PEDRO HENRIQUE IMENEZ SILVA

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS DA ACIDOSE
METABÓLICA E RESPIRATÓRIA SOBRE A ISOFORMA 3
DO TROCADOR SÓDIO HIDROGÊNIO (NHE3)**

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

São Paulo
2014

PEDRO HENRIQUE IMENEZ SILVA

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS DA ACIDOSE
METABÓLICA E RESPIRATÓRIA SOBRE A ISOFORMA 3
DO TROCADOR SÓDIO HIDROGÊNIO (NHE3)**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Silva, Pedro Henrique Imenez.

Análise comparativa dos efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a isoforma 3 do trocador sódio hidrogênio (NHE3) / Pedro Henrique Imenez Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Estudo molecular e funcional de transportadores de íons em membranas.

Versão do título para o inglês: Comparative analysis of metabolic and respiratory acidosis effects on the sodium hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3).

1. Fisiologia renal 2. Nefro 3. Acidose 4. Transportador iônico 5. NHE3 6. Biologia molecular I. Rebouças, Profa. Dra. Nancy Amaral II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB062/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Pedro Henrique Imenez Silva.

Título da Tese: Análise comparativa dos efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a isoforma 3 do trocador sódio hidrogênio (NHE3).

Orientador(a): Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DECLARAÇÃO

DECLARO que, o(a)
Senhor(a) **PEDRO HENRIQUE IMENEZ SILVA**, defendeu o título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS**, Área de **FISIOLOGIA HUMANA** tendo sido *aprovado(a)* em prova pública da Defesa da Tese de Doutorado realizada no dia **16 de junho de 2014** e que oportunamente, será homologada pela Comissão de Pós-Graduação. O trabalho apresentado tem como título: **“Análise comparativa dos efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a isoforma 3 do trocador sódio hidrogênio (NHE3)”**. A Comissão Julgadora foi constituída pelos seguintes docentes: Profs. Drs. **Titular: ANTONIO CARLOS SEGURO, Titular: LUIZ FERNANDO ONUCHIC, Titular: TATIANA TEIXEIRA TORRES, Titular: FERNANDO RODRIGUES DE MORAES ABDULKADER e Orientador: NANCY AMARAL REBOUÇAS.**

São Paulo, 16 de junho de 2014

Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto
Presidente da CPG/ICB

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 535/12 referente ao projeto intitulado: "*Análise comparativa dos efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a isoforma 3 do trocador sódio hidrogênico (NHE3)*" sob a responsabilidade de **Pedro Henrique Imenez Silva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 24 de julho de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico esta tese aos meus pais, que além do abundante amor que sempre demonstraram ter por mim, continuamente tentaram me mostrar que a educação era um excelente caminho a ser seguido por aqueles que querem fazer algo a mais pelo mundo. E pela minha educação fizeram tudo o que podiam (e mais um pouco).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa Nancy Amaral Rebouças, não só pela sua ótima orientação e uma longa lista de ajudas burocráticas, como por servir de referência acadêmica. Foi alguém que eu pude admirar pela sua característica de privilegiar o conhecimento acima de tudo na ciência.

Ao Dr. Pascal Falter-Braun (Technische Universität München) por ter me acolhido tão bem em seu laboratório na Alemanha, durante o meu doutorado sanduíche, e por me ensinar tanto em tão pouco tempo.

Devo também agradecimentos aqueles que contribuíram diretamente com análises ou experimentos apresentados nesta tese. Elida Neri pela ajuda nos experimentos de transfecção e notícias “acadêmicas” sempre em primeira mão. Douglas Cancherini pelas análises de bioinformática e ajuda na interpretação destes dados. Adriana Girardi pelas valiosas discussões dos dados desta tese. Prof. Antonio Carlos Cassola pela ajuda com os experimentos de microscopia de fluorescência. Prof. Paulo Inácio Prado e, meu caro amigo, Gustavo “Ari” Ferreira pela ajuda com estatística de verossimilhança e ensinamentos sobre R. “Diogro” Melo, pela ajuda com as “exatas” e revisão dos códigos do R; pelas colaborações científicas em biologia sistêmica e pela nossa amizade que já é maior de idade.

Outros tiveram grandes contribuições indiretas à minha tese. Camila Bezerra pelo apoio técnico durante todo o meu doutorado e por todas as ótimas dicas que me deu tanto sobre experimentos como sobre outros aspectos da vida acadêmica e não acadêmica. Gabriella Queiroz-Leite pelas diversas discussões de resultados e apoio para que sempre realizássemos as reuniões da fisiologia renal e do laboratório 222. Juliano “Xu” Polidoro pela disposição em discutir semanalmente dados e questões conflitantes da literatura relacionadas ao meu doutorado, por revigorar as reuniões científicas do nosso laboratório e por ser uma companhia nas muitas noites e fins de semana passados no 222. Thaissa Pessoa pelas discussões científicas quando ninguém queria falar de ciência e por confiar em mim como cientista. Edson Miranda pelo apoio técnico e pelos papos de futebol.

Outros não auxiliaram a minha tese, mas a minha vida de doutorando. Profa. Raif Musa Aziz pelos auxílios relacionados ao simpósio de Systems Biology na Inglaterra em 2013. Rena Orofino por me indicar para o cursinho da USP quando a minha bolsa de doutorado acabou. Membros da Comissão Coordenadora do Programa de Fisiologia Humana que me ajudaram para que eu chegasse até o fim do doutorado e especialmente aos secretários

José Maria e Paloma por prontamente me ajudarem com tantas burocracias e por não deixarem nada sair errado. Também agradeço ao professores e alunos dos outros laboratórios da fisiologia renal que tanto me ajudaram com favores, empréstimo de material, café e boas risadas.

Ao “pequeno grupo de biologia sistêmica”: Além do Ogro, Guilherme “Pato” Garcia e Pedro “Melão” Mendonça agradeço imensamente por manterem minha vontade em alta de sempre fazer e discutir ciência de modo sincero e livre. O impacto destas discussões sobre minha formação e tese foi formidável.

Trabalhar com algo que eu gosto e com pessoas que tornam o ambiente agradável com certeza ajudou a manter a sanidade mental durante o doutorado. Agradeço aos integrantes e ex-integrantes do laboratório 222 pela ótima convivência: Camila, Elida, Gabi, Xu, Mariana, Mara, Vera, Léo, Douglas, Dri, Carlos, Pri Yanai e Nancy. Isto foi fundamental para que a minha vida no ICB tenha sido de muito mais felicidades do que tristezas.

Devo agradecimentos às três entidades de fomento que participaram diretamente do financiamento da minha pesquisa e da minha vida acadêmica: CNPq pela minha bolsa de doutorado, Capes pela minha bolsa de doutorado sanduíche e Fapesp pelas verbas de laboratório e cobertura de despesas em congressos.

Existe um grupo grande de pessoas que cuidam de mim há muito tempo e são importantes demais na minha vida para que eu não as mencionasse. As duas principais pessoas são os meus pais, Pedro Ivo e Salete, que não estiveram comigo no laboratório durante estes anos de doutoramento, mas são a quem mais devo por ter chegado até aqui.

Aos meus grandes amigos de colégio e faculdade, que além de me fazerem bem puderam contribuir com a minha formação intelectual. Tenho sorte de ter muito amigos e aqui não cabe listar todos, mas fica a menção a todo um grupo muito importante em minha vida.

Por fim, agradeço e muito à minha amada Michele “Cacá” Quesada da Silva que esteve comigo pela maior parte do meu doutorado, me ensinando, apoiando, amando, corrigindo, animando, rindo e me enchendo de vontade de acordar para fazer mais um pouquinho de ciência.

"The opposite of a correct statement is a false statement. But the opposite of a profound truth may well be another profound truth."

Niels Hendrick David Bohr

"Van has delightfully reminisced about his days when he was working in Gomberg's laboratory. One day he needed a two-liter bottle that had once contained metallic sodium under anhydrous ether. Thinking the pieces of sodium in the bottom had long since reacted, he dumped them in the sink with running water. Flashes went off like cannon firecrackers, and when it stopped, Gomberg looked in through his door and said:

'Now, Van Slyke, you know what metallic sodium and water makes' Those were days when your professor was not at a distance."

Baird Hastings

RESUMO

Silva PHI. Análise comparativa dos efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a isoforma 3 do trocador sódio hidrogênio (NHE3) [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O parálogo 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) é essencial para a reabsorção de bicarbonato nos túbulos proximais renais e sua expressão e função devem se adaptar às diferentes condições ácido-base do organismo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se existem diferenças entre os efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a regulação do NHE3 e identificar as variáveis moleculares e físico-químicas responsáveis pelas respostas adaptativas observadas. Todos os experimentos foram realizados em células OKP (opossum kidney clone P). A acidose metabólica foi simulada diminuindo a concentração de bicarbonato do meio de cultura celular e a acidose respiratória aumentando a pressão parcial de CO_2 da câmara de incubação de células, ambas por 24 horas. Foi observado que a expressão da proteína NHE3 presente apenas na membrana celular aumentou tanto em resposta à acidose metabólica como à respiratória. A acidose metabólica branda (pH 7,08) e a acidose metabólica grave (6,92) causaram aumentos nos níveis de RNAm do *Nhe3*, porém tanto a acidose respiratória leve (7,12) como a grave (6,88) não aumentaram os níveis do RNAm do *Nhe3*. Os experimentos para avaliar a atividade da região promotora do *Nhe3* indicaram que a região correspondente às posições de -471 a -153 pares de bases (pb) em relação ao sítio de início de transcrição contém elementos regulatórios sensíveis à acidose metabólica. Nesta região foram identificados dois sítios consensuais para o fator de transcrição SP1 e um para ARNT, e além disso, demonstrou-se que em 6 horas de acidose metabólica houve aumento da expressão de SP1. Em resumo, esta tese concluiu que o pH extracelular não é a variável físico-química responsável por estimular a expressão do NHE3, contudo ele é um importante candidato à variável responsável por regular o tráfego da proteína para a membrana apical. Além disso, a região de -471 a -153 pb do promotor do gene *Nhe3* é uma região com prováveis reguladores positivos (*enhancers*) deste gene neste tipo de acidose e a proteína SP1 foi identificada como um importante candidato na sinalização da resposta das células dos túbulos proximais à acidose metabólica.

Palavras-chave: Ácido-base. Rim. Túbulo proximal. Transportador iônico. NHE3. Biologia molecular.

ABSTRACT

Silva PHI. Comparative analysis of metabolic and respiratory acidosis effects on the sodium hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3). [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) is essential for HCO₃⁻ reabsorption in renal proximal tubules and its expression and function must adapt to acid-base conditions. The goal of the present study was to evaluate whether there are differences between metabolic and respiratory acidosis with regard to NHE3 modulation and if so, to identify which are the relevant molecular and physical-chemical variables that may trigger these distinct adaptive responses. Metabolic acidosis was achieved by lowering HCO₃⁻ concentration in the cell culture medium and respiratory acidosis by increasing pCO₂ in the incubator chamber. Cell-surface NHE3 expression was increased in response to both metabolic and respiratory acidosis. Mild (pH 7.08) and severe (6.92) metabolic acidosis increased *Nhe3* mRNA levels, whilst mild (7.12) and severe (6.88) respiratory acidosis did not up-regulate its expression. Analysis of the *Nhe3* promoter region suggested that the regulatory elements sensitive to metabolic acidosis are located within the region spanning from -471 to -153 base pairs (bp) upstream from the transcriptional start site. Two SP1 and an ARNT consensus binding sites were localized within this region and severe metabolic acidosis caused an enhancement of the SP1 protein levels. In summary, it was concluded that low extracellular pH is not the parameter that up-regulates NHE3 expression, nevertheless extracellular pH is a candidate for the parameter related to NHE3 displacement to the apical membrane. Moreover, SP1 was identified as a potential transcription factor that mediates the response to metabolic acidosis in proximal tubule cells, and the -471/-153 bp region seems to possess positive regulatory elements (enhancers) responsive to metabolic acidosis within the promoter of the *Nhe3* gene.

Keywords: Acid-base. Kidney. Proximal tubule. Ionic transporter. NHE3. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do sistema urinário em diferentes níveis.....	26
Figura 2 – Reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal.....	29
Figura 3 – Formação de bicarbonato novo pelo nefro.....	31
Figura 4 – Sequência de alterações das variáveis ácido-base após estresse por acidose metabólica ou respiratória em um diagrama ácido-base (ou de Davenport-Van Slyke).....	34
Figura 5 – Efeitos de 24 h de acidose nos níveis proteicos de NHE3 presente na superfície celular.....	56
Figura 6 – Efeitos de 24 h de acidose na expressão do RNAm do <i>Nhe3</i>	57
Figura 7 – Curvas de decaimento do RNAm do <i>Nhe3</i> na acidose.....	60
Figura 8 – Efeitos da acidose metabólica sobre o promotor do gene do <i>Nhe3</i>	62
Figura 9 – Região do promotor sensível à acidose metabólica.....	64
Figura 10 – Efeitos da acidose metabólica sobre a região sensível à acidose metabólica do promotor do gene do <i>Nhe3</i> contendo mutações em três diferentes pontos.....	65
Figura 11 – Efeito da acidose metabólica sobre os níveis proteicos de SP1.....	66
Figura 12 – Resumo dos efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a regulação genômica do NHE3.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Transportadores responsáveis pela reabsorção ou secreção de bicarbonato em cada segmento do nefro.....	28
Tabela 2 – Causas da acidose respiratória.....	36
Tabela 3 – Detalhes utilizados para mutação das sequências da região promotora sensível à acidose metabólica.....	53
Tabela 4 – Variáveis ácido-base obtidas do meio de cultura celular ao final de 33 experimentos realizados em células OKP.....	54
Tabela 5 – Fatores de transcrição identificados em genes regulados pela acidose e seus respectivos p-valores.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -CG	- α -Cetoglutarato
ACII	- Anidrase carbônica 2
ACIV	- Anidrase carbônica 4
ActD	- Actinomicina-D
AE1	- Anion exchanger 1
AE2	- Anion exchanger 2
AHR	- Aryl Hydrocarbon Receptor
AP1	- Activator protein 1
AMPc	- Monofosfato cíclico de adenosina
ARNT	- AHR nuclear translocator
ATP	- Trifosfato de adenosina
BBMV	- Brush border membrane vesicles
bHLH-PAS	- Basic helix-loop-helix Per-ARNT-SIM
CaMKII	- Calmodulin Kinase II
cDNA	- DNA complementar
CF11	- Coagulation factor 11
CHP1	- Calcineurin homologous protein-1
CK2	- Casein kinase 2
DNA	- Ácido desoxirribunucleico
EGR1	- Early growth response 1
GC-D	- Guanilato ciclase-D
GLP1	- Peptídeo semelhante ao glucagon
GMPc	- Monofosfato cíclico de guanosina
GPR4	- G-protein coupled receptor 4
GTP	- Trifosfato de guanosina
IRBIT	- IP ₃ receptor binding protein released with IP ₃
IP ₃	- Inositol trifosfato
MAFG	- v-Maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog G
MBD2	- Methyl-CpG-binding domain protein 2
MCT	- Murine Cortical Tubule Cells
MIZF	- MBD2-interacting zinc finger
NBC1	- Sodium bicarbonate cotransporter 1/ Cotransportador sódio bicarbonato 1
NHE1	- Sodium hydrogen exchanger 1 / trocador sódio hidrogênio 1
NHE2	- Sodium hydrogen exchanger 2 / trocador sódio hidrogênio 2
NHE3	- Sodium hydrogen exchanger 3 / trocador sódio hidrogênio 3
NHE8	- Sodium hydrogen exchanger 8 / trocador sódio hidrogênio 8
NRF1	- NF-E2-related factor 1
OGR1	- Ovarian cancer G-protein coupled receptor 1
OKP	- Opossum kidney cells P
PAX5	- Paired box 5
pCO ₂	- Pressão parcial de gás carbônico
PKA	- Proteína cinase A
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
PYK2	- Proline-rich tyrosine kinase 2
RNA	- Ácido ribunucleico
RPTPy	- Receptor protein-tyrosine phosphatase gama
S3226	- 3-[2-(3-guanidino-2-methyl-3-oxopropenyl)-5-methyl-phenyl]-N-

SEF1	-	isopropylidene-2-methyl-acrylamide dihydrochloride
TDAG8		SL3-3 enhancer factor 1
		T-cell death associated gene 8

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Prólogo	17
1.2 O balanço ácido-base no contexto da vida	17
1.3 O Rim e o balanço ácido-base	22
1.4 O sistema urinário	24
1.5 O nefro no balanço ácido-base	26
1.5.1 Túbulo proximal e bicarbonato	27
1.6 As acidoses e o rim	32
1.7 O NHE3 no túbulo proximal	36
1.8 Acidoses e o NHE3	40
2 OBJETIVOS	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Lista de materiais	45
3.2 Cultura celular e ensaios de acidose metabólica e respiratória	45
3.3 Westernblotting e Imunoblotting	46
3.4 Biotinilação de proteínas de membrana celular	47
3.5 Extração de RNAm de células OKP e PCR em tempo real	48
3.6 Taxa de degradação do RNAm	49
3.7 Transfecção em células OKP	49
3.8 Busca por possíveis sítios para ligação de fatores de transcrição	50
3.9 Busca por possíveis sítios para ligação de fatores de transcrição no promotor do gene do <i>Nhe3</i>	51
3.10 Inserção de mutações no fragmento -471/+55	52
3.11 Estatística	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Ensaios de acidose em células OKP	54
4.2 Proteínas NHE3 presentes na superfície celular	54
4.3 RNAm na acidose metabólica branda e respiratória grave	56
4.4 Taxa de decaimento do RNAm do <i>Nhe3</i>	58
4.5 Efeitos da acidose metabólica sobre o promotor do gene do <i>Nhe3</i>	61
4.6 Busca por possíveis sítios para ligação de fatores de transcrição	62

4.7 Efeitos da acidose metabólica sobre fragmentos mutados da região sensível à acidose metabólica.....	63
4.8 Efeitos da acidose metabólica sobre a abundância dos fatores de transcrição.....	65
5 DISCUSSÃO.....	68
5.1 Acidose metabólica e respiratória causam diferentes efeitos sobre o <i>Nhe3</i>.....	68
5.2 Propriedades físico-químicas determinantes para o tráfego no NHE3.....	69
5.3 Variáveis físico-químicas determinantes para a expressão do NHE3.....	76
5.4 Níveis de RNAm do <i>Nhe3</i>.....	79
5.5 Identificação de fatores de transcrição por bioinformática.....	82
5.6 Identificação de fatores de transcrição na região sensível à acidose metabólica.....	85
6 CONCLUSÕES	89
6.1 Considerações finais.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE A – Cálculo da taxa de degradação do RNAm do <i>Nhe3</i>.....	101
APÊNDICE B – Quantificação da proteína-ARNT.....	108
APÊNDICE C – Atividades promotoras de Mut1, Mut2 e Mut3 normalizadas pelo fragmento não mutado.....	109
APÊNDICE D - Levantamento do número de sequências consenso para sítios para fatores de transcrição em <i>Homo sapiens</i>, <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Monodelphis domestica</i>.....	110
APÊNDICE E – Alinhamentos entre as sequências do promotor do gene do <i>Nhe3</i> de humano e de rato.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prólogo

O meu interesse em entender como ocorre a regulação genômica do parálogo 3 do trocador sódio hidrogênio (NHE3) pelas acidoses surgiu durante a iniciação científica. A minha orientadora, prof^a Nancy Amaral Rebouças, me apresentou um projeto que visava quantificar o RNAm, a proteína e a atividade do promotor do gene do *Nhe3* em condições de acidose metabólica e respiratória em modelo celular. O interesse geral sobre a regulação desse trocador pelo estímulo ácido se perpetuou pela minha graduação e se manteve até o período atual de doutoramento. Deste modo, certos experimentos realizados durante a pós-graduação são continuidade de alguns estudos do período da iniciação científica.

Nesta tese, pretendo apresentar apenas os dados obtidos ou analisados após o período de matrícula no programa de pós-graduação em Fisiologia Humana. Porém, não mencionar os resultados conjuntos de certos dados obtidos em experimentos realizados em ambos os períodos comprometeria o entendimento de certas partes deste trabalho. Pretendo deixar claro para o leitor a origem de cada dado. Além disso, este trabalho gerou uma publicação intitulada “Distinct mechanisms underlie adaptation of proximal tubule Na⁺/H⁺ exchanger 3 in response to chronic metabolic and respiratory acidosis”. Este trabalho não será citado neste documento, pois a tese e a publicação se sobrepõem em grande parte e não faria sentido que o artigo fosse citado a cada passo.

Como último ponto a ser citado, o leitor provavelmente irá notar que o termo “isoforma”, presente no título, não é utilizado nesta tese e em seu lugar foi utilizado o termo “parálogo”. “Isoforma” é um termo genérico, largamente utilizado para o NHE3, que é atribuído às diferentes formas da mesma proteína. Isto permite que ele seja utilizado tanto para proteínas de genes diferentes (i.e. parálogos), como para proteínas advindas de *splicing* alternativo. Como cada NHE é um gene distinto da mesma família gênica, e portanto, precisamente um parálogo, preferi evitar confusões e abandonei a utilização do termo “isoforma”. Como o presente título foi utilizado por anos em documentos atrelados à tese (por exemplo, o certificado de isenção deste trabalho), decidi não modificá-lo no título, mesmo que não o considere planamente adequado.

Obrigado e boa leitura.

1.2 O balanço ácido-base no contexto da vida

Os mecanismos mais elementares dos organismos vivos para a manutenção da vida, como os controles da osmolaridade, temperatura e pH do meio, constituem tópicos fundamentais de estudo para a fisiologia. Estes tópicos são fundamentais, pois a vida como conhecemos hoje e como imaginamos que foi no passado sempre teve que lidar com estes parâmetros, especialmente porque eles são propriedades físicas ou químicas que afetam os componentes básicos das estruturas vivas, como os ácidos nucleicos, as organelas ou as células. O ambiente de cada ser vivo está sujeito a pequenas ou grandes mudanças desses parâmetros e regulá-los em seu meio intracelular ou encontrar ambientes que não desafiem o organismo acima da sua capacidade de regulação são atividades importantes para se manter vivo. Isto pode ser compreendido tanto para a sobrevivência de um indivíduo ou de uma espécie como um todo.

Se tomarmos como exemplo a regulação da osmolaridade por um organismo unicelular, é possível perceber que este é um parâmetro que obrigatoriamente fará parte da vida deste ser. Osmolaridade é definida como o número de osmóis de solutos em um litro de uma solução, sendo a água o solvente obrigatório, pelo menos na vida como conhecemos. Mais do que isso, a própria membrana celular que constitui os limites físicos deste ser, só existe devido à relação hidrofóbica da membrana com o ambiente hidrofílico ao seu redor, portanto, sem água a membrana não se forma e não há célula. Como água sem solutos não pode constituir vida, osmolaridade será sempre um parâmetro presente. Dado que este parâmetro é o que determina o fluxo de água por osmose entre dois ambientes aquosos, ao modificá-lo há um distúrbio à vida. Este é um exemplo elementar de uma propriedade físico-química impactando, a todo momento, um organismo. Assim, a manutenção destes parâmetros em faixas compatíveis com a vida é essencial. A propriedade dos seres vivos de manter o seu meio interno estável é conhecida como homeostase.

