

Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima

**EFEITO DA UROGUANILINA SOBRE O TRANSPORTE DE
HIDROGÊNIO EM TÚBULOS RENAIIS DE RINS DE RATO E
EM LINHAGENS DE CÉLULAS PROXIMAIS E DISTAIS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia Humana.

São Paulo
2009

RESUMO

Lessa LMA. Efeito da Uroguanilina sobre o transporte de hidrogênio em túbulos renais de rato e em linhagens de células renais proximais e distais [Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

As guanilinas são peptídeos normalmente sintetizados no intestino que modulam o balanço de sódio através de ações renais. A uroguanilina é o principal membro desta família de peptídeos, por promover efeitos renais mais significativos. Tem sido postulada a participação deste peptídeo em um eixo endócrino, ligando o intestino ao rim, contribuindo para a regulação da homeostase hidrossalina. Em nosso trabalho, investigamos os efeitos e os mecanismos de sinalização envolvidos na ação da uroguanilina (UGN) sobre a secreção de H^+ , em túbulos renais de ratos e em células LLC-PK1 (proximais) e MDCK-C11 (distais). Nos estudos *in vivo* foi utilizada a técnica de microperfusão estacionária, na qual medimos a secreção de H^+ em túbulos proximais e distais de rins de rato, utilizando um microeletrodo sensível a H^+ . Nos estudos *in vitro*, para medir a atividade de NHE3 e H^+ -ATPase, utilizamos a medida de recuperação de pH intracelular após um pulso ácido com NH_4Cl , usando BCECF como sonda sensível a pH. Além disso, realizamos experimentos com western blott para medir o nível de fosforilação de NHE3 em células LLC-PK1. Em túbulos renais proximais e distais de ratos a UGN, na concentração de $1\mu M$, inibiu significativamente a reabsorção de bicarbonato. Este efeito foi abolido por KT5823 (inibidor de PKG). A adição de H-89 (inibidor de PKA) também aboliu o efeito da UGN em túbulos proximais. Nos estudos *in vitro* UGN reduziu a atividade de NHE3 na presença de $500nM$ HOE (inibidor de NHE1). Este efeito foi reduzido por KT5823 e abolido por H-89. O análogo do cGMP, 8br-cGMP, mimetizou os efeitos promovidos por UGN tanto em túbulos proximais e distais de rato como em células LLC-PK1. O tratamento de células LLC-PK1 com UGN aumentou o nível de fosforilação da serina 552 (sítio consensual de fosforilação por PKA) da molécula NHE3 a partir de 5 minutos. Além disso, uma diminuição da expressão de NHE3 na membrana foi observada após o tratamento de células LLC-PK1 por 30 minutos com UGN. Em células MDCK-C11, UGN inibiu a atividade da H^+ -ATPase na presença de EIPA (inibidor do permutador Na^+/H^+) e Schering 28080 (inibidor da H^+/K^+ -ATPase). Este efeito foi abolido pela adição de KT5823 (inibidor de PKG). Além disso, 8br-cGMP mimetizou o efeito de UGN em células MDCK-C11. Nossos dados em microperfusão sugerem que UGN inibe a reabsorção de bicarbonato em túbulos proximais e distais de rato por um mecanismo dependente de PKG. No entanto, em túbulos proximais, a ativação da PKA parece também estar envolvida no efeito da UGN. Os estudos em células LLC-PK1 indicam o envolvimento da ativação da PKA estimulada por cGMP, no efeito inibitório da UGN sobre o NHE3, constituindo um mecanismo de "cross-talk". Dessa forma, UGN ativaria um receptor de guanilato ciclase de membrana que promoveria aumento dos níveis de cGMP que regularia o conteúdo de cAMP por inibir a fosfodiesterase 3. O aumento dos níveis de cAMP culminaria com ativação de PKA, que promoveria a fosforilação e inibição do NHE3 em células LLC-PK1. Nosso estudo também sugere que UGN inibe a atividade de H^+ -ATPase em células MDCK-C11 por um mecanismo dependente de PKG.

Palavras-chave: Guanilina; Hidrogênio; Uroguanilina; Microperfusão Renal; Reabsorção de Bicarbonato.

ABSTRACT

Lessa LMA. Effect of Uroguanylin on hydrogen transport in rat renal tubules and in proximal and distal cells lines [Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The guanylinins are peptides usually synthesized in the intestine and modulate sodium balance through actions in the kidney. Uroguanylin (UGN) is the most important member of this family of peptides, because it promotes the most significant renal effects. It has been postulated that this peptide may participate in an endocrine axis linking the intestine to the kidney, regulating hydroelectrolytic homeostasis. In the present work we investigated the effects and signaling mechanisms of UGN action on hydrogen secretion, in rat renal tubules and in proximal (LLC-PK1) and distal (MDCK-C11) cell lines. The *in vivo* studies were performed by the stationary microperfusion technique, in which, we measured H⁺ secretion in rat renal proximal and distal tubules, through a H⁺ sensitive microelectrode. In the *in vitro* studies, to measure NHE3 and H⁺-ATPase activities, we used fluorescence microscopy, measuring intracellular pH recovery after an acid pulse with NH₄Cl, using BCECF as pH sensitive dye. Moreover, we performed western blott experiments to measure the phosphorylation level of NHE3 in LLC-PK1 cells. At a concentration of 1 μM, UGN significantly inhibited the net of bicarbonate reabsorption in both proximal and distal tubules. This effect was abolished by KT5823 (PKG inhibitor). The administration of H-89 (PKA Inhibitor) in proximal tubules also abolished the UGN effect. In the *in vitro* studies UGN inhibited the NHE3 activity in the presence of 500nM HOE (NHE1 inhibitor). This effect was reduced by KT5823 and completely abolished by H-89. The cGMP analogue, 8br-cGMP, mimicked the effects promoted by UGN in renal tubules and in LLC-PK1 cells. The treatment of LLC-PK1 cells with UGN during 10 min, increased the phosphorylation of 552 serin (PKA phosphorylation consensus site). In addition, the incubation for 30 min of LLC-PK1 cells with UGN promoted a reduction of the amount of NHE3 in the cell surface. In MDCK-C11 cells, UGN inhibited the activity of H⁺-ATPase in the presence of EIPA (NHE1 inhibitor) and Schering 28080 (H⁺/K⁺-ATPase inhibitor). This effect was abolished by KT5823. Moreover, 8br-cGMP mimicked the effect of UGN in MDCK-C11 cells. Our data, with microperfusion experiments suggest that UGN inhibits the net of bicarbonate reabsorption in both proximal and distal tubules by a mechanism dependent on PKG. However, in proximal tubules, the activation of PKA seems to be involved in UGN effect. The studies in LLC-PK1 cells also indicate the activation of PKA stimulated by cGMP on the inhibitory effect of NHE3 promoted by UGN, constituting a cross-talk mechanism. Therefore, UGN would activate a membrane guanylate cyclase receptor, which generates cGMP, that inhibits phosphodiesterasis III, increasing the intracellular cAMP content. Ultimately, cAMP might be activating PKA, that phosphorylates and inhibits NHE3. Our study also suggest that UGN inhibits the H⁺-ATPase activity in MDCK-C11 cells by a mechanism dependent on PKG.

Key words: Guanylin; Hydrogen; Uroguanylin; Renal Microperfusion; Bicarbonate Reabsorption.

1 INTRODUÇÃO

O rim desempenha um papel crucial na homeostase do volume de fluido extracelular, regulando o nível de NaCl dos organismos vivos (Weinberger, 1990; Garbers e Dubois, 1999). Fundamentalmente, alterações no nível de cloreto de sódio, tanto por aumento da ingestão como pela perda inapropriada, por processos patológicos diversos, levam a ajustes na excreção urinária, sendo esta modulada por mecanismos variados restabelecendo a homeostase de volume (Hall, 1991). O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) é essencial como regulador homeostático do equilíbrio hidrossalino (Hall, 1991). Angiotensina II (Ang II), como conseqüência da ativação deste sistema, tem seus níveis elevados, promovendo além de uma ação sistêmica, ações intrarenais que incluem um efeito direto no transporte de sódio tubular, assim como uma potente vasoconstrição das arteríolas, tanto aferentes como um pouco mais as eferentes, o que aumenta a reabsorção de fluido por alterar a pressão nos capilares peritubulares (Hall, 1991). Ademais, Ang II estimula a secreção de Aldosterona pela suprarrenal que promove o aumento da reabsorção distal de NaCl, e, como conseqüência, reduz a sua excreção.

Enquanto o sistema RAA é geralmente visto como um mecanismo que promove a conservação de NaCl, em resposta a uma contração do volume extracelular, outros sistemas que aumentam a excreção de sódio são recrutados sob condições que conduzem ao seu excesso. Por exemplo, o peptídeo natriurético atrial (ANP) pode rapidamente aumentar a eliminação de sódio, por promover um aumento no ritmo de filtração glomerular (Melo e Ackerman, 2000), diminuição da hipertonicidade medular e efeitos tubulares diretos que diminuem a reabsorção de sódio em segmentos proximais e de ducto coletor medular de nefros (Cogan, 1990). Um dos principais estímulos para a liberação de ANP seria o aumento de tensão das paredes dos átrios, como nos estados de hipervolemia. Dessa forma, este sistema tem sua ativação dependente de um aumento inicial no conteúdo total de NaCl corpóreo. Assim, tem sido postulado que o ANP não desempenha um papel significativo no dia-a-dia da homeostase de NaCl (Cogan, 1990; Melo e Ackerman, 2000).

Por outro lado, foi demonstrado que no homem e em animais de laboratório, o NaCl administrado por via oral é mais rapidamente excretado que

o equivalente aplicado por via venosa (Carey *et al.*, 1976; Carey, 1978). Os dados destes pesquisadores apóiam o conceito de que o aporte de NaCl absorvido pelo intestino resulta na geração de sinais celulares ao rim que regulam a excreção de sódio, compensando o excesso de carga absorvida. Os primeiros dados da literatura relativos à diurese salina foram propostos por De Wardener no início dos anos 60 (De Wardener *et al.*, 1961), em seus clássicos experimentos de busca pelo fator III em cães expandidos por infusão salina. Coube, entretanto, ao grupo de Carey demonstrar que a excreção urinária de sódio é significativamente elevada no período de quatro horas imediato a uma carga oral de NaCl na dieta (Carey *et al.*, 1976; Carey 1978). Em claro contraste, uma infusão de carga de sódio, por via intravenosa, resulta numa menor excreção de cloreto de sódio dentro do mesmo período. Portanto, um mediador putativo “fator natriurético intestinal” foi então sugerido, o qual seria capaz de ligar o intestino aos rins, regulando a excreção renal em resposta à ingestão de sal da dieta. Há precedentes demonstrados no intestino quando avaliamos a dependência à glicose do peptídeo insulino-trófico (GIP) que, após uma refeição plena, é liberado no sangue e estimula a conseqüente liberação pancreática de insulina antes do aumento plasmático da concentração de glicose (Brown e Otte, 1979). Além disso, a expressão e ativação do ANP não são influenciados diretamente por cargas de sódio oral. Então, outros fatores devem estar envolvidos neste processo de regulação.

1.1 FAMÍLIA DAS GUANILINAS

A toxina termo-estável (STa) é um pequeno peptídeo secretado por cepas enterotoxigênicas da *Escherichia coli*, que aumenta a secreção de eletrólitos e água no lúmen intestinal, causando a bem conhecida diarreia do viajante. Hughes e colaboradores (1978) demonstraram que esta toxina age via aumento das concentrações de GMPc nas células intestinais e que o análogo lipossolúvel do GMPc, 8-bromo GMPc, mimetiza a ação da STa (Hughes *et al.*, 1978). Lima e Fonteles (1982) foram os primeiros a demonstrar que a STa possuía propriedades natriuréticas, caliuréticas e diuréticas no rim isolado e perfundido de rato usando uma toxina semi-purificada (Lima e Fonteles, 1982), um fato confirmado 10 anos após com a toxina pura (Lima, Monteiro e Fonteles, 1992).

