, a presença de acidose não pode ser utilizada como explicação para o aumento da reabsorção de bicarbonato, evidenciada por Nascimento-Gomes, *et al.* Podemos inferir que, a explicação de Harris, *et al.* (1986), para o aumento da atividade do NHE3, pode contribuir, mas não explicar totalmente o efeito sobre o transporte de bicarbonato, por nós observado.

Kliscic, *et al.* (2004) também realizaram experimentos com vesículas de membrana apical de córtex renal, tal como Harris, *et al.* Estes autores verificaram que ocorre aumento da atividade do NHE3 uma semana após a indução da diabetes e que este aumento persiste até 2 semanas após a indução. Verificaram também que o aumento se deve apenas à modulação da atividade do NHE3 apical e não ao NHE1 basolateral, uma vez que a inibição do NHE1 não aboliu o efeito.

Os autores acima mencionados não relacionam o aumento da atividade do NHE3 às diferenças na quantidade de proteínas na membrana apical, uma vez que não houve aumento de sua expressão na membrana, nem aumento do seu RNAm. Portanto, atribuem o aumento da atividade do NHE3 a alterações de “turn over” dessa proteína. Em nossos experimentos, a perfusão luminal, sítio de localização do NHE3, também demonstra o efeito da diabetes neste transportador, mas não elucida a maneira pela qual ocorre sua modulação (turn-over ou mudanças de expressão).

Como visto, animais tratados com Florizina e perfundidos com solução de glicose 20 mM, apresentaram fluxo de bicarbonato reduzido, se comparado com animais diabéticos perfundidos com a mesma solução; já ratos normais, perfundidos com esta solução, apresentaram a mesma resposta com magnitude semelhante, de fluxo de reabsorção de bicarbonato, que os ratos tratados com Florizina.

Em nossos experimentos iniciais, verificamos que perfusão com Florizina 0,5 mM e sem glicose produz um efeito inibitório acentuado no fluxo de bicarbonato, se comparado com perfusão de glicose 5 mM em ratos normais; e que, a perfusão de glicose 20 mM também produz um efeito inibitório, porém menos pronunciado que o produzido pela perfusão de Florizina. Nesta etapa do trabalho, perfundimos solução com glicose 20 mM em ratos tratados com Florizina, mas não verificamos nenhum efeito adicional à perfusão em animais não tratados, ao contrário do achado acima discutido, o que indica que o tratamento com Florizina sistêmico não teve a mesma magnitude que a perfusão local deste fármaco.

Podemos atribuir possíveis diferenças de concentração de Florizina no túbulo renal a essa diferença de comportamento entre o grupo inicial (Florizina perfundida na luz tubular) e o grupo em discussão (Florizina injetada por via subcutânea).

Experimentos *in vivo* realizados por Vallon, *et al.* (1999), nos quais animais diabéticos foram tratados com Florizina (trabalho citado anteriormente), verificaram que este tratamento promove queda de reabsorção de Na^+ proximal, além de queda da reabsorção de K^+ e Cl^- . Como o NHE3 é responsável pela maior parte da reabsorção do Na^+ proximal, este dado sugere que haja inibição do transporte de Na^+ , o que concorda com nossos dados anteriores, de que a Florizina inibe a reabsorção de bicarbonato de sódio proximal. Porém, não é possível assumir que a queda de reabsorção de Na^+ verificada por esses autores se deva somente ao NHE3, uma vez que esse grupo não mediu a concentração de bicarbonato no final dos túbulos proximais (somente concentração de Na^+).

5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM FLORIZINA SOBRE O FLUXO DE BICARBONATO DURANTE PERFUSÃO DE GLICOSE 5 mM

Verificamos em nosso trabalho que animais tratados com Florizina apresentaram queda do JHCO_3^- , $t^{1/2}$, HCO_3^- estacionário e pH estacionário durante

perfusão de solução glicose 5 mM se comparado com animais não tratados submetidos a perfusão desta mesma solução. Estes efeitos foram semelhantes aos observados durante perfusão de solução de glicose 20 mM em animais não tratados e tratados com Florizina (gráficos 19 a 22).

É possível sugerir que o efeito inibitório promovido pelo tratamento com Florizina (durante perfusão de glicose 5 mM) e pela perfusão de glicose 20 mM (em animais normais) possui a mesma via de sinalização, pois não houve efeito adicional durante a perfusão de solução 20 mM em animais tratados com Florizina

Para que a glicose 20 mM exerça o mesmo efeito do tratamento com florizina, a glicose 20 mM deve inibir o SGLT, uma vez que este é o efeito promovido pelo fármaco. De acordo com Lee, et al. 2007, a glicose, em altas concentrações, exerce este efeito, inibindo o SGLT por duas vias distintas: através da ativação da PKC e do aumento da condutância da membrana apical ao cálcio. Uma vez que existem evidências de que a glicose, em altas concentrações, pode modular o transporte de glicose negativamente, inibindo o SGLT, podemos considerar que este efeito inibitório poderia acarretar as mesmas mudanças que o efeito da Florizina, na atividade do trocador sódio-hidrogênio.