Outra homeostase obrigatoriamente atrelada à vida pela sua relação imbricada com a água é a homeostase do pH. O estudo estrito do pH é uma área da físico-química que avalia o balanço entre o íon hidrogênio ou próton (H^+) e a hidroxila (OH^-) em uma solução aquosa. Em uma versão simplificada a H_2O se dissocia de acordo com a equação 1:

Equação (1)

Já o pH nada mais é que o negativo do logaritmo da concentração do íon hidrogênio (H^+) ou próton (equação 2):

$$pH = - \log [H^+] \quad \text{Equação (2)}$$

Como o íon hidrogênio (H^+), ou próton, pode causar modificações em praticamente qualquer tipo de proteína e é um íon ubíquo nas soluções aquosas (e, portanto, também aos fluidos biológicos), podemos imaginar que ajustar o pH dos meios internos sempre foi um desafio para os organismos. Estresses à homeostase do pH já foram estudados em espécies dos diferentes reinos biológicos¹⁻⁶.

Para compreender como os diferentes organismos conseguem manter o pH em níveis constantes, ou em outras palavras, manter a homeostase do pH, é necessário entender como o H^+ está relacionado a duas substâncias químicas fundamentais: ácidos e bases. Pela definição de Arrhenius, ácido é aquela substância que doa prótons e base é aquela que doa hidroxilas. Já na definição de Brønsted-Lowry, ácidos são aquelas substâncias que doam prótons e bases aquelas que os recebem. Existem ainda outras definições, mas para a compreensão desta tese, esta última definição é suficiente.

Assim, a partir desta definição é possível escrever a reação de dissociação de um ácido como:

Dado que HA é o ácido e A^- a base conjugada.

Se na equação três for inserida uma constante de dissociação, será possível identificar como as concentrações de cada um dos elementos da equação estão distribuídas no equilíbrio. Caso adicionalmente o H^+ for isolado e os logaritmos forem aplicados a ambos os lados da equação, será obtida a equação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[AH]} \right) \quad \text{Equação (4)}$$

Sendo que pK_a é o logaritmo negativo da constante de dissociação. Portanto a equação de Henderson-Hasselbalch é, neste caso, a representação matemática de como pH, o ácido e sua base conjugada estão quimicamente relacionados. A equação poderia ser organizada do mesmo modo para uma base em vez do ácido.

Certos mecanismos fundamentais à homeostase do pH dos seres-vivos são muito semelhantes em plantas, bactérias, humanos e diversos outros seres vivos. Para ilustrar esta situação é possível observar que alguns transportadores iônicos relacionados ao controle do pH do meio se mantiveram geneticamente conservados na história evolutiva^{7,8}. O mecanismo geral observado nestas proteínas está ligado ao transporte das variáveis descritas pela equação 4 (tanto para o ácido como para a base). Estas proteínas transportam H^+ livre (p. ex: NHE3 um trocador Na^+/H^+), OH^- (p. ex: pendrina, que pode funcionar como um trocador Cl^-/OH^-), bases (p. ex: NBC1, um cotransportador $Na-HCO_3^-$) e ácidos (p.ex: AMT, um transportador de NH_4^+). Como dito anteriormente o H^+ é muito reativo e o seu manejo pelas células é fundamental, já as bases e ácidos fracos (ácidos que se dissociam pouco ou bases que são pouco protonadas em soluções aquosas nas faixas de pH fisiológico) podem atuar como tampões. Tampões são substâncias que reduzem as variações da concentração do H^+ em sua forma livre em solução ao receber ou doar H^+ . Assim, a variação do pH é atenuada na presença destas substâncias.

Em mamíferos, o sistema tampão mais importante é o CO_2/HCO_3^- (equação 5).

Caso a equação 4 leve em conta especificamente o sistema CO_2/HCO_3^- , será obtida a equação 6, também conhecida como equação de Henderson-Hasselbalch para o ácido carbônico.

$$pH = pK_{H_2CO_3} + \log_{10} \left(\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} \right) \quad \text{Equação (6)}$$

Dado que: 1) a concentração do H_2CO_3 é diretamente proporcional ao CO_2 dissolvido; 2) é mais prático trabalhar com pressão parcial de CO_2 (pCO_2) e 3) $CO_{2(dissolvido)}$ é igual ao produto da constante de solubilidade do CO_2 pela pCO_2 , a equação pode ser adaptada para

$$pH = 6,1 + \log_{10} \left(\frac{[HCO_3^-]}{0,03 \times pCO_2} \right) \quad \text{Equação (7)}$$

Sendo que 0,03 mmol/L/mmHg é o valor aproximado da constante de solubilidade do gás carbônico no plasma e o pK aparente do ácido carbônico é 6,1.

A associação de H^+ e HCO_3^- produz CO_2 , que é eliminado pelos pulmões na mesma quantidade em que é produzido. Isto garante que a pCO_2 se mantenha constante. Assim, diferentemente de outros tampões, não há acúmulo da porção ácida da reação, o que aumenta muito a capacidade tamponante deste sistema. Além disso, o HCO_3^- está presente em concentrações altas no plasma humano, em torno de 600.000 vezes maior à concentração de H^+ no sangue.

A partir deste ponto, será possível discutir o controle do pH do organismo se utilizando não só da concentração de H^+ , mas também de OH^- , ácidos e bases, e por esse motivo será mais utilizada a expressão “balanço ácido-base”, que evidencia mais claramente a complexidade do fenômeno do que a expressão “homeostase do pH”. Outro ponto importante a ser ressaltado, que considero fundamental esclarecer ao leitor, é que a descrição acima de como o pH é determinado no organismo (razão entre HCO_3^- e pCO_2 ,) está baseada na abordagem tradicional da quantificação ácido-base que posiciona como centro do entendimento do controle do pH a concentração de bicarbonato e pCO_2 nos fluidos. Como consequência, para conhecer o pH seria necessário apenas possuir os valores de HCO_3^- e pCO_2 e utilizar a equação de Henderson-Hasselbalch. Em oposição a esta abordagem, em 1983, Peter A. Stewart propôs outro modo pelo qual o pH pode ser determinado, fornecendo outra explicação para a gênese dos distúrbios ácido-base⁹. Esta abordagem foi incrementada posteriormente, mas identificarei aqui estas abordagens alternativas como a “abordagem de Stewart”. Brevemente, Stewart em vez de usar como variáveis independentes do pH, a pCO_2 e a $[HCO_3^-]$, utilizou a pCO_2 , a carga resultante de íons fortes (SID, *strong ion difference*) e o total de ácidos fracos (A_{TOT}). O total de ácidos fracos basicamente corresponde ao conteúdo proteico do fluido e o SID é formalmente definido como a soma de todas as concentrações dos cátions fortes de uma solução, menos a concentração de todos os ânions fortes de uma solução. Na prática o SID é calculado atualmente com base nas concentrações de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- e alguns outros ânions fortes como o lactato. Nesta análise, $[HCO_3^-]$ se torna a variável dependente junto com $[HA]$, $[A^-]$, $[CO_3^{2-}]$, $[OH^-]$ e $[H^+]$. As diferenças dos desdobramentos das equações de Stewart são inúmeras ao serem comparadas com o método

tradicional apresentado anteriormente. Contudo, ressaltar três aspectos importantes no que concernem a esta tese: 1) Segundo Stewart, H^+ livres são gerados de modo a manter a diferença iônica entre cátions e ânions, sendo estes, portanto, as bases e os ácidos dos fluidos biológicos. Esta definição é bem distinta daquela de Brønsted-Lowry e o leitor deve saber que utilizar uma ou outra abordagem carrega diferentes significados. 2) A abordagem tradicional é chamada por alguns autores de centrada no bicarbonato ou “bicarbonatocêntrica”. Stewart se opôs completamente a esta visão. Nesta tese, situar o HCO_3^- como variável independente ao invés de dependente, me conduziu a conclusões que não seriam naturalmente aceitas em outros campos conceituais. 3) Utilizar um ou outro modelo pode ser visto como uma opção conceitual, teórica ou prática ou como resultado da imersão em um paradigma. E neste aspecto esta tese se apoia na abordagem tradicional pelas duas razões. Existem argumentos que serão explicitados posteriormente nesta tese para que se aceite o modelo tradicional como uma melhor explicação da realidade, mas eu estive imerso no campo paradigmático do modelo tradicional por toda a minha graduação e pela maior parte da minha pós-graduação. De modo que eu o entendo melhor, li mais sobre e tive mais contato com ele. Alguns autores reportam que determinados ambientes científicos tendem a se alinhar mais a um ou outro modelo¹⁰ e de certa forma meu trabalho é fruto de como o meu ambiente, momento histórico e professores lidaram com este assunto. Explicitado isso, daqui para frente praticamente não comentarei mais sobre o modelo de Stewart, exceto na discussão do trabalho quando brevemente darei ao leitor um argumento pelo qual eu me posiciono de acordo com a abordagem tradicional (mas não necessariamente em desacordo com a alternativa).

1.3 Rim e o balanço ácido-base

O balanço ácido-base no nível físico-químico e molecular é algo elementar a todos os seres vivos e praticamente tudo o que foi apresentado até aqui deve servir para qualquer um deles. Porém, em animais vertebrados, o rim se tornou um elemento essencial na regulação do balanço ácido-base, pois ele desempenha o papel de excretar ácidos e reabsorver e produzir bicarbonato. Contudo, é necessário ponderar que mesmo entre os animais portadores de rins, a regulação ácido-base possui diferenças essenciais entre diferentes clados. Amniotas possuem como órgãos primários do controle ácido-base do organismo os pulmões e os rins em contraste com os peixes não pulmonados que utilizam os rins e as brânquias, e os anfíbios, que dependendo da espécie, utilizam os rins e uma composição de pulmões, pele e

brânquias^{2,3,8}. Em comum, todos os Tetrapoda eliminam a maior parte dos ácidos do organismo na forma de CO_2 (ácido volátil) por vias extrarrenais, mas, independente do clado analisado, os rins sempre estão presentes, com capacidade de reabsorver bicarbonato e eliminar ácidos fixos⁸.*

Em mamíferos, como nos demais animais citados anteriormente, a maior parte dos ácidos produzidos ocorre na forma de CO_2 , gerado durante o metabolismo oxidativo. Contudo, a quantidade de bases ou ácidos fixos gerados pelo organismo depende da dieta do animal. Animais carnívoros ou onívoros com preferência por proteína animal tendem a ter maior produção de ácidos fixos e consequentemente, uma excreta resultante ácida, e herbívoros ou animais que se alimentam majoritariamente de vegetais tendem a excretar mais álcalis¹. Porém, cabe ressaltar que existem exceções como, por exemplo, os ruminantes. Eles se alimentam de vegetais, mas produzem pelo processo de fermentação uma grande quantidade de ácidos no rúmen, que por sua vez são neutralizados por bases provenientes do plasma⁹. Isto causa uma acidificação diária do plasma, que precisa ser contornada pelos rins através da eliminação de ácidos fixos e produção de bicarbonato novo (processo que será explicado a frente)¹³. As diferenças de cada espécie em relação aos mecanismos de manutenção do equilíbrio ácido-base são importantes tanto para o entendimento da fisiologia comparada como para a escolha de um modelo adequado para estudos nesse campo.

Em humanos que se alimentam de uma dieta ocidental média contemporânea, os seus organismos promovem uma produção resultante de ácidos voláteis em torno 15.000 mmol e de ácidos fixos em torno de 70 mmoles por dia⁷. Os 15.000 mmol de CO_2 são produzidos pela atividade metabólica celular e são eliminados pelo pulmão, o que não causa débitos ao sistema de regulação ácido-base. Em relação aos ácidos fixos, a resultante de 70 mmoles produzida diariamente é proveniente da perda de bases pelas fezes em um valor em torno de 10 mmoles, além dos ácidos adicionados ao fluido extracelular pela dieta acidogênica em torno de 20 mmoles e cerca de 40 mmoles pelo metabolismo celular. Esses 70 mmoles de ácidos representam, portanto, uma perda diária de bases que se não for compensada causará uma queda do pH do fluido extracelular.

Portanto, os rins são fundamentais para o balanço ácido-base, pois eles geram o bicarbonato que foi gasto no tamponamento de ácidos fixos. Além disso, o rim reabsorve diariamente quase todo o bicarbonato que foi filtrado, o que significa que ele retorna

* Outros órgãos também participam do controle do pH do organismo como o fígado e o tecido ósseo, porém de modo indireto e não serão tratados nesta tese

diariamente para o sangue em torno de 4320 mmoles de bicarbonato, uma quantidade muito superior ao total de HCO_3^- no organismo.

1.4 O sistema urinário

Em humanos, o sistema urinário é composto por dois rins situados um em cada lado da coluna vertebral na região da parede posterior do abdômen (Figura 1a). O sistema, que ainda possui vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e demais estruturas acessórias, é responsável pela filtração diária de 180 litros de ultrafiltrado de plasma, que resulta, após o processamento tubular, em cerca de 1,5-2,0 L de urina. Ao desempenhar esta função, o sistema urinário regula a osmolaridade, volume do fluido extracelular, balanço hidroeletrolítico, além da composição de diversos solutos presentes no sangue, tanto conservando importantes elementos dentro do organismo como excretando produtos metabólicos e substâncias exógenas. Adicionalmente, os rins ainda possuem papel endócrino no organismo, como, por exemplo, na produção de eritropoietina e renina.

O sangue alcança os rins pela artéria renal e, em seguida, após uma sequência de ramificações o sangue chega às arteríolas aferentes (Figura 1). Estes vasos penetram estruturas chamadas de cápsulas de Bowman, onde se ramificam num enovelado capilar denominado de glomérulo. No glomérulo, em média, $\frac{1}{5}$ do sangue é ultrafiltrado (ou chamado apenas de filtrado) por diferença de pressão para o interior da cápsula de Bowman. Os demais $\frac{4}{5}$ prosseguem para a arteríola eferente que se ramifica em capilares que ficam no entorno dos túbulos renais (estes serão descritos logo em seguida). O filtrado obrigatoriamente atinge o primeiro segmento tubular do rim, o túbulo proximal. Nos túbulos, o fluido tubular é modificado tanto por reabsorção como por secreção. A secreção significa a entrada de solutos do espaço peritubular para o lúmen tubular, e reabsorção, a saída de água e solutos do lúmen para o espaço peritubular. O espaço peritubular está em contato com os capilares peritubulares, para onde vão as substâncias reabsorvidas e de onde vêm as substâncias secretadas. Os capilares peritubulares envolvem toda a extensão tubular do rim e se unirão para formar as veias interlobulares, veias arqueadas, veias interlobares e finalmente a veia renal (Figura 1b e 1c).

O túbulo proximal prossegue para as alças de Henle, que por sua vez prosseguem para o túbulo distal, segmento de conexão e enfim os dutos coletores. Ao sair do duto coletor papilar, o fluido tubular já é a urina final, portanto, não será mais modificado nas vias

excretoras, por isso a soma dos segmentos tubulares com o glomérulo e a cápsula de Bowman é conhecida como a unidade funcional do rim, o nefro. *

A região mais externa do rim que possui os glomérulos, os túbulos proximais, porção final do segmento espesso da alça de Henle, túbulos distais e início do duto coletor é conhecida como córtex, que é distinguível visualmente da medula que contém as alças de Henle e dutos coletores. As pirâmides renais são aglomerados de túbulos que em imagens de cortes sagitais ficam com formato levemente triangular (aí vem o nome de pirâmide) que desembocam (ápice da pirâmide) numa região chamada de papila. As bases da pirâmide delimitam transição entre córtex e medula. As papilas reúnem conglomerados dos diversos dutos coletores e a urina de cada duto se unirá em uma estrutura chamada cálice. A urina vai do cálice até o ureter e do ureter de cada rim para a bexiga.

Assim, o rim pode ser simplificado a um sistema hidráulico com uma entrada (artéria renal) e duas saídas (veia renal e ureter), acoplado a um sistema de circulação de solução (sistema cardiovascular como um todo). O sangue entra no sistema hidráulico pela artéria renal, e no meio do sistema parte é filtrada e parte segue para as arteríolas eferentes. A parte filtrada é modificada por reabsorção, retornando água e solutos para o sistema e também é modificada por secreção, recebendo solutos dos capilares. Aquilo que não foi filtrado ou secretado adicionado ao reabsorvido sairá pela veia renal. Aquilo que foi filtrado e não foi reabsorvido e aquilo que foi secretado sairá pelo ureter na forma de urina. A via de entrada e as duas vias de saída estão anatomicamente reunidas em uma região conhecida como hilo.

O rim, como um todo, afeta e é afetado pelo balanço ácido-base, porém este trabalho possui maior interesse pelo nefro, pois como mencionado anteriormente, esta é a unidade funcional do rim e assim é o local onde são desempenhadas duas atividades fundamentais: reabsorção de bicarbonato e a produção de bicarbonato novo.

* O duto coletor não faz parte do nefro do ponto de vista embriológico, mas será considerado como parte do nefro nesta tese devido à continuidade da “unidade funcional” que ele proporciona.

Figura 1 – Estrutura do sistema urinário em diferentes níveis

A - Sistema urinário como um todo. B – Corte sagital do rim. C – nefro e sua vascularização. FONTE: modificado de Boron e Boulpaep (2005).

1.5 O nefro no balanço ácido-base

Os rins de um humano adulto (~70kg) filtram por dia em torno de 180 litros de plasma. Como a concentração de bicarbonato no plasma desses indivíduos é em média de 24 mM podemos calcular que a carga filtrada diária de bicarbonato é em torno de 4320 mmol.

Esta quantidade de HCO_3^- é praticamente toda reabsorvida pelos túbulos renais. No túbulo proximal são reabsorvidos em torno de 80% desta carga filtrada, 10% são reabsorvidos pela porção espessa da alça de Henle, 6% pelo túbulo distal e 4% pelo duto coletor.

De modo semelhante à reabsorção de bicarbonato, a produção de bicarbonato novo é majoritariamente realizada no túbulo proximal (~79%), porém o restante ocorre no túbulo distal (~7%) e duto coletor (~14%). Portanto, no que diz respeito à quantidade, o túbulo proximal é o segmento mais importante do nefro para o manejo ácido-base renal.

1.5.1 Túbulo proximal e bicarbonato

O túbulo proximal é responsável por $\frac{4}{5}$ da reabsorção de bicarbonato, sendo que o mecanismo pelo qual o bicarbonato é reabsorvido tanto neste segmento como por todo o nefro é o mesmo: secreção de ácido.

O processo de reabsorção de bicarbonato por secreção de H^+ que ocorre no túbulo proximal está descrito na figura 2. Ao ser secretado, o H^+ encontra na luz o bicarbonato filtrado. De acordo com a reação descrita na equação 5, o HCO_3^- e o H^+ geram CO_2 e H_2O . Este CO_2 se difunde para dentro da célula pela bicamada lipídica e pelas aquaporinas do tipo 1¹¹ onde sai reidratado formando bicarbonato e H^+ , uma reação que é catalisada pela anidrase carbônica. O bicarbonato sairá pela membrana basolateral das células do túbulo proximal através do cotransportador $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ (NBC1) ou pelo contratransporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE2)¹². Nos demais segmentos do nefro o bicarbonato é reabsorvido pelo mesmo processo, porém os transportadores mudam para cada local. A tabela 1 resume os transportadores responsáveis por este processo em cada segmento.

Tabela 1 – Transportadores responsáveis pela reabsorção ou secreção de bicarbonato em cada segmento do nefro

Segmento do nefro	Membrana apical	Membrana basolateral
Túbulo proximal S1 e S2	NHE3	NBC1
	H ⁺ -ATPase	
	NHE8?	
	NHE2?	
Túbulo proximal S3	NHE3	AE2
	H ⁺ -ATPase	NBC1
	NHE8?	
Alça de Henle segmento espesso ascendente	NHE3	AE1
	H ⁺ -ATPase	
Túbulo distal convoluto	NHE3	AE1
	H ⁺ -ATPase	
	NHE2	
	NHE8?	
Duto coletor - intercalada- α	H ⁺ -ATPase	AE2
	H ⁺ / K ⁺ -ATPase	
Duto coletor- intercalada- β (secreção de HCO ₃ ⁻)	Pendrina	H ⁺ -ATPase

Em mamíferos, dos $\frac{4}{5}$ de HCO₃⁻ reabsorvidos pelo túbulo proximal aproximadamente, $\frac{2}{3}$ são reabsorvidos de modo indireto pelo parálogo 3 do trocador sódio hidrogênio (NHE3) e $\frac{1}{3}$ pela H⁺-ATPase^{11,13}. Estes são os valores mais aceitos para a contribuição do NHE3 no valor total de reabsorção de HCO₃⁻. Experimentos de microperfusão realizados em ratos indicam que 43% a 57% da reabsorção de HCO₃⁻ do túbulo proximal é inibida por S3226, um inibidor específico do NHE3¹⁴⁻¹⁶. Porém, independente dos valores indicados por cada trabalho, há concordância na literatura de que a via secretória de H⁺ predominante do ponto de vista quantitativo em todo o nefro seja o NHE3. Em uma conta simples, se 40 a 65% dos 80% de HCO₃⁻ reabsorvidos no túbulo proximal são realizados pelo NHE3 neste segmento, sua contribuição é de 32% a 50% de toda a reabsorção de HCO₃⁻, sem contar sua atividade na alça de henle¹⁴.

Figura 2 – Reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal

A - No segmento S1 e S2 a secreção de ácidos é feita na membrana apical pelo trocador Na^+/H^+ e pela $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ e a reabsorção de HCO_3^- é feita na membrana basolateral pelo cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. B - No segmento S3 a secreção de ácidos é feita na membrana apical pelo trocador Na^+/H^+ e pela $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ e a reabsorção de HCO_3^- é feita na membrana basolateral pelo cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ e pelo trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. ACII e ACIV referem-se aos parálogos II e IV da anidrase carbônica. FONTE: própria autoria.