Em 1990, Schulz e colaboradores clonaram uma enzima, a guanilil ciclase ligada à membrana (GC-C) do intestino de rato e demonstraram que a mesma era ativada após ligação com STa (Schulz *et al.*, 1990). Além disso, uma série de investigações revelou que a toxina STa ativaria um receptor órfão (GC-C) encontrado em rim, como também em outros órgãos de opossum (Forte *et al.*, 1988; Krause *et al.*, 1990). A busca por um análogo da STa endógeno que ativaria este receptor órfão levou à descoberta das guanilinas. No entanto, apesar da descoberta que os efeitos da STa eram mediados através da ativação da guanilil ciclase de membrana ter sido publicada em 1978, levou ainda mais de uma década para Currie e colaboradores isolarem um análogo da STa do jejuno de rato (Currie *et al.*, 1992). Este peptídeo, que foi denominado guanilina, é um ativador endógeno da guanilil ciclase C intestinal, que até então era considerado um receptor órfão.

Um ano após a descoberta da guanilina, um segundo peptídeo similar à STa, chamado uroguanilina (UGN), foi isolado a partir de urina de opossum (*Didelphis virginiana*) (Hamra *et al.*, 1993). As estruturas primárias da guanilina e uroguanilina são similares, e ambas compartilham alto grau de identidade com a toxina termo-estável (STa). A guanilina humana consiste de 15 aminoácidos e possui duas pontes dissulfeto entre as cisteínas das posições de 4 a 12 e 7 a 15 (de Sauvage *et al.*, 1992) (Figura 1). A uroguanilina humana consiste de 16 aminoácidos e também apresenta duas pontes dissulfeto nas mesmas posições (Kita *et al.*, 1994) (Figura 1). Estas pontes dissulfeto influenciam a conformação, e desta maneira a atividade biológica destes peptídeos. A STa também apresenta 16 aminoácidos, sendo que existem três pontes em sua estrutura (Carpick e Gariepy, 1991). Os genes que codificam os peptídeos de guanilina estão localizados no cromossomo 1 humano (p33 a p36) e no cromossomo 4 no rato (Schulz, 1999). Guanilina e uroguanilina são codificadas por genes similares que consistem de três exons e dois introns.

Tanto guanilina como uroguanilina são sintetizados como propeptídeos, que estão presentes em grande quantidade no epitélio intestinal e são secretados no lúmen intestinal e na circulação em resposta ao aumento de NaCl luminal (Kita *et al.*, 1999). Além do mais, o mRNA para estes peptídeos tem sido encontrado em muitos outros tecidos como o rim, cérebro, medula adrenal, miocárdio e epitélio das vias aéreas (De Sauvage *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 1996;

Fan *et al.*, 1997). A família dos peptídeos de guanilina vem crescendo ao longo dos anos; o último membro descoberto é a renoguanilina (RNG) isolada de enguias, que tem similaridades estruturais para com guanilina e uroguanilina, apresentando também duas pontes dissulfeto (Yuge *et al.*, 2003).

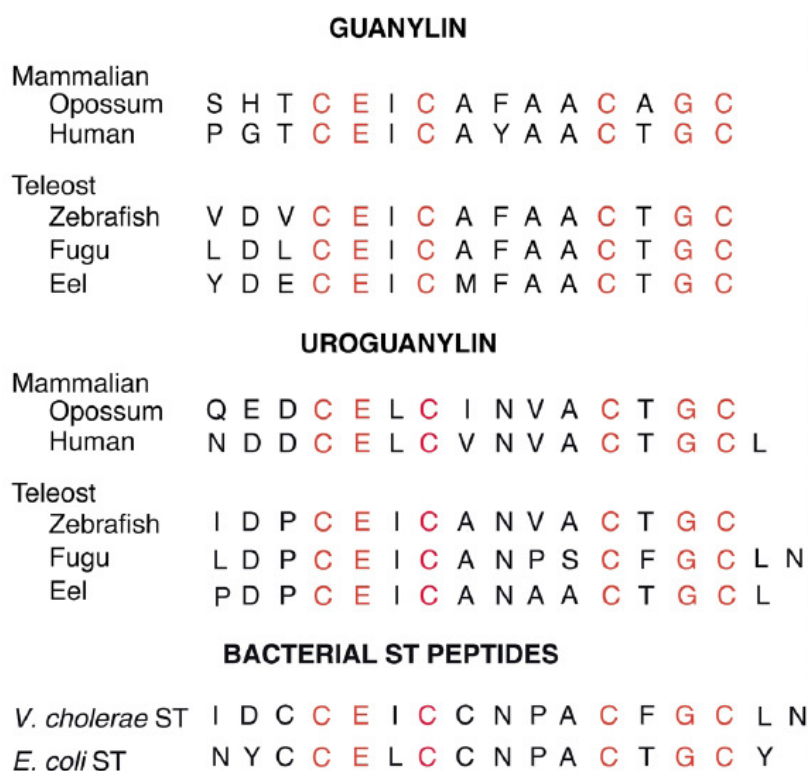


Figura 1: Estruturas primárias de guanilina, uroguanilina e peptídeos ST de bactérias. Os peptídeos estão alinhados usando os resíduos de cisteínas conservados, encontrados nas três classes de peptídeos.
Fonte: Forte, 2003.

Os efeitos biológicos da uroguanilina, guanilina e STa foram comparados em experimentos com células renais e intestinais. O acúmulo de cGMP intracelular promovido pelos três agonistas em células OK (rim de opossum) e T84 (intestinal) foi estudado. A ativação do receptor de guanilato ciclase em células OK (OK-GC) pelos agonistas revelou uma ordem de potência distinta, na qual a STa se mostrou substancialmente mais potente que a uroguanilina, a qual é mais potente que a guanilina (London *et al.*, 1999). Similarmente, aos resultados com células OK, a ativação da GC-C em células T84 pelos peptídeos foi mais pronunciada com o tratamento das células com STa, seguida por

uroguanilina e guanilina (Hamra *et al.*, 1997). Além disso, outro estudo utilizando a técnica de perfusão de rim isolado de rato, demonstrou que o efeito natriurético estimulado pelos peptídeos é mais pronunciado após o tratamento com uroguanilina do que com guanilina (Fonteles *et al.*, 1998). Vale salientar ainda que este estudo revelou que a atividade biológica estimulada por STa é mais semelhante ao efeito promovido por uroguanilina do que por guanilina, no que diz respeito à magnitude de efeito (Fonteles *et al.*, 1998). Uma característica estrutural que pode estar relacionada à maior potência de STa e uroguanilina em comparação à guanilina, seria a que uroguanilina e peptídeos ST de bactérias apresentam resíduos de asparagina conservados em suas estruturas primárias (Figura 1), os quais conferem resistência ao ataque por endopeptidases, tal como a quimiotripsina (Carpick e Garipey, 1993; Hamra *et al.*, 1996). Em contraste, a guanilina é rapidamente degradada e inativada por hidrólise em resíduos de tirosina ou fenilalanina da alça C-terminal do peptídeo. Além disso, inibidores de proteases aumentam a atividade biológica de guanilina em rins (Santos-Neto *et al.*, 2003).

Inicialmente, foi considerado que o principal papel fisiológico dos peptídeos guanilina e uroguanilina seria regular a secreção de fluido e eletrólitos através do epitélio intestinal. No entanto, estudos utilizando camundongos transgênicos deficientes em R-GC-C, ou em guanilina, ou uroguanilina parecem não desenvolver anormalidades na secreção de fluido intestinal (Schulz *et al.*, 1997; Steinbrecher *et al.*, 2002; Lorenz *et al.*, 2003). Estes achados sugeriram que outros papéis fisiológicos para guanilina e uroguanilina poderiam existir, incluindo a regulação da função renal. Com a posterior demonstração de efeitos renais promovidos por peptídeos de guanilina (Lima *et al.*, 1992; Fonteles *et al.*, 1998; Carrithers *et al.*, 1999), e sendo a uroguanilina, o peptídeo endógeno com ações renais mais pronunciadas, tem sido postulado que este peptídeo atuaria nos rins através de um eixo endócrino, ligando o trato gastrointestinal ao rim na regulação da homeostase hidrossalina (Forte *et al.*, 1996).

1.2 PAPEL DA UROGUANILINA NA REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE HIDROSSALINA

A uroguanilina é expressa em todo o trato intestinal, e existe em concentrações apreciáveis no plasma do homem e de outros animais (Fan *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1999; Kinoshita *et al.*, 1997a; Kinoshita *et al.*, 1997b). Como mencionado anteriormente, é resistente à clivagem por proteases (Hamra *et al.*, 1993; Fan *et al.*, 1997), e facilmente isolada da urina de mamíferos (Fan *et al.*, 1997). Ademais, foi recentemente demonstrado que a expressão intestinal de uroguanilina pode ser regulada pela quantidade de ingestão de sal na dieta (Ott *et al.*, 2000). Um estudo recente também demonstrou que a hipertonicidade extracelular pode modular a expressão intestinal de uroguanilina (Steinbrecher *et al.*, 2002).

Efeitos renais da uroguanilina incluem natriurese, caliurese, diurese e aumento da excreção de cGMP (Fonteles *et al.*, 1998). Além disso, Potthast e colaboradores (2001) demonstraram que a dieta rica em sal aumenta a expressão da uroguanilina no rim de camundongos (Potthast *et al.*, 2001), como também aumenta a resposta natriurética e excreção urinária do peptídeo (Fukae *et al.*, 2002).

Camundongos deficientes em uroguanilina desenvolvem aumento significativo da pressão arterial, e quando submetidos a uma dieta rica em sal, o efeito natriurético diminui significativamente (Lorenz *et al.*, 2003). Além disso, estudos recentes demonstram que estes camundongos “Knockout” para UGN, desenvolvem alterações no processo de redistribuição da isoforma NHE3 do trocador Na^+/H^+ , em túbulos proximais, o que promove aumento na reabsorção proximal de sódio (Elitsur *et al.*, 2006).

Foi demonstrado ainda, que pacientes com síndrome nefrótica apresentam aumento dos níveis plasmáticos e urinários de uroguanilina. Ademais, a expressão de mRNA para o peptídeo também se encontra aumentada nos rins destes pacientes (Kikuchi *et al.*, 2005). Este achado pode estar relacionado ao fato de que na síndrome nefrótica ocorre um aumento da retenção de NaCl pelos rins, o que estimula a produção de uroguanilina. Além

disso, em pacientes com retenção de sódio secundária à insuficiência cardíaca, os níveis de uroguanilina estão aumentados na urina (Carrithers *et al.*, 2000).

Coletivamente, estes dados fornecem forte evidência que a uroguanilina participa da regulação da homeostase hidrossalina, particularmente com relação ao manejo da dieta rica em sal. Além disso, existem mecanismos que regulam a produção e/ou secreção de uroguanilina quando a retenção de sódio ocorre secundariamente a processos patológicos nos rins, coração, ou outros órgãos. O aumento nos níveis de mRNA para uroguanilina tanto em células intestinais como em renais, em resposta a um incremento no conteúdo de NaCl na dieta, sugere que ambas ações endócrina e parácrina/autócrina podem participar dos mecanismos de sinalização tubular que governam o transporte de sal.

O principal sítio de expressão de uroguanilina em intestinos de ratos são as células enterocromafins (Perkins *et al.*, 1997; Nakazato *et al.*, 1998). Estudos recentes demonstram que a uroguanilina é estocada especialmente neste tipo celular e liberada na circulação na forma de seu precursor, a prouroguanilina (Moss *et al.*, 2008). O mesmo acontece com outros peptídeos hormonais como ANP que é estocado quase exclusivamente na forma propeptídeo inativa (Sei *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 2000; Chai e Danser, 2005). Foi demonstrado ainda que a infusão de prouroguanilina em ratos promove efeitos natriuréticos e diuréticos. Qian e colaboradores demonstraram que o processo de conversão da prouroguanilina em sua forma ativa ocorre na luz dos túbulos renais (Qian *et al.*, 2008). Dessa forma, este estudo sugere que a prouroguanilina é o verdadeiro agente endócrino que é liberado em resposta à ingestão de sal, e que a resposta dos rins é dependente da conversão do propeptídeo a sua forma ativa após alcançar os túbulos renais (Qian *et al.*, 2008).