Turner e Black (2001), conforme citado anteriormente, verificaram inibição do NHE3 apical de células Caco-2 em cultura, quando o meio contendo glicose era substituído por um meio sem glicose com Florizina 0,5 mM. Esses achados estão de acordo com os achados com perfusão local de Florizina e também com a inibição promovida pela Florizina durante perfusão de solução de glicose 5 mM em ratos tratados com administração subcutânea.

Porém, por se tratar de outro tipo celular e de células em cultura e não de experimentos *in vivo*, não é possível comparar a magnitude das respostas verificadas por esses autores com os nossos dados.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir com os experimentos por nós realizados que:

- As velocidades de transporte de bicarbonato (JHCO_3^- e $t^{1/2}$) em túbulo proximal de rim de rato são modificadas durante perfusão de soluções com diferentes concentrações de glicose. Em concentração fisiológica de glicose (5 mM) observamos o maior fluxo e menor meia vida de bicarbonato. Na ausência de glicose e na presença de Florizina há acentuada queda do fluxo e elevação da meia vida, enquanto que em perfusões com altas concentrações de glicose há inibição parcial do fluxo e da meia vida de bicarbonato. A Florizina tem efeito adicional à simples ausência de glicose.
- Diferentes concentrações de glicose podem modificar o gradiente transepitelial final de concentração de bicarbonato uma vez que observamos tendência a alterações do bicarbonato e do pH estacionários. A perfusão de Florizina tende a diminuir a concentração estacionária de bicarbonato enquanto que a perfusão de glicose 20 mM tende a aumentá-la.
- O efeito estimulatório observado durante perfusão de glicose 5 mM é abolido com o uso de inibidores da p38 MAP Kinase e da PI3 Kinase, o que indica que estas quinases participam das vias que estão envolvidas neste efeito.
- O efeito estimulatório durante perfusões de glicose 5 mM não foi abolido pelo uso de H89, inibidor da PKA, o que indica que esta não participa da via envolvida.
- A presença de diabetes abole o efeito inibitório verificado pela perfusão de glicose 20 mM em ratos normais, o que indica que alguma das alterações ocasionadas pela doença podem interferir neste efeito.
- O tratamento subcutâneo com Florizina não ocasiona efeito adicional ao efeito inibitório verificado pela perfusão de solução de glicose 20 mM em animais normais, isto é, animais não tratados.
- Porém, o tratamento com Florizina abole o efeito estimulatório verificado durante perfusão de glicose 5 mM em animais normais. Este efeito é de mesma magnitude que o observado durante perfusão de solução de glicose 20 mM em animais não tratados, sendo que o tratamento com Florizina não produz efeito inibitório adicional. Isto indica que o efeito inibitório produzido pela perfusão de glicose 20 mM pode ser desencadeado pela mesma via que o efeito inibitório que o tratamento com Florizina ocasiona durante perfusão de solução de glicose 5 mM.

- Por fim, este trabalho demonstra haver uma interação entre o transporte de glicose e o transporte de H^+ em túbulos proximais, e mostra alguns dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahta T, Isselbacher KJ, Rhoads DB. Regulation of glucose transporters in LLC-PK₁ cells: effects of D-glucose and monosaccharides. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 6491-99.

Allen TJ, Tesch GH. Rodent models on Streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology.* 2007; 12: 261-66.

Alexander RT, Malevanets A, Durkan AM, Kocinsky HS, Aronson PS, Orlowski J, Grinstein S. Membrane curvature alters the activation kinetics of the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3. *The Journal of Biological Chemistry.* 2007; 282(10): 7376-84.

Ambühl P, Amemiya M, Preisig PA, Moe OW, Alpern RJ. Chronic hyperosmolarite increases NHE3 activity in OKP cells. *J Clin Invest.* 1998; 101(1): 170-77.

Ammann D, Lanter F, Steiner RA, Schulthess P, Shijo Y, Simon W. Neutral Carrier Based Hydrogen Ion Selective Microeletrode for Extra- and Intracellular Studies. *Anal Chem.* 1981; 53: 2267-69.

Amorim JB, Malnic G. V(1) receptors in luminal action of vasopressin on distal K(+) secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 278: F809-F816.