Contudo, além da reabsorção de bicarbonato pelo túbulo proximal, 55 mmol ou quase 80% do bicarbonato novo produzido pelo rim são gerados neste segmento. Parte da produção do bicarbonato novo acontece por um processo muito semelhante ao da reabsorção, mas ao invés de o H^+ se ligar a um ânion bicarbonato, ele se une a outro composto como os ânions fosfato. Devido a possibilidade de titular a urina para se detectar quanto de H^+ foi excretado na forma associada a estes ânions, este processo é chamado também de acidez titulável. Assim, o processo de produção de HCO_3^- ocorre dentro da célula e este é reabsorvido, mas o seu consumo na luz tubular não ocorre quando o H^+ é tamponado por um tampão-não bicarbonato (Figura 3a). Por isso, o HCO_3^- gerado nestas circunstâncias é dito HCO_3^- novo. Além disso, o H^+ pode ser excretado na forma de NH_4Cl (Figura 3b). A produção de NH_4^+ no metabolismo da glutamina tem como resultado final geração de igual quantidade de HCO_3^- no espaço intracelular e este é reabsorvido pela membrana basolateral de túbulos proximais. A produção de HCO_3^- se dá indiretamente pelo processo da gliconeogênese, que consome H^+ , propiciando a geração intracelular de HCO_3^- . Acredita-se que NH_4^+ é secretado para luz via NHE3, mas as evidências são indiretas e camundongos nocaute para *Nhe3* especificamente no túbulo proximal não possuem déficit na excreção de amônia¹⁷. Em condições basais aproximadamente 40% do bicarbonato novo é formado pela acidez titulável e 60% pela excreção de NH_4Cl ¹⁸. Condições adaptativas a certos estresses ácidos se dão, dentre outros modos, pelo aumento da taxa de gliconeogênese e consequente produção de amônio e bicarbonato pelo túbulo proximal. Condições fisiopatológicas como as descritas acima serão esmiuçadas em seguida.

Figura 3 – Formação de bicarbonato novo pelo nefro

A – fosfato como aceptor de H⁺. B – amônia como aceptor de H⁺. α-CG – α-cetoglutarato. A via de secreção de NH₄⁺ através do NHE3 ainda não está bem estabelecida. FONTE: própria autoria,

1.6 As acidoses e o rim

Acidose é o processo que causa queda do pH de um espaço do organismo, como o interior da célula, o plasma sanguíneo ou de um líquido intersticial. Atribui-se a primeira utilização do termo acidose a Bernhard Naunyn em seu tratado de 1898 intitulado *Der Diabetes Mellitus* (O diabetes mellitus)¹⁹. No final do século XIX e início do século XX diversos sintomas do diabetes já eram conhecidos. Uma consequência comum do diabetes descompensado era o aumento da concentração plasmática de corpos cetônicos, como o ácido β -oxibutírico. Naunyn chamou este acúmulo em indivíduos com diabetes descompensada de acidose, e recomendava ao seus pacientes a ingestão de bicarbonato para controlar os sintomas da doença e assim evitar problemas como o coma. É possível encontrar textos da década de 1910 utilizando o termo acidose como sinônimo de cetoacidose²⁰, contudo como fica claro no trecho escrito em 1917 por Donald Dexter van Slyke, o termo teve seu foco retirado do acúmulo de corpos cetônicos e foi passado para a definição que seria mais tarde definida pelo próprio autor como acidose de origem metabólica²¹:

“Accordingly, for use in the present series of papers, we define acidosis as a condition in which the concentration of bicarbonate in the blood is reduced below the normal level. The definition appears a necessary preliminary because of present confusion in the literature, different authors regarding acidosis differently as “acid intoxication,” as a condition in which acetone bodies are formed, or as an actual increase in the hydrogen ion concentration of the blood.”

A identificação de disfunções ácido-base mais gerais também é atribuída especialmente a van Slyke pela descrição das alcaloses, assim como as origens respiratórias e metabólicas dos distúrbios²². Porém, mesmo antes dos trabalhos citados de Van Slyke, essas condições já haviam sido reportadas e descritas em artigos e o reconhecimento da acidose como um fenômeno mais amplo e ligado a diversas patologias já parecia claro²³.

Clinicamente, humanos com pH do sangue arterial abaixo de 7,35 são considerados em acidose e acima de 7,45 em alcalose. Essa faixa considerada normal é constantemente alterada pelas diferentes contribuições da literatura e mesmo a variabilidade populacional compromete uma especificação taxativa do valor de pH a partir do qual pode-se considerar um distúrbio. As acidoses são divididas em dois grupos conhecidos como acidoses de origem metabólica e de origem respiratória. Nas acidoses metabólicas observa-se queda do pH

plasmático acompanhado de queda da concentração plasmática de bicarbonato ($[\text{HCO}_3^-]$), e nas acidoses respiratórias observa-se queda do pH concomitante com aumento na pressão parcial de CO_2 (pCO_2) e da concentração plasmática de HCO_3^- .

Assim que um organismo é desafiado por uma mudança nas variáveis ácido-base há uma série de compensações que visam retorná-las para os valores normais. Para identificação de quais distúrbios um indivíduo estaria submetido e como que o organismo responderia, van Slyke deu outra contribuição para o estudo da fisiologia do balanço ácido-base, que foi o diagrama que leva seu nome, apesar de mais conhecido como diagrama de Davenport (Fig. 4)²⁴. No trabalho original, Van Slyke descreveu nove áreas no diagrama indicando os distúrbios correspondentes a cada região do diagrama. Este diagrama indica como duas variáveis importantes para o balanço ácido-base do organismo (pH e $[\text{HCO}_3^-]$) variam em diferentes condições de pCO_2 fixa (isóbaras). A partir deste diagrama é possível compreender como o organismo compensa estresses ácidos e retorna o pH para os valores normais. No ponto inicial (I) do diagrama o indivíduo está com pH plasmático igual a 7,40, concentração de bicarbonato de 24 mM e pCO_2 de 40 mmHg. Caso um indivíduo tenha uma queda por qualquer motivo na $[\text{HCO}_3^-]$, sem alteração na pCO_2 , o indivíduo entrará em acidose metabólica (ponto C, na mesma isóbara). A queda do pH será detectada pelo quimiorreceptores centrais que dispararão para o pulmão uma mensagem hiperventilatória. Isto causará a queda da pCO_2 plasmática e com isso haverá aumento do pH. Caso haja uma compensação perfeita, o pH retornará a 7,40 (ponto A), porém em outra isóbara e com $[\text{HCO}_3^-]$ reduzida em relação ao ponto I. A correção do distúrbio, dentro de certos limites, deverá ser feita pelos rins por meio da geração de HCO_3^- novo, e à medida que a concentração de HCO_3^- vai retornando ao normal, a pCO_2 também volta ao normal, pois o estímulo dos quimiorreceptores diminui. Por outro lado, em uma condição de acidose respiratória (ponto D) a pCO_2 estará alta e com o isso o pH irá diminuir. Com isso os rins respondem de modo a gerar maior quantidade de bicarbonato e assim aumentar a sua concentração no plasma. O aumento da concentração de bicarbonato no plasma corrige o pH que estava baixo (ponto O), o que no entanto, mantém a pCO_2 e a $[\text{HCO}_3^-]$ elevadas. A correção do distúrbio deverá ser feita pelo retorno da capacidade ventilatória. Contudo, se a origem desses estresses ácidos não for contornada, o indivíduo pode se manter em condições conhecidas como mistas, no qual uma acidose e uma alcalose se sobrepõem.

Figura 4 – Sequência de alterações das variáveis ácido-base após estresse por acidose metabólica ou respiratória em um diagrama ácido-base (ou de Davenport-Van Slyke)

O diagrama é um gráfico de $[\text{HCO}_3^-]$ x pH, as linhas pontilhadas são as isóbaras de 20, 40 e 80 mmHg. O ponto I descreve um indivíduo na condição inicial e normal do ponto de vista das variáveis ácido-base. Os pontos C e D descrevem uma acidose metabólica e respiratória, respectivamente. Os pontos A e O indicam os pontos após compensação respiratória e renal, respectivamente. Os pontos representam dados teóricos de acidificação, com compensações perfeitas dentro das isóbaras de 20 e 80 mmHg, apenas para facilitar a visualização. FONTE: autoria própria.

As origens para o surgimento de ambos os tipos de acidose são diversas e caso não sejam corrigidas, as consequências podem ser graves ou até fatais²⁵. A acidose metabólica, a despeito de existirem evidências de que possa não ser prejudicial e até protetora da função renal na doença renal crônica^{26,27}, é considerada como um importante fator no agravamento da doença²⁸. Uma série de órgãos é afetada pela acidose metabólica que pode gerar arritmias

cardíacas, hipotensão, queda de perfusão tecidual, aumento da taxa de apoptose e diversas outras morbidades²⁵.

No livro “The Kidney” de Brenner e Rector estão listadas mais de 100 causas para a acidose metabólica, contudo é possível resumi-las em dois grandes grupos: perda de bicarbonato ou acúmulo de ácidos fixos no organismo²⁹. Essas condições podem ser decorrências de doenças renais genéticas que impedem a excreção de ácidos e a reabsorção de bicarbonato (ex: acidoses tubulares), doenças renais que impedem a filtração do plasma (ex: insuficiência renal), doenças extrarrenais que causam acúmulo de ácidos (ex: cetoacidose diabética, acidose láctica), perda de bicarbonato por doenças gastro-intestinais (ex: diarreia, drenagem pancreática ou biliar), condições patofisiológicas que causam mudança da composição dos líquidos extra e intracelular (ex: hipercalemia), além de intoxicação ou envenenamento (hiperalimentação, ingestão de cloreto de amônia).

A hipercapnia também possui diversos efeitos tóxicos ao organismo, causando alterações no metabolismo celular, queda na capacidade reprodutiva, perda de consciência, além de ação teratogênica e carcinogênica²⁹. A acidose respiratória é basicamente provocada por qualquer condição que cause hipoventilação, como doenças pulmonares severas, fadiga dos músculos respiratórios ou depressão do centro ventilatório. Mais raramente, ainda é possível o envenenamento por concentrações altas de CO₂ no ambiente (tabela 2).

Tabela 2 – causas da acidose respiratória

Localidade	Causas para acidose respiratória
Central	Drogas (anestésicos, morfina, sedativos)
	Acidente vascular cerebral
	Infecção
Vias aéreas	Obstrução
	Asma
	Enfisema
Parênquima	Doença pulmonar obstrutiva crônica
	Pneumoconiose
	Bronquite
	Síndrome do desconforto respiratório do adulto
	Barotrauma
Ventilação mecânica	Hipoventilação
	Hipercapnia permissiva
	Poliomelite
Neuromuscular	Cifoescoliose
	Miastenia
	Distrofia muscular
	Esclerose Múltipla
Diversos	Obesidade
	Hipoventilação

FONTE: adaptada de Brenner & Rector's The Kidney²⁹

1.7 O NHE3 no túbulo proximal

A manutenção do balanço ácido-base passa, portanto, pelo controle das variáveis ácido-base base momento a momento, desde a detecção de como estão seus níveis no organismo, até a regulação da atividade dos diversos modos de controle destas variáveis, como por exemplo a ventilação pulmonar ou a atividade de proteínas transportadoras de H^+ , OH^- , bases ou ácidos. Como descrito anteriormente, o NHE3 é um importante ator na

regulação da concentração de HCO_3^- plasmático, e portanto entender como esta proteína funciona, se torna fundamental para entender o próprio balanço ácido-base.

NHE3 é o membro da família de trocadores Na^+/H^+ mais abundante em membranas apicais de células de túbulos proximais renais. Esses permutadores são proteínas constituídas por 12 domínios transmembrana, com domínio amino-terminal (N-terminal) transmembrana e cauda carboxi-terminal (C-terminal) longa citoplasmática³⁰. O NHE3 promove a secreção de próton e a reabsorção de Na^+ por um mecanismo de contratransporte movido pelo gradiente químico do Na^+ gerado pela Na^+/K^+ -ATPase, presente na membrana basolateral. Essa secreção de H^+ na troca pelo Na^+ resulta na reabsorção de HCO_3^- . A intensa reabsorção preferencial de HCO_3^- , como contra-ânion do Na^+ , na parte inicial dos túbulos proximais (segmento S1) acaba por, indiretamente, favorecer a reabsorção de Cl^- . Este processo resulta em uma concentração luminal de Cl^- mais elevada nos segmentos mais distais do túbulo proximal (S2 e S3), o que facilita sua reabsorção por difusão pela via paracelular. No segmento S1, cloreto é reabsorvido principalmente por via paracelular, movido pela pequena diferença de potencial transepitelial negativa e por arraste pela água que acompanha a reabsorção de Na^+ . Em S2 e S3, além da difusão por via paracelular, o Cl^- é reabsorvido por via transcelular, na membrana apical por troca por ânions, como OH^- , HCO_3^- ou formato que, para sua geração intracelular, dependem da secreção de H^+ via NHE3. Sendo assim, NHE3 é essencial para a reabsorção da maior parte de NaHCO_3 e NaCl que ocorre em túbulos proximais, sendo muito importante no controle do volume extracelular, dos níveis de pressão arterial e do balanço ácido-base.

A taxa de transporte do NHE3 pode ser regulada tanto pela atividade intrínseca do transportador como pela abundância do transportador na membrana apical³¹. Cada um destes modos regulatórios pode ser modulado por uma série de fatores, desde hormônios³²⁻³⁴ até condições físicas como o fluxo do filtrado no túbulo proximal³⁵. Por sua vez, cada uma dessas alterações irá atuar através de ações diretas sobre o trocador ou sobre uma série de componentes intermediários como proteínas acessórias, metabólitos intracelulares, proteínas do citoesqueleto, etc. Os níveis de regulação são diversos, e ainda não está claro como elas estão organizadas. De qualquer modo, existem boas revisões sobre o tema^{13,36} e nos parágrafos abaixo há um breve resumo dos elementos que causam modificações na atividade do NHE3 nos diferentes níveis de regulação.

A regulação do NHE3 pela atividade intrínseca do transportador foi abordada por alguns estudos que utilizaram medidas de cinética de recuperação do pH intracelular. Estes trabalhos foram realizados tanto com a utilização de algum fluoróforo sensível a pH (por

exemplo, BCECF-AM)^{31,37} como através de medidas de pH intracelular por eletrodos sensíveis a H^+ ³⁸. A cinética do transporte de Na^+ pelo permutador pode ser descrita por uma cinética michaeliana, o que sugere a existência de um único sítio de ligação. Por outro lado a cinética de ligação do H^+ no sítio intracelular sugere a existência de pelo menos dois sítios de ligação, sendo um sítio alostérico que modifica a taxa de transporte e um sítio de translocação³⁹. Diferentes estímulos podem levar a mudança no V_{max} , outros à mudança na afinidade pelas espécies transportadas. Contudo, para que se garanta que as alterações na taxa de transporte estejam relacionadas à atividade intrínseca do transportador e não à alteração da abundância de proteínas na membrana seria necessário medir a atividade de apenas um transportador ou garantir que não haja alteração na quantidade de proteínas durante a manobra experimental. A atividade de um único transportador eletrogênico é inviável de ser medida através de técnicas eletrofisiológicas devido ao baixo sinal elétrico gerado pelo pequeno fluxo de cargas. Além disso, o NHE3 possui atividade eletroneutra, o que impossibilita o registro elétrico direto do transportador. Assim, os trabalhos que abordaram esta questão mensuraram a atividade de uma área de membrana contendo NHE3 e se certificaram de que mudanças na atividade do transporte Na^+/H^+ não eram acompanhadas de mudanças na quantidade de proteínas presentes na membrana apical e nem eram geradas por outros transportadores³⁸.

Em experimentos realizados com proteínas NHE3 truncadas que possuíam apenas os 19 amino-ácidos iniciais do domínio C-terminal, foi observado que a despeito dos níveis muito inferiores de taxa de transporte, a relação entre o transporte Na^+/H^+ e a concentração de H^+ no espaço intracelular se mantinha num formato sigmoidal, assim como com as proteínas inteiras. Isto sugere que o sítio sensor alostérico para H^+ está presente no domínio N-terminal do NHE3⁴⁰. Contudo, trabalhos posteriores demonstraram que regiões da cauda C-terminal próximas ao domínio N-terminal são importantes para a sensibilidade a H^+ do NHE3 e portanto a preservação daqueles 19 amino-ácidos iniciais pode ter mantido o sensor intacto, parcialmente funcional ou ainda ajudar a compor a sensibilidade ao H^+ em conjunto com outros pontos presentes no domínio N-terminal^{38,41}. Em NHE1, mesmo a remoção completa da cauda C-terminal mantém a resposta alostérica da proteína a alterações de pH intracelular⁴². Em contraposição ao exposto acima, é possível que existam diversos pontos da face citoplasmática da proteína que são responsáveis pela ativação alostérica do transportador.

Cabe ressaltar que o tradicional modelo de ativação alostérica não foi considerado suficiente para explicar as respostas da taxa de transporte do NHE3 por alterações no formato da membrana devido a modificações na osmolaridade do meio⁴³. Em vez do modelo alostérico

de dois estados, foi proposto um modelo de três estados. Se o modelo de três estados pode ser utilizado para compreender o comportamento da proteína em outras condições, ainda não é claro e são necessários mais estudos. Contudo, o modelo alostérico parece suficiente para compreender o que ocorre com o NHE3 em diferentes pH intracelulares.

Em rins, existe uma série de candidatos a reguladores da sensibilidade a H^+ do sítio alostérico intracelular. De modo geral, interações proteicas atuando por exemplo na fosforilação de alguns resíduos na cauda C-terminal são grandes candidatos a moduladores deste tipo de regulação. A proteína homóloga à calcineurina subtipo 1 (calcineurin homologous protein-1, CHP1) interage com o NHE3 de modo dependente de pH³⁸. Em experimentos realizados em células OKP submetidas à hiperexpressão de CHP1, observou-se que quanto menos esta proteína estiver ligada ao NHE3, a dopamina, um inibidor da atividade do trocador, exerce um efeito mais acentuado³⁸. Nesse trabalho, a atividade do NHE3 foi mensurada por eletrodos intracelulares sensíveis a H^+ , ao passo que a medida de capacitância por *patch clamp* foi utilizada para detectar possíveis variações na área da membrana. A ausência de modificação da capacitância indicava que não houve inserção nem remoção de proteínas na membrana por exocitose ou endocitose. Em outro trabalho, a análise de cinética do transporte Na^+/H^+ em células OKP demonstrou que o paratormônio pode modificar além do V_{max} do transportador, a sua constante de afinidade ao hidrogênio (K_H)⁴⁴. A mudança do V_{max} poderia ser atribuída ao número de transportadores, porém a mudança do K_H dificilmente o seria. Em linhagens celulares de adenocarcinoma de intestino (Caco-2) e de fibroblastos (PS120) transfectadas com *Nhe3* de coelho observou-se que a fosforilação da cauda C-terminal por CAMKII (Calmodulin Kinase II) causa inibição do NHE3 sem modificar a quantidade de NHE3 presente na membrana apical (de Caco-2), indicando que possivelmente há regulação da atividade intrínseca do transportador através de fosforilação da cauda C-terminal³⁷.

Fosforilação e interações proteicas com a cauda c-terminal do NHE3 também estão relacionadas às alterações no tráfego do transportador entre a membrana apical e compartimentos subapicais. Em células PS120, também transfectadas com *Nhe3* de coelho, a fosforilação por CKII (Casein kinase 2) é estimulatória à atividade de transporte por aumentar a presença do NHE3 na membrana⁴⁵. Curiosamente, CAMKII, que foi identificada como importante na inibição da atividade intrínseca do NHE3, é necessária para que ocorra o aumento da presença do transportador na membrana, por aumento da concentração de cálcio intracelular⁴⁶. Este processo depende da interação da cauda C-terminal do NHE3 com uma

proteína chamada IRBIT (IP3 receptor binding protein released with IP3). Em células de glândula salivar (HSG), a interação entre IRBIT e NHE3 é necessária para a recuperação do pH intracelular após pulso ácido com NH_4Cl .

Outro importante regulador do NHE3 é o AMPc via proteína cinase A (PKA), mas assim como o CAMKII, ele parece ter importância tanto na regulação da atividade intrínseca como no tráfego da proteína. Contudo ele possui ação inibitória em ambos os processos. A inibição do tráfego se dá tanto pelo aumento na endocitose do NHE3, como na diminuição de sua reciclagem para a membrana³¹.

Assim, a lista de fatores que alteram o tráfego do NHE3 entre a membrana e compartimentos subapicais é extensa, em seguida alguns exemplos: acidose metabólica²⁵, angiotensina II^{47,48}, dopamina^{34,49}, hormônio da paratireoide³², glicocorticoides⁵⁰, mudança no fluxo tubular ou tensão de cisalhamento⁵¹. Se estes fatores alteram a atividade intrínseca do NHE3 precisaria ser investigado.

Portanto, a regulação da atividade do NHE3 pode ser realizada pelo controle da atividade intrínseca ou pela quantidade de proteínas na membrana através da regulação do tráfego da proteína. Adicionalmente, as células do túbulo proximal podem também regular a abundância total do NHE3 na célula, amplificando o poder de inserção desta proteína à membrana celular. A alteração das quantidades de RNAm e de proteína NHE3, seja pelo aumento da transcrição e da tradução, ou pela diminuição da degradação destes componentes, foi verificada por uma série de trabalhos^{32,52-57}. Estímulos excitatórios ou inibitórios como, acidose metabólica, glicocorticoides, paratormônio, ouabaína e dopamina causam modificações na atividade do NHE3 também via mudanças na produção da proteína. Em resumo, é possível observar que muitos dos diversos estímulos citados possuem mecanismos redundantes ou que atuam em diferentes etapas após o estímulo, de segundos a dias. Porém, ainda existem muitas lacunas no entendimento global de todas estas regulações, exigindo um esforço de revisão e visão ampla dos pesquisadores que estudam o tema.

1.8 Acidoses e o NHE3

De acordo com os argumentos listados até aqui, o NHE3 possui importante papel na regulação do balanço ácido-base em mamíferos. Por outro lado, seria cabível imaginar que a

contrapartida seria verdadeira: mudanças no balanço ácido-base poderiam modificar a atividade do NHE3.

Os efeitos ativadores da acidose metabólica sobre o transporte Na^+/H^+ foram extensivamente estudados tanto em modelos celulares^{52,53,58-60} como animais^{52,61-64}. Na acidose metabólica crônica identificou-se aumento na abundância proteica, na atividade do NHE3, além de aumento do NHE3 na membrana plasmática^{52,53,64,65}. A maioria dos trabalhos demonstrou o aumento do RNAm do *Nhe3* pela acidose metabólica crônica, contudo existem alguns trabalhos que não identificaram aumento^{52,60,66}. Assim, os efeitos ativadores da acidose metabólica crônica sobre a atividade e a abundância proteica do *Nhe3* estão consolidados na literatura, porém o efeitos sobre o RNAm do *Nhe3* ainda não estão bem esclarecidos. Na avaliação da atividade do promotor do gene *Nhe3* na acidose metabólica feita por Cano em 1996⁶⁷, observou-se uma queda, ainda que não significativa, da atividade promotora por este estímulo ácido.

Além da atividade transcricional, os efeitos ativadores da acidose metabólica sobre os níveis de RNAm-*Nhe3* poderiam também ser devidos a diminuição da degradação do RNAm. Estes efeitos já haviam sido observados para outros genes importantes no que concerne à resposta adaptativa a acidose, como a glutaminase, enzima envolvida no metabolismo da glutamina em células de túbulos proximais⁶⁸. A acidose metabólica reduz a taxa de degradação dos RNAm destas enzimas, mas não há estudos que avaliem a taxa de degradação do RNAm do *Nhe3*.