O sítio intrarenal onde o processo de conversão de prouroguanilina à uroguanilina ocorre ainda não foi identificado. No entanto, tem sido sugerido que o propeptídeo intacto poderia passar através da barreira de filtração glomerular e o processamento para conversão ao peptídeo ativo ocorreria dentro do lúmen tubular por proteases residentes na borda em escova epitelial do túbulo proximal. Esta hipótese é considerada pelo fato de que a prouroguanilina circula no plasma como um peptídeo de 9,4 KDa, não-complexado com proteínas

carreadoras, e, assim, é pequena o bastante para ser livremente filtrada, sendo liberada no lúmen tubular em sua forma intacta. Além disso, Qian e colaboradores demonstraram que o curso de tempo do clearance de prouroguanilina do plasma foi bastante similar ao da inulina, o que reforça a idéia de que o clearance renal de prouroguanilina é devido à filtração e não à secreção (Qian *et al.*, 2008).

Recentemente Qian e colaboradores (2008) desenharam um modelo para o papel biológico da prouroguanilina no controle da homeostase hidrossalina. O modelo ignora a ação da uroguanilina sobre o potássio, o qual também tem sua secreção regulada pelo peptídeo em túbulos renais (Fonteles *et al.*, 1998). Na Figura 2 observamos um desenho esquemático do modelo proposto por Qian e colaboradores (2008). De acordo com o modelo a ingestão de sal estimularia a secreção apical e basolateral de uroguanilina pelas células enterocromafins presentes principalmente no intestino delgado. A prouroguanilina que seria secretada pela membrana apical das células seria convertida a uroguanilina por proteases presentes no lúmen intestinal. A uroguanilina, dessa forma, atuaria regulando mecanismos de transporte epitelial de eletrólitos. O resultado principal seria o aumento da secreção de cloreto e sódio para o lúmen e supressão da absorção de sódio a partir do lúmen. Em paralelo a prouroguanilina secretada pela membrana basolateral alcançaria os rins, onde seria filtrada e convertida em peptídeos menores e aminoácidos livres por proteases residentes na borda em escova das células do túbulo proximal. Os aminoácidos livres retornariam à circulação, e a uroguanilina ativa atuaria nos segmentos do nefro regulando o transporte tubular de eletrólitos, resultando na diminuição da reabsorção de sal pelos rins. Dessa forma, esta via endócrina poderia coordenar a atividade dos dois principais órgãos envolvidos na homeostase de eletrólitos: o intestino, onde o sal é absorvido, e o rim, onde o sal é excretado. Além disso, a liberação de prouroguanilina poderia ocorrer também em resposta a uma expansão de volume, tal como ocorre na falência renal ou cardíaca (Qian *et al.*, 2008).

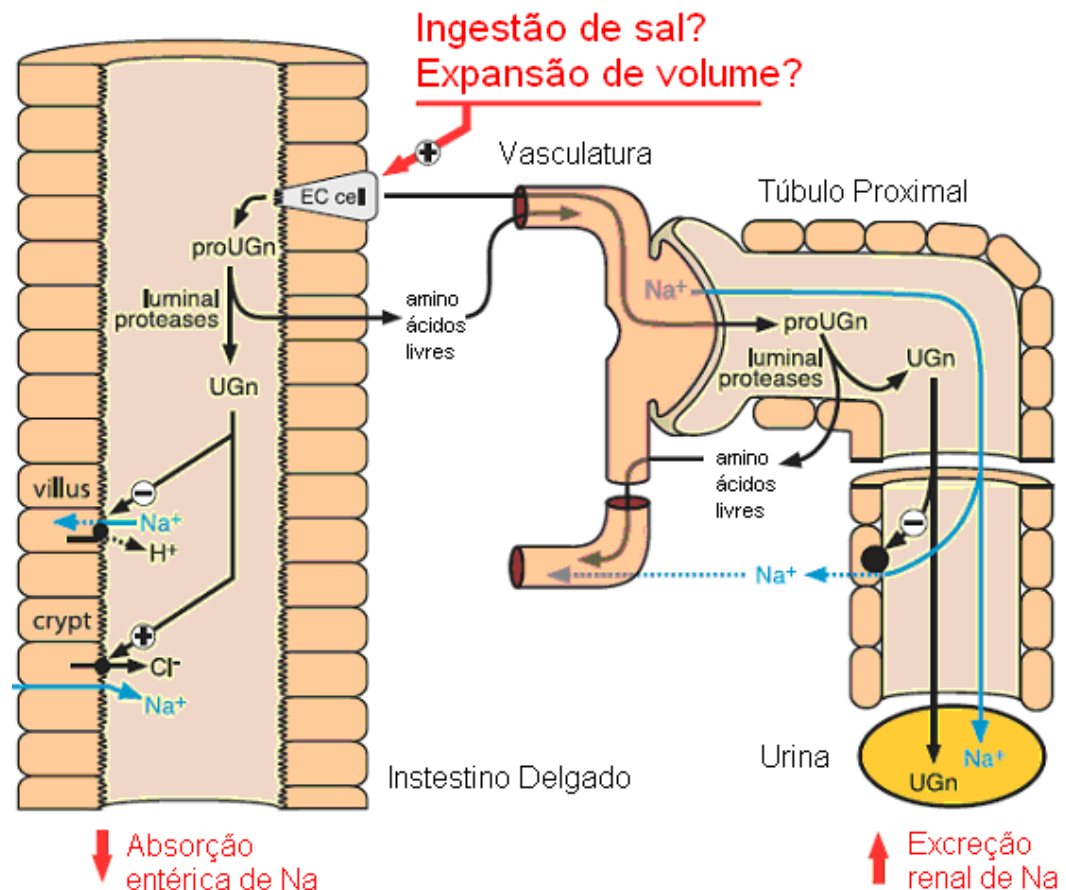


Figura 2: Desenho esquemático do modelo postulado por Qian e colaboradores (2008), para a resposta pós-prandial à ingestão de sal em ratos. Descrição do modelo se encontra no texto. Ugn-uroguanilina; ProUgn-prouroguanilina; EC-células enterocromafins.

Fonte: Modificada de Qian *et al.*, 2008.

A regulação do transporte de eletrólitos pelo intestino por uroguanilina envolve a ativação do receptor de guanilato ciclase C (Hamra *et al.*, 1993; Carrithers *et al.*, 2004). A ativação desta via no intestino promove o aumento dos níveis intracelulares de GMPc, que está relacionado à inibição do trocador Na^+/H^+ , e ativação do canal para cloreto da fibrose cística (CFTR), que permite a secreção de Cl^- e HCO_3^- (Fawcus *et al.*, 1997).

Tanto os sítios das ações como as vias de sinalização dos peptídeos de guanilina no rim ainda não estão bem compreendidas. Dietas ricas em sal aumentam as concentrações de UGN e GMPc na urina, porém em camundongos “Knockout” para GC-C, os peptídeos de guanilina ainda causam

natriurese, caliurese e diurese, sugerindo a existência de mais de uma via de sinalização para esses peptídeos no rim (Carrithers *et al.*, 2004)

Estudos utilizando linhagens de células em cultura sugerem que uroguanilina inibe a reabsorção de Na⁺ em túbulos proximais de rins. Foi demonstrado que a uroguanilina diminui a expressão da Na⁺/K⁺-ATPase, o que diminuiria o gradiente de concentração para o Na⁺ através da membrana apical, e, dessa forma, diminuiria a atividade de transportadores apicais dependentes da energia gerada por este gradiente (Carrithers *et al.*, 1999) Recentemente, um estudo demonstrou o aumento de cGMP por uroguanilina em uma linhagem de células de túbulo proximal de humanos (IHKE1) (Sindic *et al.*, 2002). Neste estudo, foi sugerido que uroguanilina diminui a força movente para reabsorção de Na⁺, por inibir canais para K⁺ via ativação de cGMP e estimular a despolarização das células (Sindic *et al.*, 2002). Em adição a esta via dependente de GC-C, foi demonstrado por este estudo que uroguanilina pode ativar um receptor do tipo proteína G sensível à toxina pertussis, promovendo o aumento de condutância para potássio (Sindic *et al.*, 2002). Em outro estudo, utilizando células de ducto coletor de humanos, o tratamento com uroguanilina promoveu modificações no transporte para K⁺, como a inibição de canais do tipo ROMK mediada por ativação da via do ácido aracdônico por uroguanilina (Sindic *et al.*, 2005). Este dado indica uma inibição na secreção de potássio promovida por uroguanilina, o que iria diminuir a força movente para a entrada de Na⁺ nas células de ducto coletor, estimulando a natriurese. Porém, os mecanismos envolvidos no processo de caliurese estimulada pelo peptídeo ainda não foram descritos.

Os peptídeos de guanilina apareceram bem cedo no processo evolutivo, já que são encontrados em todas as espécies animais examinadas (mamíferos, aves e peixes). Este fato indica a importância desses hormônios na manutenção da homeostase de água e eletrólitos em paralelo com outros sistemas regulatórios já conhecidos, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona, arginina vasopressina (AVP), e peptídeos natriuréticos como o ANP (Comrie *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 1995; Krause *et al.*, 1994; Krause *et al.*, 1990).

Desta maneira, com base nestes achados é sugerido que os peptídeos de guanilina participem de um eixo endócrino ligando o intestino ao rim, induzindo

este a excretar sal e água sempre que for necessário balancear as concentrações variáveis de sal em nossa dieta, representando o peptídeo natriurético intestinal introduzido por Lennane *et al.* (1975). Assim, a investigação dos sítios para as ações renais da uroguanilina, peptídeo da família das guanilinas com efeitos renais mais pronunciados, proverá maior entendimento dos processos envolvidos na regulação da homeostase eletrolítica. Como em nosso estudo investigamos o efeito da uroguanilina sobre os mecanismos renais de secreção de hidrogênio, em seguida será dada uma breve revisão sobre os principais mecanismos de acidificação tubular proximal e distal, dando uma maior ênfase aos transportadores NHE3 e H⁺-ATPase.

1.3 MECANISMOS DE ACIDIFICAÇÃO TUBULAR RENAL

Em virtude do grande número de processos sensíveis a alterações no pH, a homeostase ácido base tem atraído grande atenção ao longo das últimas décadas. Mudanças no pH extracelular (pH_o) podem afetar várias reações bioquímicas extracelulares (hemostasia e fixação de complemento) e influenciar a ligação de várias substâncias (hormônios, metais e agentes terapêuticos) a proteínas plasmáticas ou a receptores de membrana. Além disso, canais iônicos e transportadores de membranas epiteliais também são sensíveis a variações no pH extracelular (Bevensee e Boron, 2008). Adicionalmente, a regulação do pH intracelular é de importância vital para todas as células do organismo, já que virtualmente todos os processos biológicos são sensíveis a pH (Boron, 1986). Esta regulação é essencial para o adequado funcionamento dos processos bioquímicos celulares, sendo um dos parâmetros do meio interno que dispõe de uma faixa de variação bastante estreita (Woodbury *et al.*, 1974). Mudanças no pH_i são importantes na modulação do transporte transepitelial de solutos, na modificação das funções bioquímicas ou endocrinológicas e no controle do crescimento e diferenciação celulares (Boron, 1986).