Armstrong WM, Garcia-Diaz, JF. Ion-seletive microelectrodes: theory and technique. *Fed Proc.* 1980; 39: 2851-2859.

Aronson PS, Nee J, Suhm MA. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature.* 1982; 299: 161–163.

Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS. NHE3: A Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1993; 264 : F141-F148.

Boron WF, De Weer P. Intracellular pH transient in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiology.* 1976; 67(1):91-112.

Brett CL, Donowitz M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 288: C223–C239.

Cha B, Tse M, Yun C, Kovbasnjuk O, Mohan S, Hubbard A, Arpin M, Donowitz M. The NHE3 juxtamembrane cytoplasmic domain directly binds Ezrin: Dual role in trafficking and mobility in the brush border. *Mol Biol Cell*. 2006; 17: 2661-2673.

Chalumeau C, Du Cheyron D, Defontaine N, Kellermann O, Paillard M, Poggioli J. NHE3 activity and trafficking depend on the state of actin organization in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 49: F283-F290.

Charron FM, Blanchard MG, Lapoint J. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J*. 2006; 90: 3546-54.

Deeds F, Jones FT, Booth AN. Metabolic and glycosuria studies on naringin and Phloridzin. *J Biol Chem*. 1958; 233(2): 280-82.

DeFronzo RA, Papachristou D, Shulman GI, Smith D, Rossetti L. Correction of hyperglycemia with Phloridzin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J. Clin Invest*. 1987; 79: 1510-15.

Donowitz M, Li X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev*. 2007; 87: 825-872.

Harris, RC, Brenner BM, Seifter JL. Sodium-hydrogen exchanger and glucose transport in renal microvillus membrane vesicle from rats with diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1986; 77: 724-33.

Houghson EJ, Hirt RP. Assessment of cell polarity. In: Shaw AJ, (Editor.). *Epithelial Cell Culture. A practical Approach*. Oxford: Oxford University Press; 1996. p37-66.

Hu Z, Wang Y, Graham WV, Su L, MÜsch MW, Turner JR. MAPKAPK-2 is a critical signaling intermediate in NHE3 activation following Na⁺-glucose cotransport. *J Biol Chem*. 2006; 281: 24247-24253.

Igarashi P, Aronson P. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am Physiol Soc*. 1993: F736-F742.

Kaunisto K, Parkkila S, Rajaniemi H, Wahhed A, Grubb J, Sly WS. Carbonic anhydrase XIV: Luminal expression suggests key role in renal acidification. *Kidney Int*. 2002; 61: 2111-2118.

Kliscic J, Nief V, Reyes L, Ambuhl PM. Acute and Chronic Regulation of the Renal Na⁺/H⁺ Exchanger NHE3 in Rats with STZ-Induced Diabetes mellitus. *Nephron Physiol*. 2005; 102: 27-35.

Koeppen B, Giebisch G, Malnic G. Mechanism and regulation of renal tubule acidification. In: Seldin DW, Giebisch G. The Kidney. New York: Raven Press; 1985. p1491-1525.

Lee YJ, Han HJ. Regulatory mechanisms of Na⁺/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* 2007; 72: S27–S35.

Lee-Kwon W, Johns DC, Cha B, Cavet M, Park J, Tschlis P, Donowitz M. Constitutively active phosphatidylinositol 3-Kinase and AKT are sufficient to stimulate the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger 3. *J Biol Chem.* 2001; 276(33): 31296-304.

Leroith D, Jou W, Setser J, Kim H, Zhang Y, Sun H, Gavrilova O, Yakar S, Zhao H. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53: 2901-09.

Loo DDF, Hirayama BA, Gallardo EM, Lam JT, Turk E, Wright EM. Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 7789-94.

Loo DDF, Zeuthen T, Chandy G, Wright EM. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:13367-70.

Lopes MJ, Malnic G. Sodium dependence of early distal H⁺ secretion in the rat kidney. *Braz J Med Biol Res.* 1988; 26:1065-68.

Lorenz JN, Schultheis PJ, Traynor T, Shull GE, Schnermann J. Blood pressure maintenance in NHE3-deficient mice with transgenic expression of NHE3 in small intestine. *Am J Physiol.* 1999; 277: 447-453.

Mackenzie B, Panayotova-Heiermann M, Loo DDF, LEVER JE, WRIGHT EM. SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. *J Biol Chem.* 1994; 269: 22488-22491.

Malnic G. CO₂ equilibria in renal tissue. *American Physiological Soc.* 1980: 307-18.

Malnic G. Role of the kidney in controlling acid-base balance. *Child Nephrol Urol.* 1988; 9: 241-252.