Em relação à acidose respiratória, os dados referentes a efeitos sobre o transporte Na^+/H^+ em túbulo proximal são controversos. Apesar da compensação renal em resposta à acidose respiratória ser usualmente observada em pacientes e em modelos experimentais, através de aumento na secreção de ácidos e na reabsorção de HCO_3^- ^{66,69-72}, os efeitos da acidose respiratória sobre o NHE3 ainda não são claros. Experimentos com túbulos isolados e vesículas de membrana de bordo em escova de túbulos proximais de coelhos submetidos à acidose respiratória crônica demonstraram aumento da atividade da troca Na^+/H^+ ^{58,72,73}. Resultados semelhantes foram observados em experimentos realizados em cultura primária de túbulos proximais de coelhos²⁵. Contudo, experimentos com vesículas de bordo em escova de ratos submetidos à acidose respiratória crônica não mostraram modificações na atividade Na^+/H^+ ^{71,74}. Além disso, em experimentos ainda mais contrastantes com os demais, Santella e colaboradores não identificaram mudanças na reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal de ratos submetidos à hipercapnia, quando a carga filtrada de HCO_3^- era similar entre os

grupos controle e de acidose⁷⁵. Isto poderia indicar que o CO₂ e o pH não teriam efeitos sobre os transportadores secretores de ácido no túbulo proximal, mas sim que o aumento da carga filtrada de bicarbonato é que seria responsável pelo aumento da reabsorção deste ânion. Para Santella e colaboradores, o nefro distal é que seria o principal responsável pelas adaptações renais em resposta a acidose⁷⁵.

Portanto, os efeitos da acidose respiratória crônica sobre o NHE3 continuam controversos, com o agravante de que esse tipo de distúrbio tem sido menos estudado que a acidose metabólica no que concerne à fisiologia renal. Assim, identificar como os rins respondem a acidose respiratória é importante tanto para o avanço do conhecimento na área, como para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos no aumento da concentração de bicarbonato plasmático observado nas acidoses respiratórias.

Durante minha iniciação científica, o efeito da acidose metabólica e respiratória sobre a abundância do RNAm e proteína NHE3 de células OKP foi analisado. Além disso, foram descritos os efeitos de ambas as acidoses sobre a atividade promotora de um segmento regulatório que englobava 2100 pb da região flanqueadora 5' e 55 pb do primeiro éxon do gene *Nhe3*. O mesmo foi feito para um promotor reduzido do gene do *Nhe3*, identificado anteriormente como mais ativo no nosso laboratório, que possuía um pouco mais de 150 pb à montante do sítios de início de transcrição e 55 pb à jusante³². Estes dados indicavam que a acidose metabólica aumentaria as abundâncias do RNAm e proteína NHE3, bem como a atividade transcricional do promotor “inteiro”, mas não do reduzido. Portanto, a acidose metabólica possuiria um efeito ativador sobre a cadeia de produção (ou inibidor da cadeia de degradação) do transportador. Além disso, que possivelmente entre os quase 1950 pb deletados do promotor inteiro para o reduzido, haveria importantes sequências para a resposta transcricional do *Nhe3* à acidose metabólica. Já na acidose respiratória, não foram identificadas alterações em nenhum dos parâmetros mensurados. Esta descrição dos efeitos das acidoses sobre o *Nhe3* abriu diversas questões como, por exemplo, como estaria a abundância do NHE3 na membrana das células OKP. Poderia o aumento da atividade do NHE3 em condições de acidose respiratória, evidenciada em partes dos trabalhos na literatura, ser devido a um aumento da presença da proteína na membrana, independente do aumento de sua abundância total na célula? E nos quase 1950 pb ausentes entre um fragmento e outro do promotor, onde estariam as regiões mais importantes para o aumento da transcrição na acidose metabólica? Quais sítios de transcrição seriam responsáveis por este aumento? E ao observar todas as possíveis adaptações a serem descritas nas acidoses, quais estímulos seriam

necessários para desencadeá-las? Estas são questões que esta tese pretendeu abordar. Todas estão sob o guarda-chuva de uma grande questão que não será respondida aqui, mas que conduziu boa parte deste trabalho: fundamentalmente, por que a acidose metabólica ativaria a produção do NHE3 e a acidose respiratória não?

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente os efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a expressão e a sub-localização celular do NHE3 em células *opossum kidney clone P* (OKP). Para em seguida, identificar a partir desta análise quais estímulos moleculares e físico-químicos são responsáveis pelas diferenças e similaridades dos efeitos observados após ambos os tipos de estímulos ácidos.

Para que estes objetivos fossem cumpridos foram definidas tais etapas:

- 1) Análise descritiva de fenômenos decorrentes da exposição das células OKP a meios acidificados por baixa concentração de bicarbonato (simulação de acidose metabólica) ou alta pCO_2 (acidose respiratória). Os fenômenos observados foram:
 - a) A abundância de RNAm do *Nhe3* em condições de acidose metabólica e acidose respiratória com pH do meio similares;
 - b) Abundância de proteína NHE3 presente na membrana plasmática;
 - c) Atividade de regiões não previamente testadas do promotor do gene do *Nhe3*.
- 2) Identificação de sequências consenso para ligação de fatores de transcrição em regiões do promotor do gene do *Nhe3* importantes para a resposta à acidose metabólica, através de:
 - a) Identificação por bioinformática
 - b) Deleções e mutações de sítios para fatores de transcrição candidatos a importantes na resposta a acidose metabólica.
- 3) Identificação de alteração da abundância proteica de fatores de transcrição identificados no item anterior.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Lista de materiais

Células OKP foram gentilmente cedidas pelo Dr. Orson W. Moe (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, EUA). 3H3, anticorpo monoclonal para NHE3 de gambá (opossum), foi gentilmente cedido pelo Dr. Daniel Biemesderfer (Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, EUA). Anticorpo monoclonal para actina foi comprado da Calbiochem (San Diego, California, EUA), anticorpo para SP1 (Specificity Protein 1) e EGR1 (Early Growth Response 1) foram comprados da Abcam (Cambridge, Massachussets, EUA). O Anticorpo para ARNT (AHR nuclear translocator), H-172 foi comprado da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EUA). Os anticorpos secundários Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse, goat anti-rabbit e rabbit anti-goat, assim como os reagente para transfecção, Lipofectamine e Plus Reagent foram comprados da Life Technologies Corporation (Carlsbad, California, EUA). O kit QuikChange II XL foi comprado da Agilent Technologies (Foster City, California, EUA). Meios de cultura Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) com alta e baixa concentração de glicose, o meio de cultura Hams's F-12, o antibiótico penicilina/estreptomicina, a enzima SuperScript3 e o corante Sybr® Green foram obtidos da Life Technologies (Grand Island, New York, EUA). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, Missouri, EUA) a menos que seja especificado de outra maneira.

3.2 Cultura celular e ensaios de acidose metabólica e respiratória

Células Opossum Kidney clone P (OKP) eram cultivadas em meio D-MEM com alta concentração de glicose (high glucose) suplementado com 10% de soro bovino até o estado de confluência ótima para cada experimento. Em seguida, tinham o seu meio de cultura trocado para D-MEM low glucose 1:1 com nutriente Ham's F-12, pH 7,4 (meio para tornar células quiescentes) por 24 horas, para então iniciarmos as simulações de acidose. Para a acidose metabólica adicionávamos HCl ao meio D-MEM low glucose 1:1 com nutriente Ham's F-12 para pH final de 6,9 (grave) ou 7,1 (branda) e para a acidose respiratória incubávamos as células em um ambiente com 80 mmHg (branda) ou 160 mmHg (grave) de pCO₂, por 24

horas. Para a situação controle foi utilizado o mesmo meio da acidose respiratória, porém em ambiente com 40 mmHg de $p\text{CO}_2$.

O tamponamento dos meios foi feito de modo diferencial. O meio de acidose metabólica grave possui 15 mM de hepes e 16 mM de HCO_3^- , o meio da acidose metabólica branda 15 mM de hepes e 24 mM de HCO_3^- e o meio controle e das acidoses respiratórias possui 15 mM de hepes e 30 mM de HCO_3^- .

3.3 Westernblotting e Immunoblotting

Células OKP confluentes, cultivadas em placas de 15 mm, eram mantidas por 24 horas com meio D-MEM low glucose 1:1 com nutriente Ham's F-12 pH 7,40 e após, eram submetidas ou a situação controle, ou a acidose metabólica ou a acidose respiratória, por 24 horas. Após o tempo de incubação as proteínas eram extraídas com o tampão de lise que servira também como tampão de amostras para a eletroforese (Tris-HCl a 2,9 mM, pH 6,8; Glicerol a 20%, SDS a 2%, β -mercaptoetanol a 1,96% e azul de bromofenol a 0,01%). Cada grupo de três poços era reunido em uma única solução e cada uma destas era aplicada em um gel de duas fases, sendo a de cima de empilhamento (3% de acrilamida) e a de baixo de corrida (7,5%), o tampão de corrida utilizado na eletroforese era composto 192 mM de glicina, tris-base a 24,8 mM e SDS a 0,1% em pH 8,3. As amostras eram transferidas por eletrodifusão para uma membrana immobilon em PVDF em tampão 192 mM de glicina, 24,8 mM de Tris-base em metanol 10%, pH 8,3. Em seguida coradas com ponceau (0,1% em solução 10% de ácido acético).

Para o immunoblotting, primeiramente a membrana era incubada com solução de bloqueio composta por 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween 20 em phosphate buffered saline (PBS) por 5 vezes de 10 minutos. Em seguida era incubada de um dia para o outro com solução de bloqueio adicionada do anticorpo primário específico para proteína NHE3 (na diluição de 1:200 a 1:1000), ou SP1 (1:500), ou EGR1 (1:10000), ARNT (1:50) ou actina (1:10000). No dia seguinte a membrana era lavada 5 vezes por 10 minutos com a solução de bloqueio e incubada por uma hora com solução de bloqueio adicionada de anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina adequado para a ligação com o anticorpo primário. A membrana era lavada mais 5 vezes por 10 minutos com solução de bloqueio e depois lavada com PBS até que todo o leite fosse removido da membrana. Por fim, a

membrana era incubada com a solução do kit de revelação ECL (Amersham Biosciences) e exposta a filmes de raio-x com o intuito de detectar a quimiluminescência.

Caso fosse necessário utilizar a mesma membrana para mais de um immunoblotting, as membranas eram submetidas a uma solução que removia os anticorpos ligados a elas. Para uma remoção mais completa da marcação era utilizada uma solução de 2% de SDS, 6,25% de Tris HCl pH 6,8 e 0,8% de β -mercaptoetanol diluída em água. A membrana era incubada por 45 min a 50 °C e então lavada por uma hora em água destilada e por 5 min em PBS. Caso fosse necessária uma remoção mais leve, que diminuísse a chance de remoção de proteínas da membrana, era utilizada uma solução de 0,1% de SDS, 200 mM de glicina e 1% de Tween20 diluída em água, pH 2,2. A membrana era incubada por 5 a 10 minutos com esta solução e depois lavada duas vezes com PBS por 10 min e mais duas vezes com Tris-base saline (TBS) com Tween 20 adicionado a 0,05% por 5 min. Em ambos os modelos de remoção de anticorpos, as membranas eram pré-incubadas em metanol.

3.4 Biotinilação de proteínas de membrana celular

Células OKP confluentes, cultivadas em placas de cultura de células de 34,5 mm de diâmetro, eram mantidas por 24 horas com meio D-MEM low glucose 1:1 com nutriente Ham's F-12 pH 7,4 e após, eram submetidas ou a situação controle, ou a acidose metabólica ou a acidose respiratória, por 24 horas. Após o tempo de tratamento experimental as células eram colocadas imediatamente sobre gelo e o experimento até o seu final era realizado em temperaturas entre 1 e 4 °C .

O meio de cultura celular era substituído por uma solução que continha 0,1 mM CaCl₂ e 1 mM de MgCl₂ (PBS-Ca-Mg) por 5 minutos. A membrana celular era biotinilada com uma solução de biotinilação que continha 150 mM NaCl, 10 mM de trietanolamina, 2 mM CaCl₂ e 2 mg/ml de EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce), incubada duas vezes por 25 minutos cada. Em seguida a solução de biotinilação era trocado por PBS-Ca-Mg contendo glicina 100 mM e após, as células eram solubilizadas por 1 hora em tampão RIPA (150 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, pH 7,4) contendo inibidores de protease (0,7 μ g/ml pepstatina, 0,5 μ g/ml leupeptina e 40 μ g/ml de PMSF). As amostras eram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, e todo o sobrenadante era coletado; 20 μ L deste eram utilizados para quantificação total de proteínas por

immunoblotting e ao restante eram adicionados 100 μ L de estreptavidina. As amostras eram incubadas com estreptavidina até o dia seguinte e, em seguida, eram lavadas três vezes com o tampão RIPA (contendo os inibidores de protease), solubilizadas com solução de carregamento de eletroforese e aquecidas a 100 °C. Em seguida as amostras eram aplicadas em gel de poliacrilamida de duas fases (SDS-PAGE) e o western/imunoblotting era realizado.

3.5 Extração de RNAm de células OKP e PCR em tempo real

Células OKP foram cultivadas até a confluência em placas de 15,0 mm de diâmetro. Após o período de quiescência e tratamentos experimentais, o RNA era total extraído usando TRIzol Reagent de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, o RNA era purificado com o kit RNeasy Mini Kit, tratado com DNase livre de RNase (Qiagen, Hilden, Germany) e quantificado no espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), usando o comprimento de onda de 260-280 nm.

O DNA complementar (cDNA) foi produzido a partir de 2 μ g de RNA total, utilizando a enzima SuperScript3 e *primers* (iniciadores) oligo-dT. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR tempo real) foi executada no aparelho 7300 Real-Time PCR Systems (Life Technologies), com o software SDS 7300, pelo método com Sybr Green com o intuito de detectar o nível de fitas duplas amplificadas.

Os primers utilizados foram:

Nhe3 - sense: 5' CCA CGA GCT CAA CCT GAA GG 3'

anti-sense: 5' GAC TGA GGC TTC TAC AGT AGA TGG ACG 3'

β -Actina (controle endógeno) – sense: 5' GTG ATC ACC ATT GGC AAT GAG A 3'

anti-sense: 5' CGG TAT TGG CAT ACA AAT CCT T 3'

Os parâmetros utilizados para o PCR foram: 95° C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de: 95 °C por 15 s + 60 °C por 60 s. O Ct (threshold cycle) foi automaticamente determinado pelo software. A quantificação relativa de RNAm a partir da quantidade inicial de cDNA foi obtida pela equação de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁷⁶

3.6 Taxa de degradação do RNAm

Os experimentos de taxa de degradação foram realizados anteriormente ao período do doutoramento, mas para que eles possam ser analisados integralmente, um resumo dos procedimentos está descrito aqui. Células OKP foram cultivadas até a confluência em placas de 15,0 mm de diâmetro, submetidas ao período de quiescência e tratamentos experimentais por 24 horas e em seguida, as células eram tratadas com 5 µg/ml de actinomicina-D, um inibidor das RNA polimerases (Act D; Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA). As células tinham o seu RNA extraído 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h após a administração do fármaco. Durante este período as células eram mantidas expostas à condição ácido-base desejada. O RNAm do *Nhe3* era quantificado por transcrição reversa/PCR tempo real como descrito acima.

3.7 Transfecção em células OKP

As células que foram utilizadas para transfecção eram cultivadas em placa de cultura de células de 24 poços, onde eram mantidas até atingir 70-80% de confluência.

Após atingir esse estágio a transfecção era realizada. As células foram cotransfectadas com dois vetores: o vetor pGL3, que continha o gene repórter da Firefly luciferase comandado pela sequência de interesse do promotor do gene do *Nhe3*, e o vetor pRL-CMV (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), que continha o gene repórter da Renilla luciferase, comandado pelo promotor de citomegalovirus. A transfecção das células foi feita utilizando o reagente Lipofectamina. Inicialmente, era preparada uma mistura de 400 ng de pGL3 (adicionada da sequência do promotor do gene do *Nhe3*), 4 a 20 ng de pRL-CMV e 1 µL de Plus Reagent, que acompanha a lipofectamina no kit. A mistura era incubada por 15 minutos a temperatura ambiente para depois conjugá-la a uma solução composta de 1,5 µL de Lipofectamina e 25 µL de meio D-MEM com alta glicose sem soro e sem antibiótico. Cada tubo era vortexado e incubado por 45 minutos a temperatura ambiente. Durante esse tempo o meio da placa a ser transfectada era retirado e as células lavadas com PBS, para em seguida adicionar 200 µL do meio sem soro e sem antibiótico.

Após os 45 min de incubação da mistura de transfecção, 200 µL de meio de cultura eram adicionados em cada uma das misturas, vortexadas e colocadas nos respectivos poços da placa de cultura. A placa era levemente agitada e retornava para a estufa de cultura de células

por 4 horas. Após 4 horas, o meio de transfecção era retirado, as células eram lavadas com PBS e o meio DMEM Low-Glucose na proporção 1:1 com o nutriente Ham's F-12 era colocado para as células ficarem quiescentes por 24 horas. Após esse período, as condições de acidose metabólica ou respiratória eram iniciadas.

Passado o tempo de incubação da placa era necessário lisar as células e recolher as amostras para a leitura de luminescência. O meio era removido e as células lavadas com PBS, em seguida era adicionado às células 100 µL de Passive Lysis Buffer (Promega), que após meia hora sobre a cultura celular em agitação era retirado da placa e levado ao luminômetro (Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA).

Para obter os resultados da atividade do promotor foi utilizado o kit Dual luciferase reporter assay system (Promega). A medida de atividade da Firefly luciferase era feita com a adição da luciferina (substrato da Firefly luciferase). Após a leitura, a ação da Firefly luciferase era interrompida pelo reagente Stop and Glo, no qual já estava também o substrato da Renilla luciferase (coelenterazina). A atividade da Renilla luciferase era usada para normalizar os valores da atividade de Firefly luciferase para a eficiência de transfecção. Todo esse processo é feito automaticamente pelo luminômetro, usando o software KC4 v3.4 (Bio-Tek).

Os constructos que continham as sequências do promotor foram produzidos previamente no nosso laboratório^{14,60}. As sequências utilizadas foram: -2,094/+55, -888/+55, -471/+55 e -152/+55 sendo +1 o primeiro nucleotídeo do primeiro éxon.

A atividade promotora foi obtida seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade promotora} = \frac{\text{sinale do promotor do Nhe3 (Firefly luciferase)}}{\text{sinale do controle interno (Renilla luciferase)}} \quad \text{Equação (8)}$$

3.8 Busca por possíveis sítios para ligação de fatores de transcrição

Em colaboração com o Dr. Douglas Cancherini, iniciamos nossa investigação por meio de bioinformática com os dados do trabalho experimental já publicado de Nowik e colaboradores⁷⁷. No mesmo, foram usados camundongos nos quais foi induzida acidose metabólica por 2 dias (n=4) ou 7 dias (n=4) mediante a oferta de solução de cloreto de amônio e sacarose em substituição à água. Os camundongos controles receberam apenas solução de sacarose em substituição à água (n=4). Foi realizado o isolamento de RNA de rins inteiros, o

qual foi submetido à hibridização em matriz de ácido nucleico (Applied Biosystems Mouse Genome Survey Array). Os autores divulgaram listas de 2042 e 2118 genes hiperexpressos e hipoexpressos, respectivamente, nos animais expostos à acidose por 2 ou 7 dias. Partimos de tais listas, e fomos capazes de obter a sequência da região promotora, numa extensão total de 2000 pares de bases, para 1707 e 1774 genes hiperexpressos e hipoexpressos, respectivamente. Além disso, a região promotora de 16884 genes de camundongo que não aparecia em nenhuma das duas listas foi obtida e foi definida como representando uma lista de genes sem evidência de regulação por acidose. A seguir, foram procuradas regiões de ligação de fatores de transcrição nas regiões promotoras, usando as matrizes (Position-specific scoring matrices) disponíveis publicamente em duas fontes: a base Jaspar (versão de outubro de 2009) e a base Transfac (versão 7.0, de 2005). Usando critérios de corte moderadamente rigorosos, foram identificadas, respectiva e aproximadamente, 1,5, 1,6 e 15,8 milhões de possíveis regiões de ligação de fatores de transcrição, nos genes hiperexpressos, hipoexpressos e não afetados por acidose. A esse respeito, é importante notar que os métodos atualmente disponíveis para identificação de regiões de ligação para fatores de transcrição são caracterizados pela alta sensibilidade e baixa especificidade, sendo que esta última não é solucionada pelo uso de critérios de corte mais rigorosos. Por fim, procuramos por tipos de regiões de ligação que estivessem representadas acima do esperado na lista reunida de genes diferencialmente expressos, em comparação à lista de genes não afetados por acidose.

3.9 Busca por possíveis sítios para ligação de fatores de transcrição no promotor do gene do *Nhe3*

A busca por sequências consensuais para sítios para fatores de transcrição no promotor do *Nhe3* foi feita utilizando as sequências correspondentes a -2100 pb em relação ao sítio de início de transcrição e a sequência 5' UTR do gene de *Rattus norvegicus* (rato), *Homo sapiens* (humano) e *Monodelphis domestica* (gambá).

As análises com base nas sequências de rato foram primeiramente realizadas em fevereiro de 2010 utilizando o MatInspector Release profissional 8.01 (Genomatix) com corte de similaridade de 0,75. Esta versão utilizava a biblioteca de matrizes na sua versão 8.1. Posteriormente, em novembro de 2013 foram realizadas novas análises para as três espécies

com o MatInspector Release profissional 8.07 e biblioteca de matrizes 9.0, utilizando o mesmo corte de similaridade.

Portanto, os dados retirados das análises nos dois períodos podem conter pequenas discrepâncias (ver discussão).

3.10 Inserção de mutações no fragmento -466/+55

Mutações no fragmento -471/+55 foram feitas utilizando o kit QuikChange II XL. Foram realizadas substituições em três diferentes regiões deste fragmento: (Tabela 3) -417/-415; -257/-255; -246/-244 (Mut 1, 2 e 3 respectivamente). Foram inseridas mutações nas sequências centrais dos sítios consenso para os fatores de transcrição SP1/Ilhas GC, AHR-ARNT heterodimers, SP1/Ilhas GC, respectivamente. Os termos utilizados aqui e em diversas partes desta tese são os mesmos termos utilizados pelo MatInspector. Na tabela 3 estão detalhadas as posições e quais mutações foram feitas.