Embora prótons sejam gerados e consumidos durante as várias reações químicas intracelulares, o balanço metabólico usualmente favorece a produção de ácidos pela célula. Um dos principais responsáveis pela eliminação deste

excesso de ácidos pelo organismo são os rins. Em condições fisiológicas a urina é consideravelmente mais ácida que o sangue. O pH normal sanguíneo é na ordem de 7,4 (7,35 a 7,45), enquanto o pH da urina varia normalmente entre 5 e 7. Para que o excesso de ácido produzido pelo organismo seja eliminado pelos rins é necessário que as células dos túbulos renais acidifiquem o filtrado, que tem o pH semelhante ao do plasma. Esse processo se dá pela secreção de H^+ promovida por transportadores presentes nas células tubulares renais. Em função da heterogeneidade morfológica, os vários segmentos do néfron exibem particularidades nos mecanismos de transporte de íons H^+ e HCO_3^- da célula para a luz tubular ou para o interstício, levando a diferentes conseqüências no processo de acidificação urinária (Capasso *et al.*, 1997). Enquanto os rins participam da regulação da homeostase ácido-base através da eliminação de H^+ na forma de íons amônio ou de acidez titulável e da reabsorção de bicarbonato filtrado, os pulmões participam do equilíbrio ácido-base através da excreção de ácidos voláteis, como o CO_2 , que é o ácido metabólico produzido em maior quantidade nos processos metabólicos.

Em condições fisiológicas, cerca de 80 a 90% da carga de bicarbonato filtrada é reabsorvida ao longo dos túbulos proximais (Chen e Boron, 1991; Morel e Doucet, 1986), principalmente nas porções iniciais (Gennari e Maddox, 2000). Neste segmento, como a reabsorção de HCO_3^- ocorre principalmente pela via transcelular, ela depende essencialmente da extrusão de ácido através da membrana luminal e da saída de bicarbonato através da membrana basolateral da célula (Chan e Giebisch, 1981; Chen e Boron, 1995; Nakhoul *et al.*, 1990).

A alta capacidade de secreção de H^+ pelo túbulo proximal é devida não apenas à atividade e número de transportadores contidos neste epitélio tubular, mas também a dois fatores adicionais. O primeiro deles é a grande carga de bicarbonato presente nesta porção do néfron, e o segundo, à presença de anidrase carbônica no citoplasma e ligada à membrana apical da célula tubular proximal. Ambos os fatores permitem que grandes quantidades de íons hidrogênio sejam secretadas antes que o pH tubular caia a níveis tão baixos que poderiam limitar secreções posteriores (Gennari e Maddox, 2000).

A reabsorção de bicarbonato em túbulos proximais ocorre em duas etapas: Na primeira delas, íons H^+ são secretados para o lúmen tubular e então titulam íons HCO_3^- filtrados, com conseqüente formação de H_2CO_3 , que por sua vez é convertido a CO_2 , que difunde para o interior celular e H_2O , que é excretada através da urina. Uma vez dentro da célula, o CO_2 reage com H_2O , formando H_2CO_3 , que instantaneamente se dissocia em H^+ e HCO_3^- . Tanto a desidratação luminal de H_2CO_3 quanto a hidratação intracelular de CO_2 são fortemente aceleradas pela anidrase carbônica. Uma visão alternativa da formação de bicarbonato parte da dissociação da H_2O , que libera OH^- , que reage com o CO_2 formando HCO_3^- , igualmente sob ação da anidrase carbônica. Independentemente de sua origem, os íons bicarbonato produzidos são então, em uma segunda etapa, extruídos da célula para o interstício, onde passam a constituir uma importante reserva alcalina do organismo (Figura 3, A) (Chen e Boron, 1991; Malnic, 1988).

Dos sistemas extrusores de ácido presentes nas células do túbulo proximal, o permutador Na^+/H^+ apical, especialmente a isoforma NHE3, é o predominante (Bichara *et al.*, 1983; Mello Aires e Malnic, 1979), acompanhado em uma menor proporção, de uma secreção de H^+ independente de Na^+ mediada por uma H^+ -ATPase do tipo vacuolar (Ulate *et al.*, 1993; Zimolo *et al.*, 1992). Dos mecanismos relacionados com o efluxo basolateral de bicarbonato, o mais importante neste segmento tubular é o cotransportador eletrogênico Na^+/HCO_3^- seguido pelo trocador Cl^-/HCO_3^- (Baum, 1987; Bernardo *et al.*, 1999; Grassl *et al.*, 1987).

A concentração de HCO_3^- que chega ao nefro distal é normalmente baixa, e o pH está usualmente na ordem de 6,5 a 7,5 (Buerkert *et al.*, 1983; DuBose *et al.*, 1979). O túbulo distal reabsorve esta parcela remanescente de HCO_3^- também através da secreção de H^+ , assim como nos túbulos proximais. No entanto, em contraste com o túbulos proximal o fluxo secretório de H^+ continua, mesmo após todo o HCO_3^- luminal ter sido reabsorvido, acidificando o pH da urina para menos que 5,5, sob determinadas condições. Este processo requer uma secreção ativa de H^+ , para gerar grandes gradientes de concentração para H^+ e HCO_3^- . Nos segmentos de túbulo distal final, túbulo de conexão e coletor cortical o tipo celular responsável pela secreção de prótons

são as células intercaladas, que apresentam como mecanismos de secreção de H^+ o permutador Na^+/H^+ , especialmente isoforma NHE2, e a H^+ -ATPase vacuolar, que é predominante nestes segmentos distais (Figura 4, A). Além disso, apresentam um permutador Cl^-/HCO_3^- basolateral, e em muitas das células intercaladas pode-se encontrar uma H/K -ATPase apical que promove a permuta de H^+ por K^+ , especialmente em situações de hipocalemia (DuBose e Codina, 1996; Wingo e Cain, 1993; Wingo e Smolka, 1995). Na maioria das células intercaladas secretoras de prótons, como em túbulos proximais, o processo de secreção de H^+ é também acelerado por uma anidrase carbônica citosólica e outra associada à membrana (Figura 4, A).

1.3.1 PERMUTADOR Na^+/H^+ , ISOFORMA NHE3

O NHE3 é uma das 10 isoformas conhecidas da família de genes do permutador Na^+/H^+ (NHE) de mamíferos (Brant *et al.*, 1995; Chambrey *et al.*, 1998; Goyal *et al.*, 2003; Numata *et al.*, 1998; Numata e Orłowski, 2001; Orłowski e Grinstein, 1997; Pizzonia *et al.*, 1998; Sardet *et al.*, 1989; Zachos *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). Os NHEs de mamíferos consistem de isoformas presentes primariamente na membrana plasmática de células ou de organelas citoplasmáticas (Brett *et al.*, 2005). No caso do NHE3, esta isoforma está presente no intestino, pâncreas, túbulos proximais renais e no segmento descendente fino da alça de Henle (Donowitz e Li, 2007). Em túbulos proximais de rim é o principal responsável pelo mecanismo de acidificação tubular que contribui para a reabsorção do bicarbonato filtrado.

A permuta de Na^+ por H^+ é reversível e dirigida pelos gradientes de concentração destes íons, não requerendo gasto direto de energia metabólica, tal como hidrólise do ATP (Cabado *et al.*, 1996). Sob condições fisiológicas, o gradiente de Na^+ voltado para o interior da célula é gerado pela Na^+/K^+ -ATPase. Este gradiente fornece energia necessária para extrusão de H^+ intracelular, que é trocado pelo Na^+ extracelular, com estequiometria rígida de 1:1 (Schwartz, 1981; Wakabayashi *et al.*, 1997). Em túbulos renais, a Na^+/K^+ -ATPase está presente apenas na membrana basolateral da célula, onde bombeia três íons Na^+ para fora da célula em troca de dois íons K^+ , mantendo, conseqüentemente, as concentrações de Na^+ baixas e de K^+ altas dentro da

célula, sendo o oposto válido para o compartimento extracelular. Sendo assim, os gradientes de concentração de Na^+ e a diferença de potencial entre o interior celular e o ambiente externo provêm a força pela qual muitos mecanismos de transporte de solutos, incluindo o permutador Na^+/H^+ , são ativados (Rector, 1983).

O permutador tem alta sensibilidade ao conteúdo de H^+ citosólico, promovendo a rápida extrusão do mesmo caso ocorra um declínio do pH intracelular dentro de um limite estreito. Esta característica é conservada entre as diferentes isoformas do trocador, embora a aparente sensibilidade ao H^+ , que determina o “set point” para ativação, varie entre as isoformas (Orlowski e Grinstein, 1997; Tse *et al.*, 1994). A observação da forte dependência da atividade de troca de Na^+ por H^+ em relação à concentração intracelular de H^+ , levou Aronson *et al.* a propor a existência de um sítio alostérico para H^+ , além do sítio de transporte, localizado na face citosólica da proteína. Este sensor de prótons é fundamental para a determinação da taxa de efluxo do íon necessária para reestabelecer o pH_i fisiológico (Aronson *et al.*, 1982; Wakabayashi *et al.*, 1992; Wakabayashi *et al.*, 2003).

As isoformas de NHEs clonadas apresentam um longo domínio N-terminal hidrofóbico com 10 a 12 segmentos transmembrana e um domínio C-terminal relativamente hidrofílico (que não atravessa a membrana) dirigido ao citoplasma (Figura 3, B) (Chow *et al.*, 1999; Moe, 1999). O domínio hidrofóbico é altamente conservado (40 a 70%) entre as isoformas e compõe o núcleo catalítico da proteína, enquanto a porção citoplasmática é menos conservada (10 a 20%) e participa da modulação do transporte por diversos agentes, tais como fatores de crescimento, hormônios e alterações de osmolaridade (Chow *et al.*, 1999; Goyal *et al.*, 2003; Zizak *et al.*, 2000).

O NHE3 presente na membrana apical das células de túbulo proximal de mamíferos medeia a reabsorção isotônica de aproximadamente dois terços da carga filtrada de NaCl e água. A taxa de reabsorção de NaCl envolve o acoplamento do NHE3 com o permutador Cl^-/base e a reciclagem de ácido ou o acoplamento triplo do cotransporte Na^+ -sulfato, permutador ânion-sulfato e permutador $\text{Cl}^-/\text{ânion}$ (Preisig e Rector, 1988; Aronson, 1996; Aronson e Giebisch, 1997). Além disso, o cotransporte transcelular de Na^+ com solutos

orgânicos acoplado ao transporte paracelular de Cl^- resulta na reabsorção de NaCl (Alpern *et al.*, 1985; Chantrelle *et al.*, 1985). A reabsorção de água resulta principalmente do gradiente osmótico criado através do epitélio tubular proximal pela reabsorção de NaCl. O fluxo de água pode ocorrer por via transcelular, através das aquaporinas, e/ou via junções paracelulares (Nielsen *et al.*, 1993; Schnermann *et al.*, 1998).

Corroborando com estas funções fisiológicas, camundongos “knockout” para NHE3 são hipovolêmicos, hipertensos e apresentam acidose metabólica, diminuição na reabsorção renal de Na^+ , de volume e HCO_3^- . Adicionalmente, a mortalidade destes camundongos é aumentada quando submetidos a uma dieta com baixo conteúdo de sal (Schultheis *et al.*, 1998).

A regulação aguda do NHE3 pode ocorrer dentre minutos a horas, está presente nos mecanismos fisiológicos digestivos e renais, ou na regulação por alterações na dieta, ou por regulação neurohumoral do intestino e rim, como também em estados patológicos, como diarreia (Alpern *et al.*, 1993; Moe, 1999). Os mecanismos envolvidos nesta regulação a curto prazo incluem alterações na taxa de transporte, no nível de fosforilação dos sítios da alça c-terminal citoplasmática, variações na quantidade de NHE3 expressa na membrana plasmática, por alterar os mecanismos de tráfego da proteína e alteração na meia-vida do NHE3 (Donowitz e Li; Bobulescu e Moe, 2009). A regulação crônica (horas a dias) do NHE3, ocorre na maioria dos casos através de mecanismos mais lentos e persistentes (tais como ativação transcricional), promove processos de adaptação a longo prazo, e pode ser mais importante em processos patológicos, tais como hipertensão (Bobulescu e Moe, 2009).