Malnic G, Mello-Aires M. Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. *Am J Physiol.* 1971; 220(6): 1759-1767.

- Marx JL. Investigators focus on intracellular pH. *Science*. 1981; 213: 745-747.
- Mello-Aires M, Lopes MJ, Malnic G. PCO₂ in renal cortex. *Am Physiol Soc*. 1990; 357-65.
- Moe OW. Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 2412-25.
- Naftalin RJ. Osmotic Water Transport with Glucose in GLUT2 and SGLT. *Biophys J*. 2008; 94:3912-3923.
- Nascimento-Gomes G, Mello-Aires M. Effect of glucose on the kinetics of bicarbonate reabsorption in the early and middle proximal tubule. *Braz J Med Biol Res*. 1990; 23: 79-85.
- Panayotova-Heiermann M, Loo DDR, Wright EM. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem*. 1995; 270(27): 1099-27 105.
- Pollock CA, Lawrence JR, Field M. Tubular sodium handling and tubuloglomerular feedback in experimental diabetes mellitus. *Am Physiol Soc*: 1991; 946-52.
- Rémésy C, Manach C, Besson C, Morand C, Aprikian O, Crespy V. Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats. *J Nutr*. 2001.
- Roth J, Kahn CR, Lewis NG, Ehrenkranz JRL. Phloridzin: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005; 21: 31-38.
- Sabolic I, Skarica M, Gorboulev V, Ljubojevic M, Balen D, Herak-Kramberger CM, Koepsell H. Rat renal glucose transporter SGLT1 exhibits zonal distribution and androgen-dependent gender differences. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290: 913–926.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. *Diabetes*. 1994, 43: 1326-1333.
- Schulthess P, Shijo Y, Pham HV, Pretsch E, Ammann D, Simon W. A hydrogen ion-selective liquid-membrane electrode based on Tri-n-dodecylamine as neutral carrier. *Anal Chem Acta*. 1981; 131: 111-116.

Shiue H, Musch MW, Wang Y, Chang EB, Turner JR. Akt2 Phosphorylates Ezrin to Trigger NHE3 Translocation and Activation. *J Biol Chem*. 2005; 280(2): 1688-1695.

Soleimani M, Watts BA, Singh G, Good DA. Effect of long-term hyperosmolality on the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in LLC-PK₁ cells. *Kidney Int*. 1998; 53: 423-31.

Splinter PL, Masyuk AI, Marinell RA, LaRusso NF. AQP4 transfected into mouse cholangiocytes promotes water transport in biliary epithelia. *Hepatology*. 2004; 39: 109–116.

Steinmetz PR. Cellular organization of urinary acidification. *Am J Physiol*. 1986; 251: 173-187.

Thomas J, Buchsbaum R, Zimniak A, Racker E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry*. 1979, 18: p2210-2218.

Turner JR, Black ED. NHE3-dependent cytoplasmic alkalinization is triggered by Na⁺-glucose co-transport in intestinal epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004: 281: C1533-C1541.

Turner JR, Zhao H, Shiue H, Palkon S, Wang Y, Culliman P, Burkhardt JK, Musch MW, Chang EB. Ezrin regulates NHE3 translocation and activation after Na⁺-glucose cotransport. *PNAS*. 2004; 50(5): 101-125.

Vallon V, Blantz RC, Thomson S. Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback is reduced in established diabetes mellitus in rats. *AJP Renal Physiol*. 1995; 269: 876-883.

Vallon V, Richter K, Blantz RC, THOMSON S, OSSWALD H. Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 2569-76.

Weiss RB. Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep*. 1982; 66: 427-438.

Wright, EM, Hirsch JR, Loo DDR, Zampighi GA. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter. *J Exp Biol*. 1997; 200, 2: 287-293.

Wright, EM. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 280: F10-F18.

You G, Lee WS, Barros JG, Kanai Y, Huo TL, Khawaja S, Wells RG, NIGAM SK, HEDIGER MA. Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J Biol Chem*. 1995; 270: 29365–29371.

Zachos N, Tse M, Donowitz M. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchanger. *Annu Rev Physiol*. 2005; 67: 411–443.

Zeuthen T. The mechanism of water transport in Na⁺-coupled glucose transporters expressed in *Xenopus* Oocytes. *Biophysical Journal*. 2007; 93: 1413-16.

Zhao H, Shiue H, Palkon S, Wang Y, Cullinan P, Burkhardt JK, Musch MW, Chang EB, Turner JR. Ezrin regulates NHE3 translocation and activation after Na⁺-glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 9485–9490.

Zhao H, Yakar S, Gavrilova O, Sun H, Zhang Y, Kim H, Setser J, Jou W, Leroith D. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53: 2901–09.