Os procedimentos experimentais para a obtenção dos constructos mutados foram realizados de acordo com o manual do fabricante. Brevemente, foram utilizados 20 ng do constructo -471/+55 em um PCR com primers que continham as substituições apontadas na tabela 3. O produto de PCR era tratado com a enzima de restrição DpnI que digeria apenas o plasmídeo parental (não mutado), pois esta enzima reconhece apenas sequências metiladas e hemimetiladas. Marcação esta, existente no plasmídeo parental, mas não na amplificada por PCR. Em seguida, 2 uL de um total de 50 uL do produto de PCR digerido era utilizado para transformação em bactérias XL gold competentes. Colônias crescidas em placas com ampicilina (100 mg/mL) eram coletadas e crescidas em 4 mL de meio líquido LB (Lysogeny Broth) também contendo ampicilina a 100 mg/ml e os plasmídeos eram isolados e purificados (miniprep) com o kit QIAprep (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) e em seguida sequenciados para que fosse verificado se as mutações ocorreram adequadamente e se não foram incorporadas mutações indesejadas.

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger, utilizando a sonda fluorescente BigDye (Big Dye® Terminator 3.1, Life Technologies). Caso o fragmento fosse confirmado por sequenciamento, as colônias que foram anteriormente utilizadas para inoculação em meio líquido eram agora inoculadas em 250 mL de LB líquido para que fosse realizada uma maxiprep. Após o isolamento e purificação dos plasmídeos, estes eram digeridos com enzimas de restrição que cortavam ou apenas o fragmento ou apenas o vetor e

em seguida eram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose com marcador de massa e peso molecular. Esta etapa permitia a quantificação do constructo, além de comprovar o êxito da etapa de isolamento e purificação.

Tabela 3 – Detalhes utilizados para mutação das sequências da região promotora sensível à acidose metabólica

	Posição no promotor	Sequência original	Sequência mutada	Sítios para fatores de transcrição
Mut 1	-417/-415	ggGGTgg	ggAAGgg	SP1 e EGR
Mut 2	-257/-255	caCTCga	caAGAgga	Heterodímeros de AHR-ARNT
Mut 3	-246/-244	ggGGAgg	ggATCgg	SP1

Os possíveis sítios para fatores de transcrição foram identificados com o software MatInspector. As letras em maiúsculo representam as regiões modificadas de parte das regiões centrais dos sítios consenso escolhidos como alvo para mutação.

3.11 Estatística

A taxa de decaimento do RNAm do *Nhe3* foi analisada pelo teste razão de verossimilhança (ou *deviance*) usando o ambiente de programação R⁷⁸. As curvas de regressão não lineares foram produzidas utilizando a média do nível do RNAm do *Nhe3* em cada tempo de extração do controle e dos grupos de acidose. Além das curvas obtidas para os grupos controle e de acidose, uma terceira curva foi obtida a partir dos dados do grupo controle e de acidose em conjunto (modelo de curva única). Pelo teste de razão de máxima verossimilhança foi testado se os dados do controle e dos tratamentos de acidose são mais bem descritos por um modelo de curva única (os dois grupos têm decaimento semelhantes) ou pelas duas curvas específicas de cada grupo (os dois grupos têm decaimentos diferentes). Os dados de densitometria do SP1 foram analisados por teste t de Student pareado e as variáveis ácido-base (pH, pCO₂ e [HCO₃⁻]) foram analisadas por ANOVA seguidos de teste post hoc de Tukey.

Os demais dados foram analisados por teste de t de Student não pareado. Os valores são expressos como média ± desvio padrão e os valores de p < 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios de acidose em células OKP

As variáveis pH, pCO₂ e [HCO₃⁻] dos meio de cultura foram avaliadas para identificar se as acidoses tinham sido executadas com êxito. O resumo dos valores obtidos nos experimentos em que as células foram utilizadas para a avaliação da abundância do RNAm, da proteína e da atividade do promotor do *Nhe3* estão contidos na tabela 3.

Tabela 4 – Variáveis ácido-base obtidas do meio de cultura celular ao final de 33 experimentos realizados em células OKP

	Controle	Acidose metabólica grave	Acidose metabólica branda	Acidose respiratória grave	Acidose respiratória branda
pH	7,40±0,04 - 0,04	6,92±0,11* - 0,09	7,08±0,07*# - 0,06	6,88±0,06*& -0,05	7,12 ± 0,05*#& -0,04
pCO ₂	32,42±4,21	34,42±5,08	33,50±1,24	139,0±2,94*#&	76.0 ± 4,95*#&\$
[HCO ₃ ⁻]	19,59±2,85	7,63±1,76*	10,98±2,30*	25,30±0,98*#&	22,50 ± 0,71*#&

Amostras entre 150-200 µL de meio eram coletadas e o pH e a pCO₂ eram medidos por potenciometria, utilizando eletrodos para pH e pCO₂ (Radiometer Copenhagen Abl5). A [HCO₃⁻] era calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch.

Valores são mostrados como média ± desvio padrão. * p<0,05 vs Controle. # p < 0,05 vs Acidose metabólica grave. & p<0,05 vs Acidose metabólica branda. \$ p<0,05 vs Acidose respiratória grave.

4.2 Proteínas NHE3 presentes na superfície celular

Com intuito de identificar se a acidose crônica produz modificações na abundância proteica do NHE3 presente na superfície celular, células OKP em estágio de confluência total foram submetidas por 24 horas ao meio de quiescência para em seguida serem submetidas à acidose metabólica ou à acidose respiratória por 24 horas. Após os ensaios de acidose, a marcação das proteínas da superfície da membrana celular era feita com biotina, a captação das proteínas era realizada por ligação à resina com estreptavidina e a quantificação feita por western/immunoblotting para NHE3. A acidose metabólica grave provocou aumento de 107,4± 13,8% na abundância proteica, e a acidose respiratória provocou um aumento de 36,2 ± 15,8% em relação ao controle. p < 0,05 (Figura 5).

A quantificação de NHE3 em proteínas totais, em condições de acidose metabólica e respiratória já tinha sido realizada em período prévio ao início do doutoramento, além de abordada por outros trabalhos⁶⁵. Porém, decidimos expandir o número amostral obtido anteriormente e para tanto realizamos alguns experimentos adicionais em células OKP submetidas à acidose metabólica e respiratória. Considerando apenas os experimentos realizados neste período, a acidose metabólica (n=3) provocou aumento de 34,5%, porém a acidose respiratória (n=9) não provocou modificações na abundância das proteínas-NHE3 totais. Somados aos dados anteriores, a acidose metabólica produziu um aumento de $51,1 \pm 8.7\%$ (n=12) e a acidose respiratória não provocou modificações (n=12) na quantidade de NHE3 total de células OKP.

Assim, o aumento na abundância da proteína-NHE3 total na acidose metabólica poderia estar relacionado ao aumento da produção ou redução da degradação desta proteína. Infelizmente não avaliamos a degradação proteica ou mudanças pós-traducionais, mas o aumento na quantidade da proteína poderia estar relacionada ao aumento da abundância do RNAm a ser traduzido.

Figura 5 – Efeitos de 24 h de acidose nos níveis proteicos de NHE3 presente na superfície celular

Quantidades equivalentes de proteínas obtidas de células, que tiveram a sua superfície biotinilada, foram utilizadas para eletroforese e imunoblotting. O anticorpo 3H3, específico para NHE3 de células OKP, detectou uma banda com aproximadamente 80 kDa, correspondente ao NHE3. Em alguns experimentos, uma banda de 181 kDa foi marcada. Essa banda muito provavelmente corresponde a um complexo proteico que inclui o NHE3⁷⁹. O gráfico de barras representa os valores de densitometria, obtidos através do programa ImageJ, das bandas de aproximadamente 80 kDa. Os dados estão mostrados como média $\pm$ desvio padrão para o controle (C), acidose metabólica (AM) e acidose respiratória (AR), * $p < 0,05$

4.3 RNAm na acidose metabólica branda e respiratória grave

Os dados de quantificação do RNAm do *Nhe3* na acidose metabólica grave e acidose respiratória branda já tinham sido obtidos em período prévio ao doutoramento e pareciam demonstrar que o RNAm estaria aumentado na acidose metabólica, mas não na acidose respiratória. Contudo, os pH extracelulares (pH_e) eram diferentes entres os dois tipos de acidose. Assim, foram realizados experimentos em que a acidose metabólica e a acidose respiratória tivessem pH_e semelhantes.

Células OKP submetidas à acidose metabólica branda e acidose respiratória grave tiveram o RNA total extraído para em seguida quantificarmos o RNAm do *Nhe3* por PCR em tempo real. Os níveis de RNAm do *Nhe3* aumentaram em $46,3\% \pm 10,7\%$ (n=9) na acidose metabólica branda, e não foram significativamente diferentes em relação ao controle na acidose respiratória grave (n=5) $p < 0,05^*$. Assim, não só foi possível observar que o RNAm do *Nhe3* está elevado na acidose metabólica, mas não na acidose respiratória, como foi possível identificar também que os padrões de expressão do RNAm do *Nhe3* nas acidoses metabólica e respiratória independem do valor de pH_o. O compilado de dados coletados antes e durante o período de doutoramento está presente na figura 6.

Deste modo, o RNAm poderia ter sua quantidade modificada na acidose metabólica tanto pela sua taxa de degradação como pela sua taxa de produção.

Figura 6 – Efeitos de 24 h de acidose na expressão do RNAm do *Nhe3*

Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real foi realizada para quantificação de *Nhe3* e *Actb* (β -actina, controle endógeno) a partir de RNA total extraído de células OKP. Acidose metabólica provocou aumentos nos níveis de RNAm independente do pH do meio de cultura. Acidose respiratória grave não provocou alteração e a acidose respiratória branda provocou uma leve diminuição. Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão e foram obtidos a partir da equação de $2^{\Delta\Delta Ct}$. * $p < 0,05$ C – controle; AMG – Acidose metabólica grave; AMB – Acidose metabólica branda; ARG – Acidose respiratória grave; ARB – Acidose respiratória branda.

4.4 Taxa de decaimento do RNAm do *Nhe3*

*Os dados da iniciação científica demonstraram aumento de $35,7\% \pm 8,3\%$ na acidose metabólica grave e queda de $18,4 \pm 4,1\%$ na acidose respiratória branda

Os experimentos de avaliação da degradação do RNAm do *Nhe3*, ou da taxa de decaimento, foram realizados previamente ao período de ingresso no doutoramento, porém no atual projeto os dados foram reanalisados o que permitiu uma visão diferente do evento testado. Já havia sido demonstrado que o RNAm e a atividade transcricional do *Nhe3* estavam aumentados na acidose metabólica e permaneciam inalterados na acidose respiratória. Desejava-se identificar se a taxa de degradação do RNAm do *Nhe3* também estava modificada nas acidoses metabólica e respiratória, portanto foram realizadas sucessivas extrações de RNA após inibição da atividade transcricional das RNA polimerases. Quantificações de RNAm do *Nhe3* foram realizadas por PCR em tempo real e foram obtidos os padrões observados na figura 7. Assim, foi definido o tempo em que metade da abundância de RNAm foi alcançada, o que foi chamado de meia vida do decaimento do RNAm do *Nhe3*. A estatística comparava as meias-vidas e executávamos um teste de significância frequentista.

Porém, ao retornar a estes dados recentemente, percebi que analisar os nossos dados baseados apenas no valor de meia vida poderia incorrer em grande perda de informação. Seria mais informativo utilizar uma estatística que comparasse a curva como um todo e que tivesse como premissa que a regressão não linear seria apenas um modelo para explicar os dados e não um fato. Afirmando isto porque ao utilizar a meia vida como estimador da taxa de decaimento, a regressão não linear utilizada não se torna um parâmetro testado, mas sim uma premissa.

Para isto utilizamos o teste de razão de verossimilhança (ou teste de *deviance*) que compara entre dois modelos competidores, para qual deles os dados amostrados são mais plausíveis. A maioria dos RNAm decaem de modo exponencial e os nossos dados aparentemente pareciam respeitar uma regressão de decaimento exponencial (R^2 superiores a 0,9). Deste modo utilizamos regressões exponenciais de uma fase e baseamos a estatística em dois modelos que são comparados:

- a) Controle e tratamento são iguais, portanto uma curva só de decaimento exponencial corresponde melhor aos dados (H_0).
- b) Controle e tratamento são diferentes, portanto existem duas curvas de decaimento exponencial que melhor descrevem controle e tratamento acidótico (H_1).

A hipótese nula foi feita a partir da soma dos dados do grupo controle e de acidose somados em um único conjunto. A partir disto, sua regressão exponencial de uma fase foi calculada e as equações que descrevem a regressão foram obtidas. Para a hipótese alternativa, o mesmo foi feito separadamente para os dados de controle e acidose. A partir das variáveis da

equação de decaimento exponencial (equação 9) foram calculados os log de verossimilhança para cada modelo e a partir destes valores foram calculados os valores de *deviance*. Como a probabilidade de distribuição do teste de *deviance* se aproxima a uma distribuição de χ^2 , foi possível obter valores de *p* que indicam o modelo mais plausível para explicar os dados. Os cálculos de deviance estão detalhados em material disponível no apêndice.

$$N_{(t)} = N_{(0)} e^{-\lambda t} \quad \text{Equação (9)}$$

Sendo $N_{(t)}$ a quantidade de RNAm no tempo *t*, $N_{(0)}$ a quantidade de RNAm no tempo zero ($t=0$) e λ (lambda) a constante de decaimento.

Portanto, tanto para a acidose metabólica como para a respiratória as curvas de H_1 não foram suficientes para identificar diferenças estatísticas entre os grupos comparados. Assim, ambas as acidoses não causam alterações na taxa de decaimento do RNAm do NHE3. É importante salientar que os modelos de decaimento exponencial de fase única são testados contra os dados obtidos experimentalmente, e não necessariamente estas regressões são os melhores padrões para explicar o que ocorre com o RNAm do NHE3 nas condições testadas. Com essa abordagem, os dados não são encaixados em modelos, mas os modelos é que são testados contra os dados.

Detalhes adicionais dos cálculos, linhas de programação utilizadas e demais informações ver apêndice “Taxa de decaimento do RNAm do *Nhe3*”

Assim, se o RNAm do NHE3 não estava aumentado por mudanças na taxa de degradação, provavelmente estaria pela taxa de produção.

Figura 7 – Curvas de decaimento do RNAm do *Nhe3* na acidose

Células OKP submetidas às condições controle, acidose metabólica e respiratória foram tratadas com actinomicina-D e tiveram o seu RNA total extraído após 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h (n=4 em cada tempo). O RNAm do *Nhe3* foi quantificado por transcrição reversa/ PCR em tempo real. A. Linha azul representa o grupo controle e a linha vermelha acidose metabólica. B. Linha azul representa o grupo controle e a linha vermelha a acidose respiratória.

4.5 Efeitos da acidose metabólica sobre o promotor do gene do *Nhe3*

A taxa de transcrição e a atividade promotora foram abordadas através de experimentos de transfecção, nos quais eram inseridos em células OKP vetores que continham o gene repórter da luciferase mais as sequências do promotor do gene do *Nhe3*.

Primeiramente, durante minha iniciação científica, foi analisada a atividade promotora do maior fragmento disponível no laboratório (-2094/+55) e do fragmento correspondente às posições de -152 a +55, que em experimentos realizados previamente pelo laboratório da Profa. Nancy, mostrou-se que era o mais ativo dentre os fragmentos disponíveis⁸⁰. Naqueles experimentos da iniciação, observou-se que a atividade promotora estava aumentada na acidose metabólica e inalterada na respiratória, o que corroborava com os dados de quantificação de RNAm do *Nhe3*. A atividade promotora do fragmento menor estava inalterada em ambos os tipos de acidose, o que era um resultado especialmente informativo para a condição de acidose metabólica, pois a atividade promotora deixa de ser responsiva a esta condição entre o fragmento maior e o menor. Isto indicava que provavelmente existem elementos *cis* fundamentais para a resposta a acidose metabólica entre as posições de -2094 a -153. Como esta região ainda era muito ampla para analisar os possíveis sítios para fatores de transcrição, foram utilizados fragmentos intermediários para experimentos de transfecção. Os fragmentos intermediários utilizados foram os de -888 a +55 e de -471 a +55. A acidose metabólica aumentou a atividade de ambos os fragmentos, portanto mesmo com a deleção da sequência de -2094 a -472 o promotor ainda é responsivo a acidose metabólica. Isto indica que a região entre -471 e -153 é fundamental para a atividade do *Nhe3* frente a este tipo de estresse ácido (Figura 8).

Figura 8 – Efeitos da acidose metabólica sobre o promotor do gene do *Nhe3*

Células OKP foram transfectadas com sequências do promotor correspondentes às posições -2094/+55, -888/+55, -471/+55 e -152/+55. A atividade do promotor foi calculada pela razão do sinal luminescente do promotor do *Nhe3* (Firefly luciferase) pelo sinal luminescente do controle de transfecção (Renilla luciferase), * $p < 0,05$.

4.6 Busca por possíveis sítios para ligação de fatores de transcrição

Em colaboração com o Dr. Douglas Cancherini, foi utilizada uma abordagem de bioinformática para tentar identificar sequências consenso para fatores de transcrição super-representadas entre os genes diferencialmente expressos na acidose metabólica. As análises de bioinformática identificaram cinco sequências super-representadas (Tabela 5). Para que uma sequência consenso fosse selecionada formulamos a hipótese nula:

A frequência de ocorrências da sequência consenso em promotores de genes regulados pela acidose é de 0 a 115% da frequência de ocorrências da sequência consenso em genes não regulados pela acidose.

A exigência de aumento mínimo de 15% foi utilizada com o objetivo de reduzir rejeições indevidas da hipótese nula, causadas por mínimas variações de ocorrência de sequências consenso para fatores de transcrição de representação ubíqua no genoma.

Tabela 5 - Fatores de transcrição identificados em genes regulados pela acidose e seus respectivos p-valores

Fator de transcrição	p-valor
TCF11:MafG heterodimers	0,048
Pax5	0,0012
ARNT	0,014
MIZF	0,039
SEF-1	0,037

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os nomes utilizados para cada fator de transcrição estão de acordo com os nomes apresentados pelas bases Jaspar ou Transfac.

4.7 Efeitos da acidose metabólica sobre fragmentos mutados da região sensível à acidose metabólica

A partir da sequência do promotor do gene do *Nhe3* depositado nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), a região de -471 a -153 do promotor do gene do *Nhe3* foi analisada com o software MatInspector (Genomatix) e foram identificadas 46 sequências consensuais para sítios para fatores de transcrição. Nesta região (Figura 9), destaco um possível sítio para *AHR-arnt heterodimers and AHR-related factors* (AHR-ARNT), dois possíveis sítios para *GC-Box factors SPI/GC* (SP1) e um possível sítio para *EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors (EGR1)**. O ARNT foi um dos fatores de transcrição identificados pela análise de bioinformática apresentada na seção anterior. Em um trabalho prévio do laboratório da Profa. Nancy os fatores de transcrição SP1 e EGR1 foram identificados como importantes para atividade promotora basal do *Nhe3* em sequências mais próximas ao sítio de início de transcrição⁸⁰.

* Os termos que aparecem antes dos parêntesis são os mesmos nomes retornados pelo MatInspector

Figura 9 – Região do promotor sensível à acidose metabólica.

C

-520

-470 CCGCGGATTC CAGGTTCTCA ATGGAGAGGG GCCTTGCTGA GTGTATATAA

SP1/GC EGR

-420 CGG**GGTG**GGG GTCGGGGGCG GTGCAGTGTA CCCTGTAAC AGCGAAACCA

-370 ACCGGCTGCT GAAGTGGCCA AGGCGGGAGA AGCAGGTCCC ACTTAACGGG

-320 TAGA GTCGAC AGCCGCATGC CTGGCCGCCG GGAAGAAAAC AACTGCCAGT

AHR-ARNT Sp1 /GC box

-270 GGGCTAGGTG CCACTCGACC TTGG**GGAG**GGA GCGACCCAGA GGACCTCGAA

-220 TCCACAGGTC TTAGCTGGTG GCTGAGGAGC CCGCAGCATC CAGAGAGCCA

-170 GGAATTCTAG GCTGGGGC

Região de -471 a -155 da sequência do promotor do gene do *Nhe3*. A análise com o software MatInspector encontrou duas sequências consenso para sítios de “GC-box factors SP1/GC” nas posições de -421 a -407 e -250 a -236 e um sítio para “EGR/nerve growth factor induced protein C & related factor” nas posições de -422 a -406. Nos termos entre aspas acima foram mantidos os nomes originais resultantes das pesquisas com o MatInspector. Sequências em negrito identificam as *core sequences* dos sítios para fatores de transcrição. As sequências sublinhadas identificam a sequência inteira reconhecida pelo software como sítio e as cores entre o fator de transcrição e a sequência são correspondentes. Na primeira sequência em negrito, os nucleotídeos TG em roxo fazem parte das *core sequences* dos sítios para SP1/GC box e EGR.

Deste modo, foram produzidos novos constructos correspondendo às posições de -471 a +55, porém com mutações em três diferentes regiões: uma em cada sítio consenso para SP1 e uma no sítio consenso para AHR-ARNT. Um dos sítios para EGR1 se sobrepõe a um dos sítios para SP1, portanto a mutação em SP1 deve também afetar o sítio para EGR1. A mutação visou afetar três pares de base da *core sequence* de SP1 e dois da *core sequence* de EGR1.

Cada constructo foi denominado de Mut1, Mut2 e Mut3, sendo Mut1 para SP1/EGR1, Mut2 para AHR-ARNT e Mut3 para SP1 (Tabela 3). Os três constructos foram transfectados em células OKP, e estas foram submetidas a acidose metabólica por 24 horas. Como controle foi utilizado o constructo -471/+55 não mutado. Os dados de atividade promotora foram obtidos como descritos anteriormente para as outras regiões do promotor do gene do *Nhe3*. Os três constructos mutados foram irresponsivos ao estresse ácido (Figura 10).

Figura 10 – Efeitos da acidose metabólica sobre a região sensível à acidose metabólica do promotor do gene do *Nhe3* contendo mutações em três diferentes pontos

Células OKP foram transfectadas com sequências do promotor correspondentes a -471/+55 com mutações em possíveis sítios para SP1 (Mut1 e Mut3) e para heterodímeros de ARNT (Mut2). A atividade do promotor foi calculada pela razão do sinal luminescente do promotor do *Nhe3* (Firefly luciferase) pelo sinal luminescente do controle de transfecção (Renilla luciferase). Os valores estão normalizados constructo a constructo pelo nível luminescente das células submetidas a acidose metabólica pelas células submetidas ao meio controle. O número de amostras para mut 1, 2 e 3 foi de 9 e para o fragmento não mutado de 19. Cada grupo de acidose metabólica e controle foi comparado constructo a constructo por teste-t. Não foi feita comparação estatística entre os grupos. $P < 0,05$.

4.8 Efeitos da acidose metabólica sobre a abundância dos fatores de transcrição

A partir dos dados levantados na seção anterior, foi formulada a hipótese de que os fatores de transcrição SP1, EGR1 e ARNT teriam a sua expressão modificada na acidose metabólica.