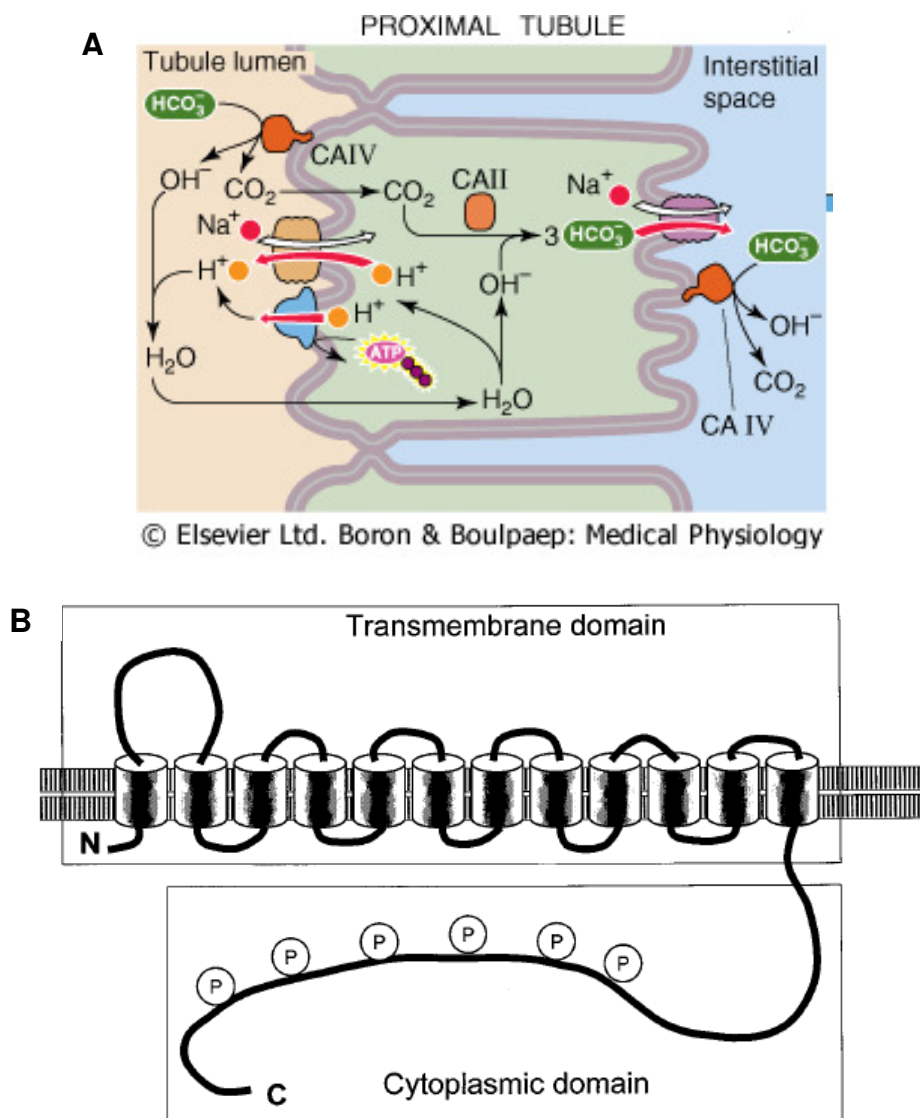


Figura 3: A, mecanismos de acidificação tubular / reabsorção de bicarbonato em células de túbulo proximal renal. B, Representação esquemática da estrutura proposta do permutador Na^+/H^+ , com doze segmentos transmembrana e diversos sítios de fosforilação em sua alça C-terminal.

Fonte: A: Boron e Boulpaep, 2003; B: Moe, 1999.

1.3.2 H⁺-ATPase VACUOLAR

A H⁺-ATPase vacuolar é um transportador de H⁺ ubíquo, encontrado com freqüência em vacúolos intracelulares e em lisossomos, responsáveis pela digestão de moléculas protéicas intracelulares ou de origem extracelular após sofrerem endocitose (Malnic, 2000). Além disso, uma série de processos fisiológicos, como dissociação ligante-receptor, endocitose mediada por receptor, degradação de macromoléculas e endereçamento intracelular de proteínas recém sintetizadas são também dependentes da atividade da bomba de prótons, já que tais mecanismos requerem um ambiente ácido para serem ativados (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003).

A bomba de prótons pode ser encontrada em membranas apicais de tecidos epiteliais, tais como túbulos renais e em membranas de organelas intracelulares. Em membranas de borda em escova de túbulos proximais renais de mamíferos, estas ATPases promovem a extrusão de prótons das células e são responsáveis por aproximadamente 20-30% da reabsorção de bicarbonato (Wagner *et al.*, 2004). Em ductos coletores corticais, estas ATPases são encontradas na membrana apical de células intercalares α , onde constituem o mais importante mecanismo de acidificação distal, além de participarem da transferência do íon H⁺ da célula para o interstício, quando inseridas na membrana basolateral de células β (Malnic, 2000). Através da função das células α , estes transportadores são responsáveis pela criação de gradientes consideráveis de pH através do epitélio do ducto coletor, o que pode gerar uma urina final de pH próximo ou até mesmo inferior a 5,0.

Estes transportadores são complexos de multisubunidades organizados em dois domínios funcionais principais que operam por um mecanismo rotatório (Figura 4, B). O domínio V₁ de 650 kDa é catalítico e citoplasmático, responsável pela hidrólise do ATP e outro domínio V₀ de 260kDa, integral de membrana e responsável pela translocação de prótons (Malnic, 2000; Forgac, 2007). Assim a bomba de prótons forma um complexo protéico de aproximadamente 900 kDa (Wagner *et al.*, 2004; Gluck *et al.*, 1996; Malnic, 2000; Forgac, 2007). O domínio V₁ forma um grande complexo, composto de 8

subunidades, designados pelas letras A-H e o domínio V_0 compreende cópias simples de a, c, c', c'' e d (Figura 4, B). Algumas destas subunidades, por sua vez, são codificadas por diferentes genes e apresentam mais de uma isoforma (Breton e Brown, 2007; Forgac, 2007).

A energia necessária para a extrusão de H^+ por este transportador ativo primário provém da hidrólise do ATP e não está acoplada diretamente ao movimento de outros íons. Ao invés disto, este sistema é eletrogênico e capaz de gerar um grande gradiente de H^+ através da membrana (Aronson, 1983; Bevensee *et al.*, 2000).

Da mesma forma que o NHE3, a regulação do transporte renal de H^+ por V-ATPases pode ocorrer na forma de respostas agudas, que ocorrem em minutos a horas, sendo usualmente reversíveis, e respostas crônicas, que ocorrem de horas a dias e normalmente requerem maiores mudanças na arquitetura celular. A regulação da H^+ -ATPase em resposta a estímulos diversos, pode funcionar em vários níveis, que inclui o controle da expressão dos genes para as subunidades (Lee *et al.*, 1995), modulação de sítios intracelulares, translocação de vesículas para a membrana plasmática (Brown *et al.*, 1991) e dissociação reversível dos domínios V_0 e V_1 , o que promove a inativação da bomba (Kane e Parra, 2000). Além disso, considerando que o mecanismo de transporte por esta ATPase é eletrogênico, a entrada de H^+ para o interior de vesículas torna o lúmen das mesmas mais positivo na ausência de uma corrente que dissipe esse gradiente elétrico, criando um gradiente eletroquímico desfavorável ao transporte de H^+ (Malnic, 2000). Tem sido bastante discutida a participação de uma condutância paralela a Cl^- que provê um desvio elétrico compensatório para as cargas positivas transferidas pela bomba, dissipando assim a diferença de potencial estabelecida pela ATPase (Malnic, 2000; Wagner *et al.*, 2004; Carraro-Lacroix *et al.*, 2009).

Nesta tese, será avaliada a interação de grande parte dos mecanismos acima discutidos, relacionados ao transporte de H^+ , com a atuação de guanilinas, particularmente da uroguanilina, peptídeo cuja função principal parece ser a interação entre a ingestão de sódio, isto é, a concentração de sódio na luz intestinal, com os mecanismos renais de excreção de sódio.

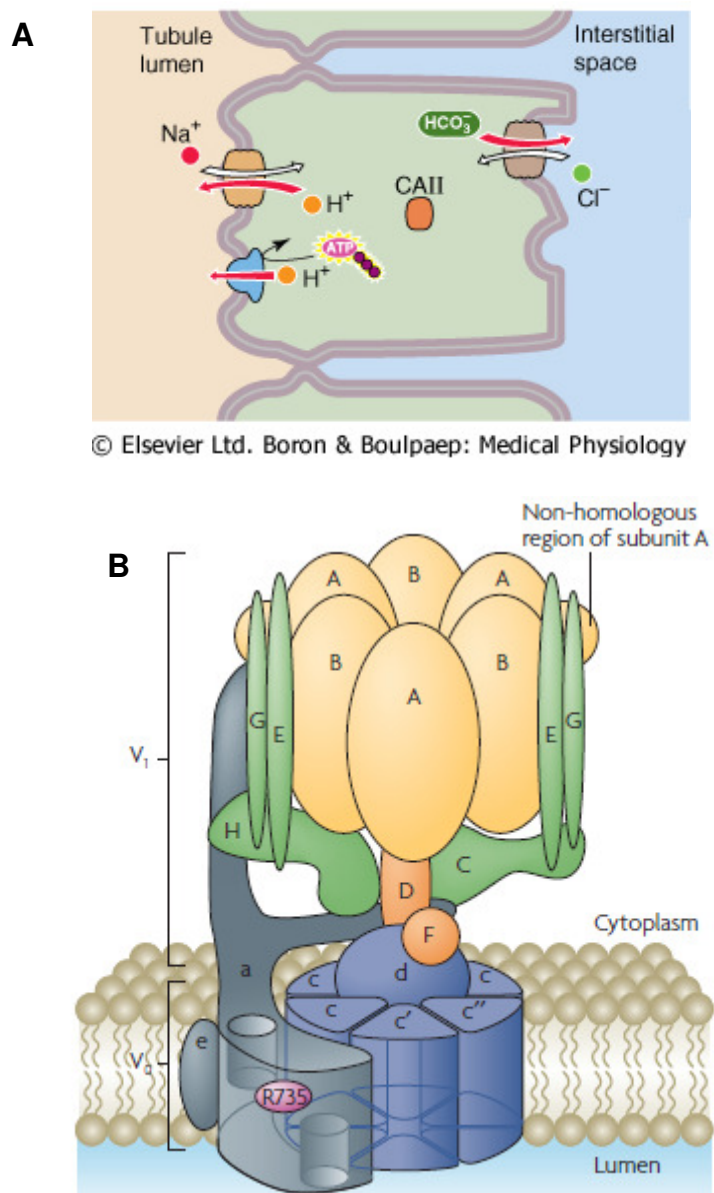


Figura 4: A, mecanismos de acidificação tubular / reabsorção de bicarbonato em células de túbulo distal final renal. B, Estrutura proposta da H^+ -ATPase vacuolar, composta por um domínio periférico/citoplasmático V_1 , responsável pela hidrólise do ATP, e um domínio transmembrana V_0 , envolvido na translocação de prótons.

Fonte: A: Boron e Boulpaep, 2003; B: Forgac, 2007.