Para testar esta hipótese, células OKP foram submetidas a acidose metabólica por períodos de 30, 60, 180 e 360 min para em seguida extrair as proteínas totais e submetê-las a

eletroforese e imunoblotting para SP1, EGR1 e ARNT. Os períodos testados foram inferiores ao período de 24 horas utilizado nos demais experimentos, pois se espera que o aumento da expressão de um fator de transcrição necessário para a transcrição de um outro gene deva ocorrer previamente ao aumento da produção desta.

Os imunoblotting para proteína SP1 (Figura 11) demonstraram que aparentemente houve uma tendência de aumento na quantidade de proteína a partir de 60 min de tratamento com acidose metabólica, que foi significativa a partir de 360 min de tratamento ($28,7 \pm 17,2\%$, $p < 0,05$).

Figura 11 – Efeito da acidose metabólica sobre os níveis proteicos de SP1

Proteínas totais de células OKP submetidas à acidose metabólica por 30, 60, 180 e 360 minutos foram utilizadas para eletroforese e imunoblotting para SP1. O gráfico de barras representa os valores de densitometria das bandas obtidos através do programa ImageJ. Grupos controles e de acidose metabólica foram comparados entre si tempo-a-tempo por teste-t pareado. Não houve comparação estatística entre os diferentes tempos. Os dados estão mostrados como média $\pm$ desvio padrão, * $p < 0,05$.

Infelizmente, as tentativas de quantificar a proteína EGR1 foram frustradas pela alta inespecificidade dos anticorpos testados (Abcam e Santa Cruz Biotechnology) nos immunoblotting. ARNT pôde ser quantificado, mas o anticorpo demonstrou possuir baixa sensibilidade em relação ao ARNT de OKP. Foi necessário aumentar as quantidades de anticorpo primário, utilizar reagente quimioluminescentes mais sensíveis e aumentar o tempo de exposição dos filmes fotográficos às membranas. Isto gerou uma série de filmes ora com baixo sinal da banda no tamanho esperado ora com alto sinal de fundo, dificultando a mensuração proteica. Até o final desta tese foram considerados aptos para quantificação apenas dois experimentos com células OKP submetidas a uma hora de acidose e um experimento de 6 horas de acidose. Esses dados indicam um aumento não significativo na quantidade de proteínas ARNT de 26,2% na acidose metabólica com uma hora de tratamento e um aumento de 61,0% de ARNT no tratamento de 6 horas (apêndice, figuras A.6a e A.6b). Contudo, estes dados ainda são insuficientes para demonstrar um aumento da quantidade de ARNT na acidose metabólica e experimentos adicionais são necessários para demonstrar a presença de tal regulação.

5 DISCUSSÃO

5.1 Acidose metabólica e respiratória causam diferentes efeitos sobre o *Nhe3*

As acidoses metabólicas e respiratórias puras são dois processos patofisiológicos que produzem em comum a queda do pH plasmático. Porém, outras variáveis físico-químicas, tais como a concentração de bicarbonato ($[\text{HCO}_3^-]$) e a pressão parcial de CO_2 (pCO_2) são absolutamente distintas entre os dois tipos de acidose. A acidose metabólica pura está associada a $[\text{HCO}_3^-]$ baixa e pCO_2 normal ou baixa. A acidose respiratória pura está associada a pCO_2 alta e $[\text{HCO}_3^-]$ normal ou alta. Tendo em vista que as células renais do túbulo proximal estão em contato, do lado basolateral com o plasma, e do lado luminal com um ultrafiltrado muito semelhante ao plasma sanguíneo, elas enfrentam na acidose metabólica e respiratória condições distintas do ponto de vista físico-químico. Este cenário possibilita que as células do túbulo proximal se comportem de modo diferencial às duas condições de pH plasmático reduzido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise comparativa dos efeitos causados pelos dois tipos de acidose nas células do túbulo proximal, mais especificamente nas células OKP, uma linhagem obtida dos túbulos proximais de *Didelphis virginiana*, um gambá. Com o intuito de analisar esta comparação, foi escolhido como objeto de estudo o NHE3, proteína responsável por cerca de metade da reabsorção do bicarbonato filtrado pelos nefros e, portanto, uma proteína muito relevante para o balanço ácido-base do organismo. Um aspecto que deve ser ressaltado em relação às células OKP é que dentre os trocadores Na^+/H^+ , elas apenas expressam o NHE3.

Os resultados obtidos sugerem que as acidoses metabólicas e respiratórias de fato regulam de modo diferencial o NHE3. Ambas provocam aumento do NHE3 na superfície celular, porém a acidose metabólica causa modificações mais complexas na célula, tais como aumentos da taxa de transcrição do transportador. O aumento da taxa de transcrição pode ser devido ao aumento da expressão e ligação de SP1 e ARNT à região de -471 a -153 pb do promotor do gene do *Nhe3*, local fundamental para a resposta do promotor à acidose metabólica. Mutações em elementos consensuais para ligação destes fatores de transcrição causaram inibição da atividade promotora do *Nhe3* frente à acidose metabólica. Porém, a acidose respiratória causou apenas modificações no tráfego do transportador entre a membrana apical e demais compartimentos (base do microvilo ou vesículas intracelulares).

Portanto, este trabalho avança nas discussões de como as células do túbulo proximal reagem diferencialmente às duas condições de queda de pH do meio.

5.2 Propriedades físico-químicas determinantes para o tráfego do NHE3

A presença do NHE3 na membrana apical é uma condição necessária à atividade de reabsorção do bicarbonato executada indiretamente por esta proteína nos túbulos proximais. Afinal, ela só pode desenvolver uma atividade de transporte entre lúmen e célula se estiver na interface entre os dois ambientes. A relação entre a expressão de um determinado transportador e sua presença na membrana plasmática não são necessariamente diretas. O presente trabalho identificou aumento da presença do NHE3 na superfície das membranas celulares nas condições de acidose metabólica e respiratória, porém só houve aumento da expressão do NHE3 total em lisados de células submetidas à acidose metabólica.

Ao compararmos dois modelos de acidose, somos colocados frente à questão de qual seria a variável físico-química responsável pelos efeitos observados sobre o NHE3. A variável comum entre as duas condições é o pH baixo do meio de cultura, o que em uma primeira análise sugere que o pH extracelular (pH_o) reduzido poderia ser a variável responsável pelo aumento da presença do NHE3 na membrana, seja por aumento da exocitose ou pela queda da endocitose. Além do pH_o há a possibilidade de que o pH intracelular (pH_i) seja a variável responsável. Para isto seria necessário que o pH_i acompanhasse a queda do pH_o nas condições de acidose sustentada por 24 horas. Além destas duas possibilidades, nada exclui hipóteses mais complexas como baixo bicarbonato e alto pCO_2 , independentemente, sinalizarem para modulações no tráfego do NHE3.

Uma abordagem adequada para a identificação da(s) variáveis(s) físico-química(s) importantes para cada situação necessitaria que fossem criadas hipóteses que delimitassem os efeitos do pH, HCO_3^- e pCO_2 sobre os diversos mecanismos de regulação do NHE3. Contudo, alterações em qualquer uma destas variáveis afetam as demais, tornando a análise e o desenho experimental de difícil execução. Infelizmente as estratégias metodológicas utilizadas nesta tese não permitiram isolar uma única variável ou conjunto de variáveis que impactem de modo significativo a regulação transcricional ou a abundância do NHE3. Restando-nos apenas a possibilidade de deduções baseadas em dados coletados experimentalmente durante o meu doutorado somados aos dados presentes na literatura no intuito de se apontar uma ou mais variáveis essenciais para tal regulação. Não considero este processo o mais adequado, mas há

a dificuldade intrínseca aos experimentos em que são analisadas as variáveis ácido-base que é controlar e modificar as variáveis físico-químicas de modo independente. Dentre pH, bicarbonato e $p\text{CO}_2$ o ideal seria manter constantes duas delas e apenas variar uma, porém as abordagens atuais para este problema são de difícil execução e voltadas para tratamentos agudos, como segundos, minutos ou poucas horas⁸¹. Outra possibilidade seria utilizar análises mais sofisticadas que prevêm a interação entre as variáveis como as análises por modelos mistos (global linear mixed models).

De qualquer modo, as hipóteses listadas anteriormente são todas plausíveis e já foram descritos sensores para pH, bicarbonato e $p\text{CO}_2$ em diferentes organismos. Abaixo há uma breve revisão dos sensores presentes em rins de mamíferos, para os quais existem evidências de expressão em túbulos proximais.

Sensores de pH_o :

Receptores acoplados à proteína G que são ativados pela queda do pH_o foram descritos recentemente: ovarian cancer G-protein coupled receptor 1 (OGR1 ou GPR68), G-protein coupled receptor 4 (GPR4) e T-cell death associated gene 8 (TDAG8 ou GPR65)⁸²⁻⁸⁴. Em experimentos de northern blot utilizando RNA de rins de camundongo, não foi detectada a presença do RNAm do TDAG8⁸⁵. O transcrito de OGR1 em rins de camundongos também não foi detectado em quantificações por RT-PCR⁸⁶. Em rins de humanos o nível detectado de expressão de OGR1 foi considerado baixo⁸⁷. Contudo, mais recentemente Mohebbi e colaboradores detectaram o RNAm de OGR1 em camundongos. Além disso, demonstraram a sua importância para a sensibilidade do NHE3 e da H^+ -ATPase à acidificação do meio tanto em células HEK293 transfectadas com OGR1, como em túbulos proximais de camundongos⁸⁸.

Camundongos nocaute para GPR4 mostram queda na capacidade de excretar ácidos. Em rins de camundongos selvagens a expressão de GPR4 foi demonstrada ser baixa em túbulos proximais e alta em dutos coletores⁸⁹. A sinalização intracelular decorrente da ativação de GPR4 ainda não está completamente elucidada, mas já se sabe que ela resulta em aumento da produção de AMPc ou de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol. A exocitose do NHE3 está associada à ligação do NHE3 ao IRBIT (IP_3 receptor binding protein), uma proteína que compete com o IP_3 pelo receptor de IP_3 (IP_3R)⁴⁶. Portanto, poderíamos imaginar que uma maior liberação de IP_3 via GPR4 poderia liberar IRBIT de IP_3R e com isso aumentar a sua quantidade livre. Com maior quantidade de IRBIT livre, a probabilidade de ligação com

o NHE3 estaria aumentada, e sendo a ligação de IRBIT com NHE3 estimulatória para a exocitose do transportador, poderíamos imaginar que o IP_3 teria uma ação estimulatória e portanto sinérgica àquela esperada por uma ativação de GPR4. Contudo, o AMPc via PKA possui efeito inibitório sobre o NHE3⁹⁰. Esta relação antagônica entre as vias do GPR4 poderia indicar um ajuste fino da regulação do NHE3, no qual dependendo de outros fatores, como proteínas que interagem com o NHE3 ou demais metabólitos, a via excitatória ou inibitória poderia ser predominante. Um exemplo próximo que ilustra esta situação são os efeitos do Ca^{2+} sobre o NHE3. Em células com baixa ou nenhuma expressão de IRBIT e com expressão de NHERF2, cálcio exerce um efeito inibitório sobre o transportador. Em células que expressam significativamente ambas as proteínas, o cálcio exerce efeito estimulatório⁴⁶.

Ainda não se sabe se de fato ocorre a interação entre todos estes componentes da via de ativação do GPR4 com o NHE3 e a baixa expressão do transcrito de GPR4 nos túbulos proximais indica que possivelmente o seu papel nos rins esteja mais restrito ao duto coletor e talvez ao segmento espesso da alça de Henle⁸⁹. Portanto, não existem evidências que sustentem a sua ação como sensor de pH_o no túbulo proximal.

Sensores para pH_i :

PYK2, uma proteína que se autofosforila, é estimulada pela acidificação intracelular induzida tanto por ácidos fixos como por hipercapnia^{91,92}. A sua ligação com a cinase SRC (mais conhecida como cSrc) é necessária para que ocorra a ativação de NHE3 pela acidose⁹¹. Um dado curioso é que camundongos nocaute para OGR1 possuem expressão aumentada de PYK2⁸⁸. Os autores deste trabalho argumentam que PYK2 poderia compensar a ausência de OGR1. De interesse direto para esta tese, caso o pH_i esteja baixo nas duas acidoses, em períodos crônicos, é possível que PYK2 possa ser um sensor importante para a exocitose/endocitose do NHE3. Discutirei mais a frente sobre a possibilidade do pH_i estar baixo em acidoses crônicas.

Sensores para HCO_3^- e pCO_2 :

Existe uma série de receptores descritos para PCO_2 e bicarbonato na natureza e alguns já identificados em rins. Um dos que considero mais profícuos é o receptor proteína fosfatase de tirosina (RPTPy) descrito em membranas basais (mas não laterais) de túbulos proximais de ratos⁸⁴. Camundongos nocaute para RPTPy perdem a capacidade de mudar a taxa de

reabsorção de bicarbonato pelo túbulo proximal frente às diferentes condições de $[\text{HCO}_3^-]$ e pCO_2 impostas⁸⁴.

Além da RPTPy, como candidato a receptor, há duas enzimas em vertebrados que são responsivas a mudanças fisiológicas na $[\text{HCO}_3^-]$: a adenilato ciclase solúvel (sAC, na sigla em inglês), que catalisa a formação do AMPc a partir do trifosfato de adenosina (ATP), e a guanilato ciclase-D (GC-D), que catalisa a formação de GMPc a partir de trifosfato de guanosina (GTP). Em mamíferos, a metade do efeito máximo (EC_{50}) varia entre 10 e 25 mM de HCO_3^- ^{93,94}. Apesar de os valores de EC_{50} variarem consideravelmente entre os trabalhos citados, na acidose metabólica, a concentração intracelular de HCO_3^- pode atingir valores abaixo do menor EC_{50} reportado (10 mM), o que provocaria inibição desta enzima. Nos experimentos de acidose metabólica grave, a $[\text{HCO}_3^-]$ extracelular foi sempre inferior a 10 mM. Na condição branda, em torno de 13 mM. Nas acidoses respiratórias os valores estiveram mais próximos ao valores superiores registrados para o EC_{50} . O papel da sAC como sensor ácido-base na regulação da H^+ -ATPase já está bem estabelecido no duto coletor e no epidídimo, contudo sua atuação no túbulo proximal e especialmente em relação ao NHE3 ainda não foi estudada. Posto que o AMPc é um inibidor da atividade do NHE3, poderia-se especular que a inibição da sAC seria responsável por estimulá-lo em condições de acidose metabólica, por resultar em redução nos níveis intracelulares de AMPc.

Uma dificuldade intrínseca em se nomear uma proteína como o principal sensor ácido-base dos rins ou de um segmento do rim é que em menor ou maior grau praticamente qualquer proteína é sensível ao pH. Para que uma proteína possa ser caracterizada como sensor, é necessário que possua uma série de características tais como: disparar uma sinalização intracelular decorrente da mudança de pH, ser sensível a mudanças de pH dentro de níveis fisiológicos e ser sensível a pequenas mudanças destes valores. Além destas especificidades, no que concerne a este trabalho, há ainda a necessidade de que seja capaz de transmitir informações para mudanças na atividade de transportadores ligados ao balanço ácido-base, especialmente o NHE3, ao perceber variações no pH. Porém, concordo com o trabalho “Molecular Mechanisms of Acid-Base Sensing by the Kidney” de D. Brown e C. Wagner⁸³, que diz que provavelmente não existe um sensor principal, mas sim uma rede de sensores que são responsáveis pela fina regulação deste balanço.

Portanto, os dados apresentados nesta tese indicam que ambas as acidoses provocam o aumento da presença do NHE3 na superfície celular. Como em túbulos proximais o NHE3 é apenas expresso na membrana apical, é possível afirmar que provavelmente ambas as

acidoses aumentam a expressão do NHE3 nesta face da célula. O aumento da exocitose do NHE3 pela acidose metabólica já tinha sido verificada por Yang e colaboradores⁶⁵ que identificaram valores de aumento próximos aos desta tese (107,4% neste trabalho em comparação com 126% de Yang et al.). O único trabalho que avaliou o efeito do CO₂ sobre o tráfego do NHE3 em epitélios foi feito por Charney e colaboradores em células de intestino, no qual a hipercapnia aumentou a presença do NHE3 na membrana e a hipocapnia a diminuiu⁹⁵. Porém, esta é a primeira vez em que foi observado o aumento do NHE3 na superfície de células renais, mais especificamente nos túbulos proximais. Estes dados corroboram com a questão de que a acidose respiratória pode aumentar a reabsorção de bicarbonato em túbulos proximais, e esse efeito se deve, ao menos em parte, ao aumento da atividade de troca de Na⁺ por H⁺.

Como já brevemente abordado na introdução, existem trabalhos conflitantes a este respeito na literatura. Ao final dos anos 1980 e início dos 90, uma série de trabalhos foram publicados sobre os efeitos da hipercapnia sobre a atividade Na⁺/H⁺ em túbulos proximais^{58,71-75,96,97}. Naquela época, alguns trabalhos concluíram que a presença ou ausência de aumento da atividade Na⁺/H⁺ na acidose respiratória dependeria de qual espécie estava sendo utilizada no estudo, ou em outras palavras, a acidose respiratória aumentaria esta atividade em coelhos, mas não em ratos. Isto faria ainda mais sentido se fosse levado em conta que coelhos e ratos possuem dietas diferentes e exposição média diferente a alimentos acidogênicos. Porém, caso todos estes trabalhos sejam analisados, as diferenças entre os resultados obtidos podem estar relacionadas aos métodos utilizados em vez da espécie estudada.

Nos cinco trabalhos citados em que foram utilizados exclusivamente rins provenientes de coelhos, foi detectado aumento na atividade Na⁺/H⁺ (isto é, Horie et al., 1990; Talor et al., 1987; Pahlavan et al., 1993; Krapf et al., 1989; Ruiz et al., 1989)^{58,72,73,96,97}. Nesses experimentos foram utilizados células em cultura primária, túbulos proximais isolados e vesículas de membranas de bordo em escova de túbulos proximais (usarei a partir daqui a sigla em inglês, BBMV – “brush border membrane vesicles”). A atividade do trocador foi medida em células expostas a alta pCO₂ em períodos de poucas horas a até 56 horas. No estudo de Zeidel e colaboradores⁷¹, no qual foram utilizadas BBMV provenientes tanto de ratos como de coelhos expostos a hipercapnia por 8 a 10 dias, não foi detectado aumento da atividade Na⁺/H⁺ em BBMV desses animais. Estes dados contradizem aqueles dos demais artigos que utilizaram coelhos, mas os períodos de tratamentos são bem distintos. Zeidel e colaboradores criticaram a qualidade do preparo das BBMV utilizadas por Talor e

colaboradores para justificar essas diferenças ou que as BBMV de animais submetidos à acidose respiratória, de seus próprios experimentos, seriam menos sensíveis que os animais controle aos efeitos deletérios da preparação de BBMV. Não é explicado no trabalho de Zeidel et al. porque eles considerariam que BBMV de animais expostos a acidose respiratória seriam menos sensíveis a tais efeitos deletérios. Em outro trabalho realizado com ratos, de Northrup e colaboradores, foram utilizados períodos de hipercapnia próximos aos trabalhos em coelhos (48 horas). Este trabalho também não demonstrou aumento da atividade do permutador Na^+/H^+ em decorrência de hipercapnia. Em resumo, os cinco trabalhos que realizaram experimentos exclusivamente em coelhos, utilizaram material biológico em três níveis de organização (BBMV, cultura celular e túbulo isolado) e concordam entre si, assim como os dois trabalhos realizados em ratos, porém um deles não reproduziu os dados observados em coelhos pelos demais laboratórios. Portanto, estes dados em conjunto possuem contradições, especialmente se levarmos em consideração o trabalho de Zeidel e colaboradores contra os demais trabalhos em coelhos. Existem diversas interpretações para esta situação, mas citarei as que eu considero mais plausíveis: 1) experimentos em coelhos possuem dados bem estabelecidos e os dados dos ratos, por terem sido analisados em apenas um nível de experimentação, precisariam de confirmação (por exemplo, experimentos em ratos foram imprecisos ou insuficientes). 2) as espécies respondem de modos diferentes a hipercapnia. Ambas as hipóteses me parecem verossímeis, mas apenas trabalhos adicionais poderiam responder a estas questões.

A separação de BBMV é um importante instrumento para medir a atividade Na^+/H^+ , contudo, como as vesículas são formadas apenas a partir de microvilos, é possível que elas não contenham alguns elementos regulatórios essenciais para a modulação do NHE3, ou que possuam uma rede de interações proteicas estabelecida de modo diferente daquela observada na célula inteira ou no animal. Há um trabalho de Crajoinas e colaboradores que exemplifica esta questão⁹⁸. Nesse trabalho, eles avaliaram o efeito do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP1) sobre a atividade Na^+/H^+ pelas técnicas de microperfusão tubular “in vivo” e de captação de $^{22}\text{Na}^+$ em BBMV. Eles observaram que houve inibição da atividade do NHE3 quando usaram a técnica de microperfusão, porém não foram observadas diferenças em experimentos com BBMV. Anteriormente, já havia evidências diretas e indiretas que demonstravam a inibição do NHE3 pelo GLP1⁹⁹. Obviamente, não se trata de negar a utilidade da técnica de BBMV, porém esta tem aplicações precisas e os resultados referentes a efeitos modulatórios observados nessas estruturas deveriam ser confirmados por outras

técnicas sempre que possível. Além disso, há um trabalho de Aires e Malnic que demonstrou através de microperfusão aumento de acidificação tubular e reabsorção de bicarbonato em ratos aguda e sistemicamente submetidos à hipercapnia (de minutos a horas)¹⁰⁰. De qualquer modo, é possível que ratos possuam uma resposta padrão frente a acidose respiratória e que células de coelhos possuam outra, apenas gostaria de enfatizar a necessidade de que estes experimentos abandonados no meio da década de 1990 sejam retomados para que de fato possamos compreender o que acontece nas células do túbulo proximal em condições de acidose respiratória.