2 CONCLUSÃO

Assim, observamos em nosso trabalho, que a UGN inibe o permutador NHE3 em túbulos proximais de rins de rato, já que na presença de HMA (inibidor não específico do permutador Na^+/H^+) não houve inibição adicional na taxa de reabsorção de bicarbonato, promovida por UGN. Este mecanismo envolve a ativação de PKG e PKA, uma vez que na presença de inibidores específicos para ambas as cinases, o efeito inibitório provocado por UGN sobre o NHE3 foi abolido. Os estudos *in vitro*, realizados em células de túbulos proximais, LLC-PK1, também demonstraram que a UGN inibe a atividade do permutador NHE3, haja vista que na presença de HOE 694 (inibidor do NHE1) e UGN houve uma inibição na recuperação de pHi dependente de Na^+ . Este efeito parece envolver um mecanismo de fosforilação do permutador por PKA, pois além de se observar um aumento da fosforilação da serina 552 (sítio consensual de fosforilação por PKA presente na molécula de NHE3), após incubação das células com UGN, se observou a inibição do efeito do peptídeo sobre a recuperação de pHi , na presença de H-89, inibidor de PKA. Tanto em túbulos proximais de rins de rato como em linhagens de células de túbulos proximais, o 8br-cGMP, análogo sintético do cGMP, mimetizou os efeitos promovidos por UGN. Adicionalmente, a UGN estimulou o aumento do conteúdo intracelular de cGMP em células LLC-PK1. Dessa forma, nossos dados sugerem a existência de um mecanismo de “cross-talk” entre as vias da cGMP e cAMP, no efeito da UGN sobre o permutador NHE3. Foi observado ainda que a UGN provoca a diminuição do conteúdo de NHE3 na membrana de células LLC-PK1. Apesar deste efeito não explicar nossos dados funcionais, representa outro mecanismo de inibição do permutador NHE3, promovido pelo peptídeo.

Nosso estudo demonstrou, ainda, que a UGN inibe a reabsorção distal de bicarbonato por um mecanismo que envolve a diminuição da atividade do permutador Na^+/H^+ e da H^+ -ATPase, uma vez que na presença de HMA se observou uma inibição adicional na secreção de hidrogênio, promovida por UGN. Em células MDCK-C11, uma linhagem de células de túbulos distais de rato, se observou que a UGN inibe a atividade da H^+ -ATPase, haja vista que na presença de EIPA (inibidor do permutador Na^+/H^+) e Schering 28080 (inibidor

da H^+/K^+ -ATPase) houve uma redução da recuperação de pH_i independente de Na^+ , promovida por UGN. Tanto em túbulos distais de rins de rato como em células distais, os efeitos da UGN foram também mimetizados por 8br-cGMP. Foi observado, ainda, o aumento do conteúdo intracelular de cGMP, após o tratamento de células MDCK-C11 com UGN. Além disso, o inibidor de PKG aboliu os efeitos distais promovidos pelo peptídeo. Estes dados indicam a ativação da via guanilato ciclase/cGMP/PKG no efeito da UGN sobre a H^+ -ATPase.

Dessa forma, em nosso estudo demonstramos que a UGN inibe a secreção de hidrogênio tanto em túbulos proximais como distais. Estes achados indicam a existência de dois sítios de ação para alguns dos efeitos renais promovidos por UGN, que são o NHE3 e a H^+ -ATPase. É importante salientar a contraposição dos efeitos deste peptídeo às ações renais do sistema renina-angiotensina-aldosterona, conhecido por estimular a retenção de Na^+ e a secreção de H^+ , com mecanismos que podem envolver o estímulos do permutador Na^+/H^+ e da H^+ -ATPase (Du *et al.*, 2003; Carraro-Lacroix e Malnic, 2006; Pech *et al.*, 2008). Dessa forma, o sistema das guanilinas parece desencadear mecanismos que antagonizam os mecanismos homeostáticos prevaletentes de retenção de sal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Alexander RT, Furuya W, Szaszi K, Orlowski J, Grinstein S. Rho GTPases dictate the mobility of the Na/H exchanger NHE3 in epithelia: role in apical retention and targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 23;102(34):12253-8.

Alpern RJ, Yamaji Y, Cano A, Horie S, Miller RT, Moe OW, *et al*. Chronic regulation of the Na/H antiporter. *J Lab Clin Med*. 1993;122:137-40.

Alpern RJ. Mechanism of basolateral membrane H⁺/OH⁻/HCO₃⁻ -transport in the rat proximal convoluted tubule: a sodium coupled electrogenic process. *J Gen Physiol*. 1985;86:613-37.

Ammann D, Lanter F, Steiner RA, Schulthess P, Shijo Y, Simon W. Neutral carrier-based hydrogen ion selective microelectrode 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-selective microelectrodes: theory and technique. *Fed Proc*. 1980;39:2851-59.

Aronson PS, Giebisch G. Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1997 Aug;273(2):F179-F192.

Aronson PS, Nee J, Suhm MA. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature*. 1982;299:161-3.

Aronson PS. Mechanisms of active H⁺ secretion in the proximal tubule. *Am J Physiol*. 1983;245:F647-F659.

Bailey MA, Giebisch G, Abbiati T, Aronson PS, Gawenis LR, Shull GE, Wang T. NHE2-mediated bicarbonate reabsorption in the distal tubule of NHE3 null mice. *J Physiol*. 2004;15;561; (Pt 3):765-75.

Baum M. Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. *J Clin Invest*. 1987;79:1104-9.

Bernardo AA, Kear FT, Santos AV, Ma J, Steplock D, Robey RB, *et al*. Basolateral Na⁽⁺⁾/HCO₃⁽⁻⁾ cotransport activity is regulated by the dissociable Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(2):195-201.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bevensee MO, Alper SL, Aronson P, Boron WF. Control of intracellular pH. In: Seldin DW, Giebisch G, editors. *The Kidney - Physiology and Pathophysiology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott; Williams & Wilkins; 2000. p. 391-442.

Bichara M, Paillard M, Leviel F, Prigent A, Gardin JP. Na:H exchange and the primary H pump in the proximal tubule. *Am J Physiol*. 1983 Feb;244(2):F165-F171.

Bie P, Wamberg S, Kjolby M. Volume natriuresis vs. pressure natriuresis. *Acta Physiol Scand*. 2004 Aug;181(4):495-503.

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 Fluid Electrolyte Physiol*. 1993;265:F736-F742.

Bobulescu IA, Moe OW. Luminal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange in the proximal tubule. *Pflugers Arch*. 2009 May;458(1):5-21.

Boron WF. Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Ann Rev Physiol*. 1986;48:377-88.

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2003.

Boyarsky G, Ganz MB, Sterzel RB, Boron WF. pH regulation in single glomerular mesangial cells I Acid extrusion in absence and presence of HCO₃⁻. *Am J Physiol*. 1988;255:C844-C856.

Brant SR, Yun CH, Donowitz M, Tse CM. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/N⁺ exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol*. 1995 Jul;269(1 Pt 1):C198-C206.

Breton S, Brown D. New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jan 1;292(1):F1-10.

Brett CL, Donowitz M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Feb;288(2):C223-C239.

Brown D, Sabolic I, Gluck S. Colchicine-induced redistribution of proton pumps in kidney epithelial cells. *Kidney Int*. 1991;40 Suppl(33):S79-S83.

Brown JC, Otte SC. GIP and the entero-insular axis. *Clin Endocrinol Metab*. 1979;8:365-77.

Buerkert J, Martin D, Trigg D. Segmental analysis of the renal tubule in buffer production and net acid formation. *Am J Physiol*. 1983 Apr;244(4):F442-F454.

Cabado AG, Yu FH, Kapus A, Lukacs G, Grinstein S, Orlowski J. Distinct structural domains confer cAMP sensitivity and ATP dependence to the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 isoform. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3590-9.

Capasso G, Malnic G, Wang T, Giebisch G. Acidification in mammalian cortical distal tubule. *Kidney Int*. 1994;45(6):1543-54.

Capasso G, Saviano C, Rizzo M, Pica A, Capodicasa D, Mascolo N, *et al*. Update on renal acidification: A physiological view. *Miner Electrolyte Metab*. 1997 May;23(3-6):243-8.

Carey RM, Smith JR, Ortt EM. Gastrointestinal control of sodium excretion in sodium-depleted rabbits. *Am J Physiol*. 1976;230:1504.

Carey RM. Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man, lack of dependence upon aldosterone. *Circ Res*. 1978;43:19-23.

Carpick BW, Gariepy J. Structural characterization of functionally important regions of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1b. *Biochemistry*. 1991;30:4803-09.

Carpick BW, Gariepy J. The *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is a long-lived superagonist of guanylin. *Infect Immun*. 1993;61:4710-15.

Carraro-Lacroix LR, Lessa LM, Fernandez R, Malnic G. Physiological implications of the regulation of vacuolar H⁺-ATPase by chloride ions. *Braz J Med Biol Res*. 2009 Feb;42(2):155-63.

Carraro-Lacroix LR, Ramirez MA, Zorn TM, Rebouças NA, Malnic G. Increased NHE1 expression is associated with serum deprivation-induced differentiation in immortalized rat proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291(1):F129-39.

Carrithers SL, Hill MJ, Johnson BR, O'hara SM, Jackson BA, Ott CE, Lorenz J, Mann EA, Giannella RA, Forte LR, Greenberg RN. Renal effects of uroguanylin and guanylin *in vivo*. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:1337-44.

Carrithers SI, Ott CE, Hill MJ, Johnson BR, Cai W, Chang JJ, Shah RG, Sun C, Mann EA, Fonteles MC, Forte LR, Jackson BA, Giannella RA, Greenberg RN. Guanylin and uroguanylin induce natriuretics in mice lacking guanylyl cyclase-C. *Kidney Int*. 2004;65:40-53.

Carrithers SI, Taylor B, Cai WY, Johnson BR, Ott CE, Greenberg RN, Jackson BA. Guanylyl cyclase-C receptor mRNA distribution along the rat nephron. *Regul Pept*. 2000;24;95(1-3):65-74.

Cha B., Kim JH, Hut H, Hogema BM, Nadarja J, Zizak M, Cavet M, Lee-Kwon W, Lohmann SM, Smolenski A, Tse CM, Yun C, De Jonge HR, Donowitz M. cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter

NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein. *J Biol Chem.* 2005;280:16642-50.

Chai W, Danser AH. Is angiotensin II made inside or outside of the cell. *Curr Hypertens Rep.* 2005; 7:124-7.

Chaillet JR, Boron WF. Intracellular calibration of a pH-sensitive dye in isolated, perfused salamander proximal tubules. *J Gen Physiol.* 1985;86:765-94.

Chambrey R, Warnock DG, Podevin RA, Bruneval P, Mandet C, Bélair MF, *et al.* Immunolocalization of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998;275(3):F379-F386.

Chan YL, Giebisch G. Relationship between sodium and bicarbonate transport in the rat proximal convoluted tubule. *Am J Physiol.* 1981;240:F222-F230.

Chantrelle BM, Cogan MG, Rector FC, Jr. Active and passive components of NaCl absorption in the proximal convoluted tubule of the rat kidney. *Miner Electrolyte Metab.* 1985;11(4):209-14.

Chao AC, De Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl-channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 1994;13(5):1065-72.

Chen LK, Boron WF. Acid extrusion in S3 segment of rabbit proximal tubule. I. Effect of bilateral CO₂/HCO₃⁻. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1995;268:F179-F192.

Chen LK, Boron WF. Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Kidney Int.* 1991;40 Suppl. 33:S11-S17.

Chow CW, Khurana S, Woodside M, Grinstein S, Orlowski J. The Epithelial Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ Exchanger, NHE3, Is Internalized through a Clathrin-mediated Pathway. *J Biol Chem.* 1999 Dec 31;274(53):37551-8.

Cogan MG. Atrial natriuretic peptide. *Kidney Int.* 1990;37:1148.

Comrie MM, Cutler CP, Cramb G. Cloning and Expression of Guanylin from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(5):1078-85.

Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE. Guanylin, an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:947-51.

De Sauvage FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W, Goeddel DV. Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;1;89(19):9089-93.

De Wardener HE, Mills IH, Clapham WF, Hayter CJ. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. *Clin Sci*. 1961;21:249-58.

Donowitz M, Li X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev*. 2007;87:825-72.

Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int*. 1999;55(1):29-62.

D'Souza S, Garcia-Cabado A, Yu F, Teter K, Lukacs G, Skorecki K, *et al*. The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na⁺/H⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):2035-43.

Du Z, Ferguson D, Wang T. Role of PKC and calcium in modulation of effects of angiotensin II on sodium transport in proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284:688-692.

DuBose TD Jr, Codina J. H,K-ATPase. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1996 Sep;5(5):411-6.

DuBose TD, Pucacco LR, Lucci MS, Carter NW. Micropuncture determination of pH, pCO₂ and total CO₂ concentration in accessible structures of the rat renal cortex. *J Clin Invest*. 1979;64:476-82.

Elitsur N, Lorenz JN, Hawkins JA, Rudolph JA, Witte D, Yang LE, McDonough AA, Cohen MB. The proximal convoluted tubule is a target for the uroguanylin-regulated natriuretic response. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;43 Suppl 1:S74-81.

Fan X, Hamra FK, Freeman RH, Eber SL, Krause WJ, Lim RW, Pace VM, Currie MG, Forte LR. Uroguanylin: cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and preuroguanylin from plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;219:457-62.

Fan X, Wang Y, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Forte LR. Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology*. 1997;138:4636-48.

Fawcus K, Gorton VJ, Lucas ML, Mcewan GT. Stimulation of three distinct guanylate cyclases induces mucosal surface alkalinisation in rat small intestine *in vitro*. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1997;118(2):291-5.

Fernandez R, Bosqueiro JR, Cassola AC, Malnic G. Role of Cl⁻ in electrogenic H⁺ secretion by cortical distal tubule. *J Membr Biol*. 1997;15;157(2):193-201.

Fernandez R, Lopes MJ, Lira RF, Dantas WF, G Cragoe Jr, EJ, Malnic G. Mechanism of acidification along cortical distal tubule of the rat. *Am J Physiol.* 1994;266:F218-F226.

Fernandez R, Malnic G. H⁺ ATPase and Cl⁻ interaction in regulation of MDCK cell pH. *J Membr Biol.* 1998;163:137-145.

Fernandez R, Oliveira-Souza M, Malnic G. Na⁺-independent proton secretion in MDCK-C11 cells. *Pflugers Arch.* 2000 Dec;441(2-3):287-93.

Few JD, Unwin RJ, Carmichael DJ, James VH. Diurnal fluctuation in saliva aldosterone concentration. *J Steroid Biochem.* 1987 Feb;26(2):265-71.

Fonteles MC, Greenberg RN, Monteiro HAS, Currie MG, Forte LR. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol.* 1998;275:F191-7.

Fonteles MC, Havt A, Prata RB, Prata PH, Monteiro HS, Lima AA, *et al.* High-salt intake primes the rat kidney to respond to a subthreshold uroguanylin dose during *ex vivo* renal perfusion. *Regul Pept.* 2009 Jul 23.

Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Nov;8(11):917-29.

Forte LR JR. Uroguanylin and guanylin peptides, pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2004;104(2):137-62.

Forte LR, Fan X, Hamra FK. Salt and water homeostasis: uroguanylin is a circulating peptide hormone with natriuretic activity. *Am J Kidney Dis.* 1996 Aug;28(2):296-304.

Forte LR, Krause WJ, Freeman RH. Receptors and cGMP signalling mechanism for *E. coli* enterotoxin in opossum kidney. *Am J Physiol.* 1988 Nov;255(5 Pt 2):F1040-F1046.

Fukae H, Kinoshita H, Fujimoto S, Kita T, Nakazato M, Eto T. Changes in urinary levels and renal expression of uroguanylin on low or high salt diets in rats. *Nephron.* 2002;92:373-78.

Garbers DL, Dubois SK. The molecular basis of hypertension. *Annu.Rev.Biochem.* 1999;68:127-55.

Gekle M, Wuensch S, Oberleithner H, Silbernagl S. Characterization of two MDCK cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch* 1994;428:157-62.

Gennari FJ, Maddox DA. Renal Regulation of acid-base homeostasis: integrated response. In: Seldin DW, Giebisch G, editors. *The Kidney. Physiology and Pathophysiology.* 3 ed. Philadelphia: Lippincott; Williams & Wilkins; 2000. p. 391-442.

Girardi AC, Knauf F, Demuth HU, Aronson PS. Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Nov;287(5):C1238-C1245.

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

Goyal S V-HGaAPS. Renal expression of novel Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE8. *Am J Physiol*. 284, F467-F473. 2003.

Grassl SM, Holohan PD, Ross CR. HCO₃⁻ transport in basolateral membrane vesicles isolated from rat renal cortex. *J Biol Chem*. 1987;262:2682-7.

Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra, F.K.; Forte, L.R.: Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and Escherichia coli heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investigat Med*. 1997;45:276-83.

Haggerty JG, Agarwal N, Cragoe EJ, Jr Adelberg EA, Slayman CW. LLC-PK1 mutant with increased Na⁺-H⁺ exchange and decreased sensitivity to amiloride. *Am J Physiol*. 1988;255:C495-C501.

Haggerty JG, Agarwal N, Cragoe EJ Jr, Adelberg EA, Slayman CW. LLC-PK1 mutant with increased Na⁺-H⁺ exchange and decreased sensitivity to amiloride. *Am J Physiol*. 1988 Oct;255(4 Pt 1):C495-C501.

Hall JE. The renin-angiotensin system. *Compr Ther*. 1991;17:8.

Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG, Forte LR. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2705-10.

Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG, Forte LR. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2705-2710.

Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, Chin DT, Tompkins JA, Fok KF, Smith CE, Duffin KL, Siegel NR, Currie MG. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:10464-10468.

Hamra FK, Krause WJ, Eber SL, Freeman RH, Smith CE, Currie MG, Forte LR. Opossum colonic mucosa contains uroguanylin and guanylin peptides. *Am J Physiol*. 1996;270:G708-G716.

Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev*. 2005;85(1):319-71.

Hess R, Kuhn M, Schulz-Knappe P, Raida M, Fuchs M, Klodt K, Adermann K, Kaefer V, Cetin Y, Forssmann WG. GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* 1995;374:34-38.

Hughes JM, Murad F, Chang B, Guerrant RL. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature.* 1978;23:271(5647):755-6.

Jin H, Li B, Cunningham B, Tom J, Yang R, Sehl P, Thomas GR, Ko A, Oare D, Lowe DG. Novel analog of atrial natriuretic peptide selective for receptor-A produces increased diuresis and natriuresis in rats. *J Clin Invest.* 1996;98:969-76.

Kane PM, Parra KJ. Assembly and regulation of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Exp Biol.* 2000;203:81-87.

Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Interacting helical surfaces of the transmembrane segments of subunits a and c' of the yeast V-ATPase defined by disulfide-mediated cross-linking. *J Biol Chem.* 2003;278:41908-41913.

Kikuchi M, Fujimoto S, Fukae H, Kinoshita H, Kita T, Nakazato M, Eto T. Role of uroguanylin, a Peptide with natriuretic activity, in rats with experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:392-97.

Kinoshita H, Fujimoto S, Fukae H, Yokota N, Hisanaga S, Nakazato M, Eto T. Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron.* 1999;81(2):160-4.

Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Yokota N, Date Y, Yamaguchi H, Hisanaga S, Eto T. Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases. *Kidney Int.* 1997a;52:1028-34.

Kinoshita H, Nakazato M, Yamaguchi H, Matsukura S, Fujimoto S, Eto T. Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal function. *Clin Nephrol.* 1997b;47:28-32.

Kita T, Kitamura K, Sakata J, Eto T. Marked increase of guanylin secretion in response to salt loading in the rat small intestine. *Am J Physiol.* 1999;277:G960-G966.

Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, Kachur JF, Hamra FK, Pidhorodeckyj NV, Forte LR. Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am J Physiol.* 1994;266:F342-F348.

Krause DC, Kleven SH, Lee KK. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Mycoplasma gallisepticum* antigens recognized by sera from infected chickens. *Avian Dis.* 1990;34(2):466-72.

Krause WJ, Cullingford GL, Freeman RH, Eber SL, Richardson KC, Fok KF, Currie MG, Forte LR. Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. *J Anat.* 1994;184 (Pt 2):407-17.

Krause WJ, Freeman RH, Eber SL, Hamra FK, Fok KF, Currie MG, Forte LR. Distribution of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin / guanylin / uroguanylin receptors in the avian intestinal tract. *Acta Anat (Basel).* 1995;153(3):210-9.

Krause WJ, London RM, Freeman RH, Forte LR. The guanylin and uroguanylin peptide hormones and their receptors. *Acta Anat (Basel).* 1997;160(4):213-31.

Krug AW, Papavassiliou F, Hopfer U, Ullrich KJ, Gekle M. Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. *Pflugers Arch.* 2003;446(4):492-6.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.

Lee BS, Underhill DM, Crane MK, Gluck SL. Transcriptional regulation of the vacuolar H(+)-ATPase B2 subunit gene in differentiating THP-1 cells. *J Biol Chem.* 1995;270:7320-29.

Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻. *J Biol Chem.* 1999 May 21;274(21):14670-7.

Lee SH, Kim T, Park ES, Yang S, Jeong D, Choi Y, et al. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 2;369(2):320-6.

Lennane RJ, Peart WS, Carey RM, Shaw J. A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med.* 1975;49:433-36.

Lessa LM, Amorim JB, Fonteles MC, Malnic G. Effect of renoguanylin on hydrogen/bicarbonate ion transport in rat renal tubules. *Regul Pept* 2009 Jun 18.

Lima AA, Monteiro HS, Fonteles MC. The effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol Toxicol.* 1992;70(3):163-7.

London RM, Eber SL, Visweswariah SS, Krause WJ, Forte LR. Structure and activity of OK-GC, a kidney receptor guanylate cyclase activated by guanylin peptides. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 2):F882-91.

Lorenz JN, Nieman M, Sabo J, Sanford LP, Hawkins JA, Elitsur N, Gawenis LR, Clarke LL, Cohen MB. Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. *J Clin Invest.* 2003;112(8):1244-54.

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

Malnic G, Silva Netto CR, Stamopoulos CD, Mello Aires M. On line measurement of fluid reabsorption in renal tubules. *Med Biol Eng Comput.* 1979;17:330-32.

Malnic G. Cell Biology of H⁺ Transport in Epithelia. *ARBS Ann Rev Biomed Sci.* 2000;2:5-37.

Malnic G. CO₂ equilibria in renal tissue. *Am J Physiol.* 1980;239:F307-F318.

Malnic G. Role of the kidney in controlling acid-base balance. *Child Nephrol Urol.* 1988;9(5):241-52.

Mello Aires M, Lopes MJ, Malnic G. PCO₂ in renal cortex. *Am J Physiol.* 1990;259:F357-F365.

Mello Aires M, Malnic G. Sodium in renal tubular acidification kinetics. *Am J Physiol.* 1979;236:F434-F441.

Melo LG, Ackerman U. ANP in regulation of arterial pressure and fluid-electrolyte balance, lessons from genetic mouse models. *Physiol Genomics.* 2000;3:45.

Mills JN. Human circadian rhythms. *Physiol Rev.* 1966 Jan;46(1):128-71.

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 Nov;10(11):2412-25.

Morel F, Doucet A. Hormonal control of kidney function at the cell level. *Physiol Rev.* 1986;66:377-68.

Moss NG, Fellner RC, Qian X, Yu SJ, Li Z, Nakazato M, et al. Uroguanylin, an intestinal natriuretic peptide, is delivered to the kidney as an unprocessed propeptide. *Endocrinology.* 2008 Sep;149(9):4486-98.

Moss NG, Fellner RC, Qian X, Yu SJ, Li Z, Nakazato M, Goy MF. Uroguanylin, an intestinal natriuretic peptide, is delivered to the kidney as an unprocessed propeptide. *Endocrinology.* 2008;149:4486-98.

Moss S, Gordon D, Forsling ML, Peart WS, James VH, Roddis SA. Water and electrolyte composition of urine and ileal fluid and its relationship to renin and

aldosterone during dietary sodium deprivation in patients with ileostomies. *Clin Sci (Lond)*. 1981 Oct;61(4):407-15.

Nakazato M, Yamaguchi H, Date Y, Miyazato M, Kangawa K, Goy MF, Chino N, Matsukura S. Tissue distribution, cellular source, and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin. *Endocrinology*. 1998;139:5247-54.

Nakazato M. Guanylin family: new intestinal peptides regulating electrolyte and water homeostasis. *J Gastroenterol*. 2001 Apr;36(4):219-25.

Nakhoul NL, Chen LK, Boron WF. Intracellular pH regulation in rabbit S3 proximal tubule: basolateral Cl-HCO₃ exchange and Na-HCO₃ cotransport. *Am J Physiol*. 1990;258:F371-F381.

Nelson N, Harvey WR. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev*. 1999 Apr;79(2):361-85.

Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:7275-9.

Numata M, Orłowski J. Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):17387-94.

Numata M, Petrecca K, Lake N, Orłowski J. Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem*. 1998 Mar 20;273(12):6951-9.

Orłowski J, Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem*. 1997 Sep 5;272(36):22373-6.

Ott C, Jackson B, Carvalho A, Greenberg R, Carrithers S. Regulation of intestinal uroguanylin (UGN) expression by dietary salt intake (abstract). *FASEB J*. 2000;14:A657.

Pech V, Zheng W, Pham TD, Verlander JW, Wall SM. Angiotensin II activates H⁺-ATPase in type A intercalated cells. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Jan;19(1):84-91.

Perkins A, Goy MF, Li Z. Uroguanylin is expressed by enterochromaffin cells in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1997 Sep;113(3):1007-14.

Petrovic S, Barone S, Weinstein AM, Soleimani M. Activation of the apical Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by formate, a basis of enhanced fluid and electrolyte reabsorption by formate in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(2):F336-46.

Pizzonia JH, Biemesderfer D, Abu-Alfa AK, Wu MS, Exner M, Isenring P, et al. Immunochemical characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1998;275(4):F510-F517.

Potthast R, Ehler E, Scheving LA, Sindic A, Schlatter E, Kuhn M. High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology*. 2001;142(7):3087-97.

Preisig PA, Rector FC. Role of Na⁺-H⁺ antiport in rat proximal tubule NaCl absorption. *Am J Physiol*. 1988;255:F461-F465.

Qian X, Moss NG, Fellner RC, Goy MF. Circulating prouroguanylin is processed to its active natriuretic form exclusively within the renal tubules. *Endocrinology*. 2008 Sep;149(9):4499-509.

Ramirez MA, Toriano R, Parisi M, Malnic G. Control of cell pH in the T84 colon cell line [In Process Citation]. *J Membr Biol*. 2000;177:149-57.

Reboucas NA, Malnic G. Regulation of rat proximal tubule Na/H exchange by protein kinase C. *Kidney Blood Press Res*. 1996;19(2):87-93.

Rector FC. Sodium, bicarbonate and chloride absorption by the proximal tubule. *Am J Physiol*. 1983;244:F461-F471.

Rothemberger F, Velic A, Stehberger PA, Kovacicova J, Wagner CA. Angiotensin II stimulates vacuolar H⁺-ATPase activity in renal acid-secretory intercalated cells from the outer medullary collecting duct. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jul;18(7):2085-93. Epub 2007 Jun 7.

Santos-Neto MS, Carrithers SL, Carvalho AF, Monteiro HS, Greenberg RN, Forte LR, et al. Guanylin and its lysine-containing analogue in the isolated perfused rat kidney: interaction with chymotrypsin inhibitor. *Pharmacol Toxicol*. 2003 Mar;92(3):114-20.

Sardet C, Franchi A, Pouysségur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell*. 1989;56:271-80.

Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1998;274(2):R263-R279.

Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, et al. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*. 1998;19(3):282-5.

Schulz S, Green CK, Yuen PST, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell*. 1990;63:941-948.

Schulz S, Lopez MJ, Kuhn M, Garbers DL. Disruption of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J Clin Invest*. 1997 Sep 15;100(6):1590-5.

Schulz S. Targeted gene disruption in the development of mouse models to elucidate the role of receptor guanylyl cyclase signaling pathways in physiological function. *Methods*. 1999 Dec;19(4):551-8.

Schwartz GJ. Na⁺-dependent H⁺ efflux from proximal tubule: evidence for reversible Na⁺-H⁺ exchange. *Am J Physiol*. 1981;241:F380-F385.

Sei CA, Hand GL, Murray SF, Glembotski CC. The cosecretional maturation of atrial natriuretic factor by primary atrial myocytes. *Mol Endocrinol*. 1992 Mar;6(3):309-19.

Seidler U, Blumenstein I, Kretz A, Viellard-Baron D, Rossmann H, Colledge WH, et al. A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca²⁺-dependent. *J Physiol*. 1997 Dec 1;505 (Pt 2):411-23.

Shean GM, Sollner K. Carrier mechanisms in the movement of ions across porous and liquid ion exchanger membranes. *Ann NY Acad Sci*. 1966;137:759-776.

Shugrue CA, Obermuller N, Bachmann S, Slayman CW, Reilly RF. Molecular cloning of NHE3 from LLC-PK1 cells and localization in pig kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Aug;10(8):1649-57.

Sindic A, Basoglu C, Cerci A, Hirsch JR, Potthast R, Kuhn M, Ghanekar Y, Visweswariah SS, Schlatter E. Guanylin, uroguanylin, and heat-stable euterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells. *J Biol Chem*. 2002;17;277(20):17758-64.

Sindic A, Velic A, Basoglu C, Hirsch JR, Edemir B, Kuhn M, Schlatter E. Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. *Kidney Int*. 2005;68(3):1008-17.

Skott O. Body sodium and volume homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Jul;285(1):R14-R18.

Steinbrecher KA, Wowk SA, Rudolph JA, Witte DP, Cohen MB. Targeted inactivation of the mouse guanylin gene results in altered dynamics of colonic epithelial proliferation. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):2169-78.

Steinbrecher KA, Wowk SA, Rudolph JA, Witte DP, Cohen MB. Targeted inactivation of the mouse guanylin gene results in altered dynamics of colonic epithelial proliferation. *Am J Pathol*. 2002;161:2169-78.

Strauss MB, Lamdin E, Smith WP, Bleifer DJ. Surfeit and deficit of sodium; a kinetic concept of sodium excretion. *AMA Arch Intern Med*. 1958 Oct;102(4):527-36.

Sutters M, Wakefield C, O'Neil K, Appleyard M, Frankel H, Mathias CJ, et al. The cardiovascular, endocrine and renal response of tetraplegic and paraplegic subjects to dietary sodium restriction. *J Physiol*. 1992 Nov;457:515-23.

Suwastika IN, Gehring CA. The plasma membrane H⁺-ATPase from *Tradescantia* stem and leaf tissue is modulated in vitro by cGMP. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Jul 1;367(1):137-9.

Thomas J, Buchsbaum R, Zimniak A, Racker E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry*. 1979;18:2210-2218.

Tien XY, Brasitus TA, Kaetzel MA, Dedman JR, Nelson DJ. Activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by cGMP in the human colonic cancer cell line, Caco-2. *J Biol Chem*. 1994;7;269(1):51-4.

Tojo A, Guzman NJ, Garg LC, Tisher CC, Madsen KM. Nitric oxide inhibits bafilomycin-sensitive H⁺-ATPase activity in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal, Fluid Electrolyte Physiol*. 1994;267:F509-F515.

Ulate G, Fernandez R, Malnic G. Effect of bafilomycin on proximal bicarbonate absorption in the rat. *Brazilian J Med Biol Res*. 1993;26:773-7.

Unwin RJ, Moss S, Peart WS, Wadsworth J. Renal adaptation and gut hormone release during sodium restriction in ileostomized man. *Clin Sci (Lond)*. 1985 Sep;69(3):299-308.

Vaandrager AB, Bot AG, De Jonge HR. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology*. 1997;112(2):437-43.

Vaandrager AB, Bot AG, Ruth P, Pfeifer A, Hofmann F, De Jonge HR. Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology*. 2000;118(1):108-14.

Vestri S, Malnic G. Mechanism of potassium transport across proximal tubule epithelium in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 1990;23:1195-1199.

Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP. Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1263-314.

Wagner CA, Devuyst O, Bourgeois S, Mohebbi N. Regulated acid-base transport in the collecting duct. *Pflugers Arch*. 2009 May;458(1):137-56.

Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, Pouysségur J. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing". *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:2424-8.

Wakabayashi S, Hisamitsu T, Pang T, Shigekawa M. Kinetic dissection of two distinct proton binding sites in Na⁺/H⁺ exchangers by measurement of reverse mode reaction. *J Biol Chem*. 2003 Oct 31;278(44):43580-5.

Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev.* 1997;77(1):51-74.

Wang T, Hropot M, Aronson Ps, Giebisch G. Role of NHE isoforms in mediating bicarbonate reabsorption along the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281(6):F1117-22.

Wang T, Yang Cl, Abbiati T, Schultheis PJ, Shull GE, Giebisch G, Aronson PS. Mechanism of proximal tubule bicarbonate absorption in NHE3 null mice. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 2):F298-302.

Weinberger MH. Is salt restriction relevant and feasible as adjunctive treatment of hypertension? *Drugs.* 1990 Jun;39(6):809-13.

Weiner ID, Frank AE, Wingo CS. Apical proton secretion by the inner stripe of the outer medullary collecting duct. *Am J Physiol.* 1999;276(4 Pt 2):F606-13.

Weintraub WH, Machen TE. pH regulation in hepatoma cells: roles for Na-H exchange, Cl-HCO₃ exchange, and Na-HCO₃ cotransport. *Am J Physiol.* 1989;257:G317-G327.

Wilkens S, Vasilyeva E, Forgac M. Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):31804-10.

Wingo CS, Cain BD. The renal H-K-ATPase: Physiological significance and role in potassium homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:323-47.

Wingo CS, Smolka AJ. Function and structure of H-K-ATPase in the kidney. *Am J Physiol Renal, Fluid Electrolyte Physiol.* 1995;269:F1-F16.

Winter C, Schulz N, Giebisch G, Geibel JP, Wagner CA. Nongenomic stimulation of vacuolar H⁺-ATPases in intercalated renal tubule cells by aldosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 24;101(8):2636-41.

Wright FS, McDougal. Potassium-Specific Ion-Exchanger Microelectrodes to Measure K⁺ Activity in the Renal Distal Tubule. *Yale J Biol Med.* 1972;45:373-383

Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 18;97(15):8525-9.

Yang LE, Maunsbach AB, Leong PK, McDonough AA. Differential traffic of proximal tubule Na⁺ transporters during hypertension or PTH: NHE3 to base of microvilli vs. NaPi2 to endosomes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Nov;287(5):F896-F906.

Yang LE, Sandberg MB, Can AD, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA. Effects of dietary salt on renal Na⁺ transporter subcellular distribution,

abundance, and phosphorylation status. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 Oct;295(4):F1003-F1016.

Yip JW, Ko WH, Viberti G, Haganir RL, Donowitz M, Tse CM. Regulation of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 stably expressed in fibroblasts by fibroblast growth factor and phorbol esters is not through changes in phosphorylation of the exchanger. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18;272(29):18473-80.

Yuge S, Inoue K, Hyodo S, Takei Y. A novel guanylin family (guanylin, uroguanylin, and renoguanylin) in eels: possible osmoregulatory hormones in intestine and kidney. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22726-33.

Zaccolo M, Movsesian MA. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res*. 2007 Jun 8;100(11):1569-78.

Zachos NC, Tse M, Donowitz M. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:411-43.

Zhao H, Wiederkehr MR, Fan L, Collazo RL, Crowder LA, Moe OW. Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP. Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *J Biol Chem*. 1999 Feb 12;274(7):3978-87.

Zimolo Z, Montrose MH, Murer H. H⁺ extrusion by an apical vacuolar-type H⁺-ATPase in rat renal proximal tubules. *J Membr Biol*. 1992;126:19-26.