Caso os mecanismos de modulação sejam específicos para as diferentes espécies, isto desprestigia o trabalho? Eu não considero que desprestigue por dois motivos: 1) As ciências biomédicas, área na qual este projeto está inserido, buscam o avanço no entendimento do funcionamento da biologia do corpo humano, apesar disso, utilizamos modelos que podem ou não mimetizar as condições existentes na nossa espécie. Se há uma diferença entre as espécies estudadas, seria ideal identificar para que lado pende a regulação ácido-base de humanos. Afinal, somos mais parecidos com quem? 2) o conhecimento da fisiologia comparativa nunca é inútil, sempre é possível retirar informações das diferenças entre as espécies. De acordo com a afirmação “1”, se o objetivo é avançar no conhecimento biomédico, caso o efeito observado não seja “espécie-específico”, há uma grande chance de que os humanos tenham um comportamento similar aos observados no presente trabalho. Caso seja uma questão específica, compreender o que pode levar a estas diferenças nos permite entender como funcionam os rins humanos. Podemos partir de diferenças fenotípicas entre as espécies e tentar desvendar que diferenças genéticas ou de interações proteicas são responsáveis por tais padrões. Para lidar com estas questões, as possibilidades experimentais são inúmeras e o potencial terapêutico pela engenharia genética se baseará no futuro, dentre outras abordagens, neste tipo de estudo. Será que seria possível, por exemplo, tornar rins humanos irresponsivos para aumento da atividade de troca Na^+/H^+ em rins responsivos, a partir de informações retiradas de outras espécies? Ou modificar rins de futuros hipertensos para que tenham uma leve redução da atividade do NHE3 e, quem sabe, assim prevenir a gênese desta patologia? Seriam essas abordagens não só viáveis como desejáveis? Estas afirmações são apenas especulações, mas refletem as possibilidades inúmeras de obter dados de pesquisa básica comparativa que podem contribuir com ações terapêuticas na área do balanço ácido-base e fisiologia renal. Infelizmente não pude verificar experimentalmente os efeitos da acidose

respiratória sobre a atividade do NHE3 em células OKP, o que permitiria que conclusões fossem retiradas dentro do modelo utilizado nesta tese.

5.3 Variáveis físico-químicas determinantes para a expressão do NHE3

Os dados de quantificação de proteínas biotinizadas apresentados demonstram que ambos os tipos de acidoses aumentam a presença do NHE3 na membrana, algo que não ocorreu quando foi analisada a expressão da proteína NHE3 em lisados totais de células OKP. Mais do que isso, acidoses metabólicas com níveis de acidificação mais graves (6,90) ou brandos (7,19) foram capazes de aumentar os níveis de RNAm do *Nhe3*, mas as acidoses respiratórias não modificaram os níveis de expressão do RNAm do *Nhe3* tanto em estresses ácidos graves (6,88) como brandos (7,13). Estes resultados indicam tanto que o pH extracelular não é a variável fundamental para que a expressão do *Nhe3* seja alterada em células OKP, como também mostra que os diferentes níveis de acidificação não produziram resultados diferentes quando comparamos os dois grupos de acidose metabólica entre si. A resposta celular a acidose respiratória branda ou grave também não diferiu entre essas duas condições, embora tenha ocorrido leve redução nos níveis de RNAm na forma branda. Esta diminuição foi reproduzida no tempo 0 dos experimentos feitos para determinar a taxa de decaimento do RNAm, e também foram detectadas discretas diminuições nos níveis proteicos de NHE3 na acidose respiratória branda, mas que nunca foram significativas. Não tenho uma hipótese clara que explique o motivo pelo qual o NHE3 é levemente inibido nas condições de hipercapnia branda. Duas especulações possíveis seriam um leve efeito tóxico do CO₂ ou um leve efeito inibitório relacionado ao pequeno aumento da concentração de bicarbonato.

Os resultados que demonstraram que o pH_o não seria um fator fundamental para a indução de aumento da expressão do NHE3 é algo que, fora de contexto, poderia ser considerado surpreendente e controverso. Afinal, a variável diagnóstico para uma acidemia ser identificada é a queda do pH. Contudo, como já discutido anteriormente, existe uma série de sensores para pH, HCO₃⁻ e pCO₂ com diferentes importâncias em diferentes locais do organismo, mas qual ou quais são as variáveis sentidas pelas células no que tange à regulação do NHE3 não está claro. Boron e colaboradores defendem que o pH não é a variável detectada pelas células do túbulo proximal, pelo menos no que concerne à reabsorção de HCO₃⁻ e em períodos de tratamento agudo⁸⁴. Li e colaboradores, bem como Preisig, defendem que o pH_i é um fator fundamental para a ativação do NHE3, através da ativação do sensor PYK2^{91,101}.

Em relação a este trabalho, por qual dessas vias a expressão do NHE3 estaria sendo ativada em células OKP? Sabemos que o pH extracelular não é um fator, assim como a $p\text{CO}_2$, já que está é igual nas células controle e na acidose metabólica e, portanto, dificilmente seria esta a variável responsável pela regulação da expressão. Devido à grande difusibilidade do CO_2 pelas membranas do túbulo proximal, seja através da bicamada lipídica ou pelas aquaporinas⁸⁴, provavelmente a $p\text{CO}_2$ intracelular é muito semelhante à $p\text{CO}_2$ extracelular e também não deve ser uma variável fundamental para a questão. Assim nos restam três opções: pH_i , HCO_3^- intracelular ou HCO_3^- extracelular. Estas opções são exatamente as debatidas por Boron e colaboradores e por Preisig e Li e colaboradores. Analisemos uma a uma.

Opção um, pH_i : para que o pH_i não seja uma variável determinante para a hiperexpressão de NHE3 nos experimentos realizados neste trabalho bastaria admitir que o pH_i estivesse inalterado ou diminuído de modos similares na acidose metabólica e respiratória, pois, embora possível, é pouco provável que uma variável igual nas duas condições possa causar diferentes efeitos. Atualmente, parece haver consenso a respeito da queda do pH_i nas acidoses metabólicas e respiratórias agudas^{58,102-104}. Contudo, desconheço qualquer trabalho que mostre conjuntamente que o pH_i se mantém baixo em acidoses metabólicas e respiratórias sustentadas por pelo menos 24 horas. Porém, há um trabalho em células em cultura que mostra que o pH_i está diminuído nos dois tipos de acidose em tratamentos agudos, mas está normal em tratamentos de 48 horas⁵⁸.

Em contraposição, existe um trabalho realizado em rins totais de ratos que mostrou que a acidose metabólica mantém baixo o pH_i em condições crônicas, porém, na acidose respiratória o pH_i seria recuperado a despeito do baixo pH_o ¹⁰². Em cultura primária de túbulos proximais de coelhos foi observado que a acidose metabólica manteve o pH_i baixo em períodos de 2 e 24 horas¹⁰³. Qual cenário ocorreu durante os experimentos mostrados neste trabalho só seria possível ser verificado com experimentos adicionais. Deste modo, medir o pH_i de células OKP em condições agudas e crônicas nos dois tipos de acidose teria sido importante. Cabe ressaltar que caso o pH_i seja diferente entre a acidose metabólica e a respiratória crônica, isso não invalida a opção número dois, que sugere que a concentração do bicarbonato seja o parâmetro determinante do aumento da expressão do NHE3.

Opção dois, $[\text{HCO}_3^-]$: Não será feita distinção entre a $[\text{HCO}_3^-]$ intracelular e extracelular, pois não conheço evidências para escolher um sobre o outro. A $[\text{HCO}_3^-]$ está baixa na acidose metabólica, normal no controle e normal ou alta na acidose respiratória, o que justificaria regulações diferenciais na expressão do NHE3 nos dois tratamentos. Para

anular a possibilidade de ser a $[\text{HCO}_3^-]$ um fator determinante, acredito que apenas experimentos que utilizassem soluções OOE (out of equilibrium) conseguiriam responder a questão⁸¹. Como os experimentos realizados com OOE em tratamentos agudos¹⁰⁵ demonstraram que as células do túbulo proximal não mudam a reabsorção de bicarbonato de modo dependente de pH (e sim do HCO_3^- e da pCO_2) e os experimentos nos quais a queda do pH_i estava associada ao aumento da atividade do NHE3 não excluíram a possibilidade de ser o bicarbonato extra ou intracelular o responsável, é mais provável que o bicarbonato tenha um peso maior nestas regulações.

Opção 3, mais de uma variável ácido-base compõem o sinal que determina a atividade do NHE3: Esta opção sequer é debatida nos artigos que defendem as opções expostas acima. Mas nada impede que uma composição de sinais seja responsável por determinar a atividade da troca Na^+/H^+ momento a momento ou em longo prazo, ou que a preponderância de um sinal determinado por uma variável ou por outra seja dada por condições específicas, que podem ser, inclusive, alheias ao balanço ácido-base. Por exemplo, a presença de um hormônio poderia acentuar a sensibilidade ao sinal de pH_i ou de $[\text{HCO}_3^-]$.

Observe que as opções citadas acima surgem dentro do contexto no qual as variáveis ácido-base determinantes do pH são a $[\text{HCO}_3^-]$ e a pCO_2 . Portanto, uma abordagem alternativa à clássica, como por exemplo a de Stewart, teria optado por medir outras variáveis e consequentemente poderia propor sensores para elas. E quais seriam então os sensores de Stewart tendo como base a regulação da expressão do NHE3? Sensores para A_{TOT} fariam sentido para alguns distúrbios ácido-base como em acidoses metabólicas causadas por hiperalbuminemia¹⁰⁶. Porém, seriam exceções dentre as acidoses mais comumente enfrentadas pelos humanos e, adicionalmente, Story and Kellum argumentam que não existem evidências de que o organismo regule as concentrações de albumina dentro do contexto do balanço ácido-base¹⁰⁷. Sensores para pCO_2 seriam uma segunda opção, mas no caso específico dos experimentos desta tese, só haveria a chance de isto ocorrer dentro da hipótese alternativa mencionada anteriormente, para eventos relacionados ao tráfego do transportador para a membrana, no qual bicarbonato e pCO_2 atuariam de modos independentes, mas provavelmente não para a modulação da expressão da proteína. Por fim, SID seria a última opção direta. E o que seria um sensor para a diferença da soma da carga dos cátions e dos ânions gerada no túbulo proximal? Teria que se imaginar uma regulação da expressão do NHE3 determinada pelo SID, provavelmente por modificações na concentração do Cl^-

luminal, mas desconheço evidências de que a expressão de NHE3 seja modulada por essa variável.

São questões tão imbricadas entre elas que sempre se poderá sugerir explicações alternativas que se encaixam em abordagens não-tradicionais. Diversos trabalhos mostram que a abordagem tradicional e a proposta por Stewart, mesmo em suas versões atualizadas, garantem resultados muito semelhantes na prática clínica^{109,110}, especialmente em casos de distúrbios puros, como os simulados por esta tese. Porém, o que me interessa aqui são os possíveis *insights* que cada abordagem pode gerar, e deste ponto de vista, se levarmos em conta a descrição do sítio interno alostérico para H^+ , os experimentos contundentes de Boron e colaboradores sobre os sensores para HCO_3^- e pCO_2 e os sensores intracelulares para pH_i , mesmo que não sejam definitivos, focar no pH_i , na $[HCO_3^-]$ e na pCO_2 parece ser um bom caminho para o entendimento de como a célula detecta mudanças momento a momento no balanço ácido-base. Nenhum dos exemplos citados acima faz sentido à luz de Stewart. Portanto, assim como Doberer e colaboradores¹¹¹ e Kurtz e colaboradores¹¹², considero que a abordagem tradicional, mesmo que não tenha resultados práticos superiores aos das abordagens alternativas, pode proporcionar *insights* mecanísticos para o trabalho em questão, pois suas equações são derivadas diretamente de propriedades físico-químicas que possuem efeitos diretos sobre a atividade das células renais.

De qualquer modo, para resolver parte das dúvidas sobre qual/quais variáveis ácido-base são fundamentais para a regulação da expressão e atividade do NHE3, seria necessário medir o pH_i da células OKP em condições controle e de acidose metabólica e respiratória. Os experimentos para medição de pH_i foram iniciados em colaboração com o prof. Antonio Carlos Cassola (Fisiologia e Biofísica dos Instituto de Ciências Biomédicas, USP), porém não foi possível finalizá-los até o término da tese. O objetivo era medir o pH_i nas condições de acidose citadas com pCO_2 controlada para 5% (controle e acidose metabólica) e 10% (acidose respiratória) desde os períodos iniciais do tratamento até 24 horas. Foram realizados experimentos para padronização das medidas de pH_i utilizando a sonda fluorescente BCECF (Life Technologies), e obtivemos sinais de intensidade adequados, assim como a observação das modificações estereotipadas de pH_i após um pulso ácido com NH_4Cl a 25 mM. Contudo interrompemos os experimentos antes de realizar os testes com uma câmara de imagem que permite a manutenção da pCO_2 em valores desejados durante os experimentos de microscopia de fluorescência.

5.4 Níveis de RNAm do *Nhe3*

Os dados apresentados nesta tese indicam que a acidose metabólica causa aumento da quantidade de RNAm do *Nhe3*, contudo a acidose respiratória, mesmo em níveis elevados de hipercapnia não produziu aumento do transcrito. O aumento na quantidade de RNAm por exposição crônica a ambiente de simulação de acidose metabólica não seria uma surpresa, pois além de corroborar com o aumento observado na quantidade de proteína, alguns trabalhos que trataram do assunto observaram aumento do transcrito nas linhagens celulares OKP e Murine Cortical Tubule Cells (MCT), e em córtex de rato^{53,60,66}. Contudo, o mesmo grupo de pesquisa que observou aumento em células OKP⁵³, observou apenas um aumento de 15% no RNAm do *Nhe3* em ratos expostos a três dias de acidose metabólica e não observou aumento em 7 e 14 dias⁵². O trabalho que avaliou o RNAm em células MCT⁶⁰ identificou aumento dos níveis de RNAm em ratos em acidose metabólica por seis dias, mas não em dois e quatro dias. E por fim, o grupo que observou aumento dos níveis de RNAm em ratos submetidos a acidose metabólica por cinco dias⁶⁶, não observou diferenças significativas no tratamento de dois dias. Estes trabalhos possuem além de diferentes períodos de exposição dos animais e das culturas de célula ao estresse ácido, diferentes níveis de acidificação, o que dificulta a comparação dos dados publicados pelos diferentes trabalhos.

Na acidose respiratória Moe e colaboradores observou um grande aumento do RNAm do *Nhe3* em células MCT expostas a meio ácido⁶⁰, mas Krapf e colaboradores não observaram aumento no RNAm de *Nhe3* de córtex de rato⁶⁶. Portanto, em conjunto, nenhum resultado apresentado nesta tese seria óbvio, e uma abordagem que mensurasse os níveis de RNAm, proteína e demais níveis de produção do NHE3 era necessária. Adicionalmente, a análise em paralelo das acidoses metabólica e respiratória permitiu que vieses técnicos como diferentes culturas celulares, períodos de tratamento, reagentes utilizados, etc. não atrapalhassem a comparação entre ambos os distúrbios ácido-base.

Até o momento temos que a acidose metabólica causa aumento na quantidade de RNAm e proteína do NHE3, além do aumento da presença do NHE3 na membrana. A acidose respiratória causa aumento apenas na quantidade de proteína-NHE3 na membrana. Com as quantidades aumentadas do transcrito do *Nhe3* nas células OKP em acidose metabólica ficava a questão se este cenário era decorrente de um aumento da produção ou pela queda da degradação do RNAm do *Nhe3*. A estabilidade do RNAm da glutaminase, uma das enzimas da gliconeogênese, está aumentada durante a acidose metabólica pela ligação de uma proteína

que se liga a uma sequência conhecida como “elemento responsivo a pH” na região 3’ não traduzida (3’UTR) do RNAm da glutaminase⁶⁸. Apesar de este elemento não estar presente no RNAm do *Nhe3*, nós decidimos avaliar se a taxa de degradação poderia ser modulada pelas acidoses. Os experimentos para avaliação da taxa de decaimento do RNAm do *Nhe3* foram realizados durante a minha iniciação científica, contudo eles foram reanalisados de forma mais madura durante o meu doutorado. Nossas hipóteses nulas eram de que a acidose metabólica e a acidose respiratória não alterariam a estabilidade do RNAm do *Nhe3*. As hipóteses nulas não foram refutadas. Nos gráficos normalizados pelo tempo zero do controle (Figura 7) a acidose metabólica inicia em valores elevados de RNAm do *Nhe3*, como esperado pelos experimentos de quantificação de RNAm, contudo em até três horas os níveis se aproximam e ficam abaixo do controle. Na acidose respiratória algo semelhante ocorre, mas com a acidose respiratória partindo de valores inferiores. Os valores com o passar do tempo se aproximam cada vez mais. Portanto, na acidose metabólica há uma primeira fase de degradação rápida do RNAm, que depois se aproxima do controle e na acidose respiratória aparentemente os padrões de decaimento são similares, mas partindo de pontos diferentes. Esta última conclusão é confirmada pelo gráfico normalizado pelo tempo zero do próprio grupo (Figura A.3, apêndice), onde fica evidente, no caso da acidose respiratória, como os padrões de decaimento são muito similares. Nos dois grupos não foi identificada diferença entre os padrões de decaimento de acidose e controle. Mas mesmo que ocorram processos diferentes com os RNAm nos dois distúrbios fica evidente que não houve proteção do transcrito nas duas condições. Algo já esperado para a acidose respiratória, mas que possivelmente estaria alterado na acidose metabólica.

Logo, sem alteração na degradação do RNAm, provavelmente a sua produção deveria estar aumentada na acidose metabólica. A avaliação da produção do RNAm do *Nhe3* foi abordada através de experimentos de transfecção nos quais vetores contendo o gene repórter luciferase sob o comando do promotor do gene do *Nhe3* eram inseridos em células OKP. Esta abordagem permite além de avaliar os níveis de transcrição, que sejam delimitadas regiões de interesse no promotor do *Nhe3* e que sejam identificados candidatos a fatores de transcrição importantes para a adaptação à acidose. Para este último objetivo, também foi utilizada uma abordagem por bioinformática que será comentada posteriormente.

De acordo com os dados apresentados, a acidose respiratória não foi capaz de induzir modificações na atividade promotora do *Nhe3*, porém a acidose metabólica produziu aumentos em todos os fragmentos verificados, exceto o fragmento menor (-152 a +55). Deste

modo, provavelmente a região entre -471 e -153 é uma região fundamental para a resposta de aumento da transcrição do *Nhe3* frente a acidose metabólica e por esse motivo este segmento do promotor do *Nhe3* será denominado nesta tese como “região sensível à acidose metabólica”.

Uma consequência natural da identificação desta região na sequência do promotor do gene do *Nhe3* de rato foi buscar quais os possíveis significados desta sequência para a fisiologia renal das espécies de interesse. No presente trabalho, as espécies diretamente envolvidas foram rato, do qual foi obtido o promotor usado, e gambá, do qual foram obtidas as células de túbulo proximal, mas, certamente, o interesse maior é analisar a possível extrapolação de nossos dados para a fisiologia humana. Diferentemente de um trabalho anterior publicado pelo laboratório da prof. Nancy, no qual o promotor proximal, ou seja, aquele próximo ao sítio de início de transcrição, foi o principal alvo de estudos⁸⁰, aqui o promotor mais proximal testado (-152 a +55) não foi afetado pela acidose. Até aproximadamente 100 pares de base a partir do sítio de início de transcrição (posição -100) a identidade entre as sequências de rato e humano são altas. Dependendo do algoritmo utilizado (Blast, Clustaw, Emboss Needle)^{113,114} as identidades encontradas variam de 74,5% até 87,0%. Malakooti e colaboradores encontraram 79,0% de identidade, o que está de acordo com os alinhamentos mostrados nesta tese¹¹³. Porém, alinhamentos da região de -200 a -101 ou de -500 a -201 mostram como progressivamente a identidade é reduzida (Tabela A.6 e Figura A.8, ambas do apêndice). Portanto, a região sensível à acidose metabólica é uma região definida para o promotor de rato. Assim, é mais informativo do ponto de vista de análise comparativa entre espécies identificar quais são os fatores de transcrição ali presentes e saber se eles estão presentes nas espécies comparadas. Um levantamento das sequências consenso de sítios para fatores de transcrição, presentes na região compreendida entre 2100 pb da região flanqueadora 5' e o sítio de início de transcrição do gene *Nhe3*, foi feito para gambá (*Monodelphis domestica*), rato (*Rattus norvegicus*) e humano (*Homo sapiens*) utilizando o software MatInspector. Infelizmente a região promotora do *Nhe3* de *Didelphis virginiana* ainda não foi realizado e, portanto, foi utilizada a sequência do *Monodelphis domestica*. Nove fatores de transcrição presentes no promotor do *Nhe3* que possuem relações descritas com o balanço ácido-base foram selecionados e estão disponíveis no apêndice (Tabela A.5, apêndice). Estes fatores de transcrição serão abordados mais adiante nesta tese.

5.5 Identificação de fatores de transcrição por bioinformática

A identificação de possíveis sequências consenso para sítios de ligação para fatores de transcrição foi realizada por duas abordagens de bioinformática, uma mais simples focada na região sensível à acidose metabólica e outra, mais abrangente, para identificar sítios super-representados em genes modulados pela acidose metabólica. Esta última análise indicou cinco possíveis sítios para ligação de fatores de transcrição: TCF11:MAFG, PAX5, MIZF, SEF1 e ARNT.

A família gênica “paired box” (PAX) possui importante função no desenvolvimento embrionário do rim, especialmente no que concerne ao PAX2 e PAX8¹¹⁴. Camundongos nocaute para PAX2 possuem sérios defeitos de formação do aparelho urogenital, em contraste com os camundongos nocaute para PAX5 que possuem desenvolvimento normal deste aparato¹¹⁵. Contudo, Morgenstern e colaboradores contestam os padrões de expressão aceitos para PAX5 e afirmam que PAX5 também é expresso nos rins, mas principalmente durante a fase fetal e em rins displásicos¹¹⁶. Nesse trabalho, as autoras argumentam que os anticorpos para PAX2 e PAX5 não seriam muito específicos e que os resultados anteriores devam ser vistos com cuidado. Assim, não está clara a expressão ou a importância fisiológica de PAX5 em rins. Contudo, o efeito de diminuição da transcrição de NHE8, mediada por glicocorticoides, em intestino de ratos após desmame depende de PAX5¹¹⁷. Esta fase de transição marca o aumento da quantidade de NHE3 no intestino. Ainda não se sabe se PAX5 também é responsável pelo aumento da transcrição do NHE3.

O CF11:MAFG é um heterodímero formado pelo *coagulation factor XI* (TCF11, CF11 ou F11) com o *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G* (MAFG). Ambos são expressos em rins, porém não foram encontrados indícios na literatura de formação do heterodímero em tecido renal^{118,119}. Tanto heterodímeros de proteínas MAF como homodímeros se ligam a sequências conhecidas como AP1/MARE. A estas sequências se ligam também proteínas da família do AP1, que estão potencialmente mais ativas durante a acidose¹²⁰, portanto pode ser que haja interação funcional entre esses fatores de transcrição durante a acidose metabólica. Além disso, o sítio de ligação de NRF1 (*NF-E2-related factor 1*), que é uma isoforma de CF11 formada por splicing alternativo¹²¹, é um sítio abundante nos promotores de *Nhe3* de humano e de rato (Tabela A.5, apêndice).

Methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) é uma proteína que se liga a regiões metiladas do DNA. Sekimata e colaboradores identificaram uma proteína que se liga a

MBD2, a *MBD2-interacting zinc finger* (MIZF), também conhecida como *Histone H4 Transcription Factor* (HINF), e juntas atuam principalmente na repressão de atividade transcricional. O RNAm do gene MIZF foi detectado por Northern Blot em diversos tecidos, dentre eles o renal¹²².

Aryl hydrocarbon receptor (AHR) é uma proteína da superfamília de fatores de transcrição *basic helix-loop-helix Per-ARNT-SIM* (bHLH-PAS). As bHLH-PAS estão envolvidas em respostas imunes, modulação da atividade de outros fatores de transcrição e monitoramento de mudanças na pressão parcial de oxigênio, luz e nutrientes¹²³. Além disso, elas atuam como parceiras de heterodimerização de outras bHLH-PAS, como a *Aryl hydrocarbon receptor translocator* (ARNT). O heterodímero formado é comumente associado a mudanças no metabolismo celular em resposta à exposição a compostos xenobióticos¹²⁴. ARNT é uma proteína de expressão ubíqua, portanto presente em tecidos renais. Além disso, identificamos através do software MatInspector a presença de uma sequência consenso para ligação de ARNT na região sensível à acidose metabólica.

Em relação à SEF1, não foram encontrados indícios na literatura de que seja expresso em tecidos renais. Os fatores de transcrição MIZF, CF11, MAFG e PAX5 são expressos em rins de mamíferos, porém não existem estudos que os relacionem ao estresse ácido ou à atividade do NHE3.

Esta abordagem foi profícua para este trabalho (ver a frente), mas é importante ressaltar que ela é passível de diversas críticas. Iniciando pelo trabalho do qual foi obtida a base de dados de RNA modificados pela acidose, é altamente provável que falsos positivos e negativos tenham sido registrados pela técnica de microarray. Experimentos em larga escala são extremamente úteis para as ciências biomédicas, mas ainda geram uma alta quantidade de erros. Um dos meios de diminuir a quantidade de erros gerados é executar uma fase de validação por outra técnica de larga escala, algo que não foi feito no referido trabalho. Apenas algumas proteínas foram selecionadas para serem validadas por western-blotting.

Adicionalmente, as informações sobre as sequências primárias que identificariam os sítios para fatores de transcrição ainda são consideradas insuficientes para que se determine se de fato uma sequência é um sítio para determinada proteína ou mesmo se as sequências abaixo do corte estatístico não atuam na prática como sítios de ligação¹²⁵. As matrizes utilizadas para identificação são regularmente atualizadas, de modo que se esta análise for repetida posteriormente, provavelmente serão obtidos resultados diferentes. A constatação de que diferentes versões geram diferentes resultados surgiu na análise de busca de fatores de

transcrição na região sensível à acidose metabólica, como será descrito mais a frente. Este último aspecto não é uma crítica ao processo como um todo, mas uma constatação do aumento do número de informações que cada versão carrega.

Por último, o fato de uma sequência consenso para ligação de um fator de transcrição ser super-representada em genes com expressão alterada pela acidose não necessariamente possui significado biológico ou um significado diretamente relacionado ao balanço ácido-base¹²⁶. A natureza complexa de como se constituiu evolutivamente a sequência do promotor de um gene impede que conclusões óbvias sejam retiradas de uma informação deste tipo. Só o fato da seleção neutra poder ter fixado essas sequências no genoma, já mostra que seria inadequado fazer uma relação simples entre representação e função. Além disso, é possível imaginar que sítios para fatores de transcrição possam ter sido fixados por pressões seletivas não relacionadas funcionalmente ao balanço ácido-base, mas que atuam concomitantemente a ela (por exemplo, acidose e hipercalemia normalmente ocorrem em paralelo). E por último, não necessariamente uma sequência consenso para algum elemento regulatório é utilizada *in vivo* nos organismos estudados. Portanto, as justificativas são inúmeras para que não se advogue por um relação direta entre a representação de um sítio de ligação para fator de transcrição (apenas uma informação dentre muitas da arquitetura de um genoma) e a sua importância para o tema desta tese.

Dito isto, todo cuidado com esses dados é necessário. Mais do que uma clara evidência, acredito que dados como estes servem para orientar nossa investigação.

5.6 Identificação de fatores de transcrição na região sensível à acidose metabólica

Na abordagem anterior, procurou-se identificar fatores de transcrição que poderiam ser importantes para o aumento da transcrição do *Nhe3* em resposta à acidose metabólica. Contudo, como foi delimitada uma região do promotor que seria importante para a resposta a acidose metabólica, seria adequado identificar quais sítios para fatores de transcrição estariam presentes neste trecho. Com o intuito de identificar os possíveis elementos que se ligariam a região, foi utilizado o programa MatInspector. Foram realizadas análises em dois períodos distintos, em 2010 e em 2013 (ver Material e Métodos). Na análise de 2010 foram encontradas 46 sequências consensuais para possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição, das quais foram destacadas quatro: duas para SP1/GC-box, uma para EGR e uma para o heterodímero AHR/ARNT. Na análise de 2013, foram encontrados 70 possíveis sítios

para fatores de transcrição, e estes quatro sítios apareceram novamente entre os resultados, sem adição de outros sítios para estes fatores.

Optei por estudar estas proteínas porque tanto SP1 como EGR1 são fundamentais para a atividade promotora basal do *Nhe3* em células epiteliais de rim e de intestino^{80,113,127} e porque ARNT foi identificado como um sítio super-representado em promotores de genes que codificam proteínas moduladas pela acidose metabólica. Assim, foi testada a hipótese que SP1, EGR1 e ARNT teriam suas quantidades alteradas em células OKP em condições de acidose metabólica. Infelizmente, como comentado na seção de resultados, não foi possível quantificar a abundância de EGR1. Contudo, foi observado aumento da expressão de SP1 após seis horas de exposição das células OKP à acidose metabólica. Os experimentos de quantificação de ARNT não foram concluídos, de modo que eles apenas dão um indicativo de que possivelmente a proteína esteja aumentada na acidose metabólica, no entanto mais experimentos seriam necessários.

A expressão de outros fatores de transcrição já foi estudada em experimentos com acidose metabólica aguda. Os RNAm de *Fos*, *Jun*, *Junb*, *Jund*, *Egr1* estão aumentadas nestas condições¹²⁸ e AP1, uma proteína heterodimérica que pode ser composta por FOS e JUN, está mais ativa na acidose metabólica¹²⁰. É possível que a ativação de AP1 seja um passo intermediário entre a mensagem sinalizada pela acidose metabólica e o aumento da atividade ou da expressão do NHE3. Porém, não se sabe se AP1 é diretamente responsável pelo aumento da taxa de transcrição do *Nhe3*, ou mesmo se o aumento de atividade desta está relacionado ao *Nhe3*. Na primeira análise de 2010 feita com o MatInspector não foi revelada a presença de sequências consenso para AP1 na região sensível à acidose metabólica, mas na análise de 2013 foram identificados três sítios para este fator de transcrição.

Como a expressão do SP1 está aumentada na acidose metabólica e existem dois sítios consenso para esta proteína na *região sensível à acidose metabólica*, considero o SP1 um importante candidato a fator de transcrição fundamental para a resposta do NHE3 a este estímulo ácido. SP1 é uma proteína que possui motivos dedo de zinco (*zinc finger motifs*) e se liga a sequências ricas em GC, como por exemplo GGGCGG ou sequências semelhantes conhecidas como “GC boxes”¹²⁹. *Core promoters* com GC boxes estão presentes de 79-88% do genes de humanos¹³⁰, não sendo portanto inesperada sua presença no promotor de *Nhe3*. Torigoe e colaboradores demonstraram que a afinidade de ligação do SP1 por TATA e GC boxes aumenta conforme o pH diminui, o que permite que se especule que a acidose metabólica causa aumento na ligação do SP1 nos GC boxes do promotor do gene do *Nhe3*,

estimulando, assim, a transcrição deste gene¹³¹. SP1 é um potente ativador da transcrição e sua interação com outros fatores de transcrição pode determinar sua atividade. Já foram descritos diversos parceiros diretos e indiretos de interação de SP1, entre eles algumas proteínas moduladas pela acidose como FOS, JUN e EGR1, além do ARNT^{131–133}. SP1 também pode sofrer diversos tipos de modificações pós traducionais, como fosforilação, sumoilação, acetilação, glicosilação e ubiquitinação¹³⁴, portanto, as possibilidades de regulação conhecidas para este fator de transcrição são vastas. Contudo é importante ressaltar que o sítio mais comum para ligação de proteínas SP1 em Metatheria (grupo que inclui os gambás) é GA box, diferentemente do que é encontrado em Eutheria e Aves (GC box)¹³⁰. Portanto, em células OKP, não necessariamente há a ligação do SP1 endógeno na sequência promotora do *Nhe3* de rato.

Assim, para testar se os sítios para SP1, EGR1 e ARNT têm importância para o aumento da transcrição do *Nhe3* em resposta à acidose metabólica, foram produzidos constructos que continham mutações pontuais em três diferentes regiões do promotor: um possível sítio para SP1 e EGR1 sobrepostos, um sítio apenas para SP1 e outro sítio para AHR/ARNT. Os dados indicam que os três sítios são importantes para a atividade promotora do *Nhe3*, pois células OKP transfectadas com os três constructos mutados perderam a capacidade de transcrever mais Firefly luciferase na acidose metabólica quando comparados com o constructo não mutado.

Um aspecto técnico que me chamou a atenção nestes experimentos foi uma maior variação da Renilla luciferase do que em experimentos anteriores. Eu já havia notado uma pequena tendência da Renilla estar diminuída na acidose em alguns (poucos) experimentos, o que levaria os dados de razão de luminescência a estarem superestimados, o que é preocupante, pois ficaria difícil saber se os efeitos observados eram devidos a uma resposta biológica do promotor em relação ao estresse ácido, ou um problema técnico do experimento. Os dados dos experimentos que compararam a atividade do fragmento não mutado na acidose em relação ao controle foram coletados em dois momentos, os dados de um deles são mostrados na figura 8 e os do outro, na figura 9. Nos dados da figura 10, 50% do componente de aumento da atividade promotora no grupo não mutado é dado por alteração da Renilla. Contudo, ao remover a correção dos dados pela Renilla de toda a análise, a variabilidade intra e inter grupos aumenta consideravelmente. Portanto, a Renilla está corrigindo os valores, mas talvez sofrendo em paralelo uma certa influência do tratamento. A Renilla luciferase é expressa sob controle do promotor CMV no vetor pRL-CMV, que foi clonado mais de uma

vez durante o meu doutorado. A empresa que fabrica o plasmídeo alerta que dentre os plasmídeos para Renilla luciferase este é o mais sensível e que caso não haja necessidade de alta sensibilidade, deve-se evitá-lo, pois sua atividade pode ser modificada por diversos tratamentos. Infelizmente, como estes experimentos foram realizados ao final do doutorado não havia como repeti-los com outro plasmídeo controle.

Um aspecto interessante sobre estes experimentos foi que a atividade promotora dos três constructos mutados foi semelhante ou superior à do constructo não mutado (Figura A.7, apêndice), indicando que estes sítios não teriam efeitos ativadores sobre a atividade basal do promotor, e poderiam até ser repressivos no caso do sítio para ARNT (mut3). Contudo, como a quantidade de DNA transfectado foi baseada em uma quantificação de DNA realizada por comparação com marcador de massa em gel de eletroforese, método que talvez possa não ser muito preciso, a comparação das atividades promotoras absolutas pode conter pequenos erros. Deste modo, os valores foram dados como relativos ao controle (Figura 10), o que evita erros decorrentes da quantificação.

6 CONCLUSÕES

Como descrito na figura 12 a acidose metabólica e a acidose respiratória ativam o NHE3 por vias diferentes. A acidose metabólica causa aumento da presença do NHE3 na membrana, bem como aumenta a expressão total do NHE3 na célula. A queda da concentração de bicarbonato e/ou a queda do pH_i aumentam a expressão do SP1, que por sua vez pode ter um efeito ativador sobre taxa de transcrição do RNAm do *Nhe3*. Isto ocorre sem alteração da taxa de degradação do RNAm. O aumento do RNAm pode levar a maior expressão da proteína do NHE3, o que tende a contribuir para o aumento da atividade Na^+/H^+ apical no túbulo proximal.

O tráfego do NHE3 entre a superfície celular e compartimentos subapicais está aumentada em ambas as acidoses pela queda do pH , ou pelo aumento da pCO_2 e queda do HCO_3^- em paralelo. Passos intermediários entre as vias apresentadas na figura 12 são possíveis.

Figura 12 – Resumo dos efeitos da acidose metabólica e respiratória sobre a regulação genômica do NHE3

Setas pequenas (↓) ou (↑) indicam queda ou aumento do elemento apresentado, respectivamente. Setas com duas cabeças (↕) indicam ausência de alteração do elemento. Setas grandes contínuas indicam conexão entre as etapas apresentadas e setas tracejadas indicam vias alternativas. As caixas pretas são etapas não estudadas por este trabalho. FONTE: autoria própria.

6.1 Considerações finais

Os objetivos específicos determinados para esta tese foram em sua grande maioria satisfeitos. Diversos aspectos da regulação molecular do NHE3 não foram abordados nesta tese, mas especialmente me ressinto por não ter avançado mais nas regulações dos fatores de transcrição, como por exemplo na quantificação de ARNT e se SP1, EGR1 e ARNT têm sua atividade de ligação no promotor do *Nhe3* modificada pela acidose metabólica. Também considero importante que esses experimentos tivessem sido feitos em conjunto com a acidose respiratória, respeitando o caráter comparativo desta tese e servindo com um possível controle negativo dos experimentos de avaliação dos efeitos da acidose metabólica. Contudo, foi importante abrir a possibilidade que estes fatores de transcrição possam ser importantes na regulações da transcrição do *Nhe3* dentro do contexto do balanço ácido-base.

Outra abordagem que gostaria de ter realizado é a mensuração de pH_i nas acidoses metabólicas e respiratórias. Isto provavelmente permitiria que eu pudesse dar passos a frente na identificação de quais os estímulos físico-químicos que disparam as regulações moleculares do *Nhe3*. Ainda discute-se muitos aspectos da terapia de reajuste do pH do sangue por ingestão de bicarbonato e a busca por melhor compreender quais são as variáveis fundamentais a serem controladas pelos rins poderá embasar no futuro como a terapia será realizada.

Portanto, a questão levantada por V. E. Henderson (não confundir com Lawrence Henderson, conhecido pela equação de Henderson-Hasselbalch) há 100 anos atrás ainda está em aberto:

“Can we refer any of the symptoms of acid intoxication to the rise in hydrogen ion concentration alone? This questions it is impossible to answer as it stands, since hand in hand therewith the change in CO_2 tension in lungs and blood stream, and the decrease in fixed base occur.”²³

Esta questão não me parece mais impossível de ser respondida, mas ainda precisaremos de novas contribuições na área para que ela seja resolvida.

REFERÊNCIAS*

1. Duplain M, Noel J, Fleser A, Marshansky V, Gougoux A, Vinay P. Mechanisms of proximal proton secretion in BBM of herbivorous, omnivorous, and carnivorous species. *Am J Physiol*. 1995 Jul;269(1 Pt 2):R104–R112.
2. Packard G. Devonian amphibians - did they excrete carbon-dioxide via skin, gills, or lungs. *Evol Int J Org Evol*. 1976;30(2):270–80.
3. Jackson D. Acid-base balance during hypoxic hypometabolism: selected vertebrate strategies. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004 Aug;141(3):273–83.
4. Zilberstein D, Agmon V, Schuldiner S, Padan E. *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J Bacteriol*. 1984 Apr;158(1):246–52.
5. Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu D, et al. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*. 2003 Sep;425(6956):393–7.
6. Fonseca-Garcia C, Leon-Ramirez C, Ruiz-Herrera J. The regulation of different metabolic pathways through the Pal/Rim pathway in *Ustilago maydis*. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2012 Mar; Available from: PM:22443138
7. Bobulescu I, Moe O. Na⁺/H⁺ exchangers in renal regulation of acid-base balance. *Semin Nephrol*. 2006 Sep;26(5):334–44.
8. Gilmour K, Euverman R, Esbaugh A, Kenney L, Chew S, Ip Y, et al. Mechanisms of acid-base regulation in the African lungfish *Protopterus annectens*. *J Exp Biol*. 2007 Jun;210(Pt 11):1944–59.
9. Stewart PA. Modern quantitative acid-base chemistry. *Can J Physiol Pharmacol*. 1983 Dec;61(12):1444–61.
10. Rastegar A. Clinical utility of Stewart's method in diagnosis and management of acid-base disorders. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Jul 1;4(7):1267–74.
11. Boron W. Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Sep;17(9):2368–82.
12. Brosius F, Nguyen K, Stuart-Tilley A, Haller C, Briggs J, Alper S. Regional and segmental localization of AE2 anion exchanger mRNA and protein in rat kidney. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269(4 Pt 2):F461–F468.
13. Bobulescu I, Moe O. Luminal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange in the proximal tubule. *Pflugers Arch*. 2009 May;458(1):5–21.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

14. Wang T, Hropot M, Aronson PS, Giebisch G. Role of NHE isoforms in mediating bicarbonate reabsorption along the nephron. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2001 Dec 1;281(6):F1117–F1122.
15. Queiroz-Leite GD, Crajoinas RO, Neri EA, Bezerra CNA, Girardi ACC, Rebouças NA, et al. Fructose Acutely Stimulates NHE3 Activity in Kidney Proximal Tubule. *Kidney Blood Press Res*. 2012;36(1):320–34.
16. Carraro-Lacroix LR, Lessa LMA, Bezerra CNA, Pessoa TD, Souza-Menezes J, Morales MM, et al. Role of CFTR and ClC-5 in Modulating Vacuolar H⁺-ATPase Activity in Kidney Proximal Tubule. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(4-5):563–76.
17. Li HC, Du Z, Barone S, Rubera I, McDonough AA, Tauc M, et al. Proximal tubule specific knockout of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3: effects on bicarbonate absorption and ammonium excretion. *J Mol Med*. 2013 Aug 1;91(8):951–63.
18. Halperin M. How much “new” bicarbonate is formed in the distal nephron in the process of net acid excretion? *Kidney Int*. 1989 Jun;35(6):1277–81.
19. Naunyn B. *Der Diabetes melitus* [Internet]. Wien : Hölder; 1906 [cited 2013 Dec 11]. 598 p. Available from: <http://archive.org/details/derdiabetesmelit00naun>
20. Lang RM. Acidosis and some of the Factors which Influence it. *Biochem J*. 1915 Dec;9(4):456–78.
21. Slyke DDV, Cullen GE. Studies of acidosis I. the bicarbonate concentration of the blood plasma; its significance, and its determination as a measure of acidosis. *J Biol Chem*. 1917 Jun 1;30(2):289–346.
22. Malkin HM. Concept of acid-base balance in medicine. *Ann Clin Lab Sci*. 2003 Jul 1;33(3):337–44.
23. Henderson V. ACIDOSIS. *Can Med AssocJ*. 1914 May;4(5):388–95.
24. Slyke DDV. Studies of acidosis xvii. the normal and abnormal variations in the acid-base balance of the blood. *J Biol Chem*. 1921 Sep 1;48(1):153–76.
25. Kraut J, Kurtz I. Controversies in the treatment of acute metabolic acidosis. *Nephrol Self Assess Program*. 2006 Jan;5(1):1–9.
26. Throssell D, Brown J, Harris K, Walls J. Metabolic acidosis does not contribute to chronic renal injury in the rat. *Clin SciLond*. 1995 Dec;89(6):643–50.
27. Jara A, Felsenfeld A, Bover J, Kleeman C. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. *Kidney Int*. 2000 Sep;58(3):1023–32.
28. Sterns R, Emmet M. Fluid, Electrolyte, and acid-base disturbances - bicarbonate levels and chronic renal failure. *Nephrol Self Assess Program*. 2011 Mar;10(2):96–8.

29. Dubose TDJ. Acid-base disorders, Brenner,B.M. Brenner & Rector's The Kidney. Phila Pa Saunders. 2004;921–96.
30. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev.* 1997 Jan;77(1):51–74.
31. Moe O. 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.
32. Bezerra C, Girardi A, Carraro-Lacroix L, Reboucas N. Mechanisms underlying the long-term regulation of NHE3 by parathyroid hormone. *AmJ Physiol Ren Physiol.* 2008 May;294(5):F1232–F1237.
33. Girardi A, Titan S, Malnic G, Reboucas N. Chronic effect of parathyroid hormone on NHE3 expression in rat renal proximal tubules. *Kidney Int.* 2000 Oct;58(4):1623–31.
34. Hu M, Fan L, Crowder L, Karim-Jimenez Z, Murer H, Moe O. Dopamine acutely stimulates Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3) endocytosis via clathrin-coated vesicles: dependence on protein kinase A-mediated NHE3 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2001 Jul;276(29):26906–15.
35. Du Z, Yan Q, Duan Y, Weinbaum S, Weinstein A, Wang T. Axial flow modulates proximal tubule NHE3 and H-ATPase activities by changing microvillus bending moments. *AmJ Physiol Ren Physiol.* 2006 Feb;290(2):F289–F296.
36. Donowitz M, Mohan S, Zhu C, Chen T, Lin R, Cha B, et al. NHE3 regulatory complexes. *J Exp Biol.* 2009 Jun;212(Pt 11):1638–46.
37. Zizak M, Chen T, Bartonicek D, Sarker R, Zachos N, Cha B, et al. Calmodulin kinase II constitutively binds, phosphorylates, and inhibits brush border Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) by a NHERF2 protein-dependent process. *J Biol Chem.* 2012 Apr;287(16):13442–56.
38. Babich V, Vadnagara K, Sole FD. The biophysical and molecular basis of intracellular pH sensing by Na⁺/H⁺ exchanger-3. *FASEB J [Internet].* 2013 Aug 9 [cited 2013 Sep 24]; Available from: <http://www.fasebj.org/content/early/2013/08/09/fj.12-225466>
39. Aronson P, Nee J, Suhm M. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature.* 1982 Sep;299(5879):161–3.
40. Levine SA, Nath SK, Yun CHC, Yip JW, Montrose M, Donowitz M, et al. Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border na/h exchanger isoform nhe3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors. *J Biol Chem.* 1995 Jun 9;270(23):13716–25.
41. Cha B, Oh S, Shanmugaratnam J, Donowitz M, Yun CC. Two Histidine Residues in the Juxta-Membrane Cytoplasmic Domain of Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 3 (NHE3) Determine the Set Point. *J Membr Biol.* 2003 Jan 1;191(1):49–58.

42. Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, Pouyssegur J. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls “H(+)-sensing”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 15;89(6):2424–8.
43. Alexander RT, Malevanets A, Durkan AM, Kocinsky HS, Aronson PS, Orlowski J, et al. Membrane curvature alters the activation kinetics of the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3. *J Biol Chem*. 2007 Mar 9;282(10):7376–84.
44. Miller R, Pollock A. Modification of the internal pH sensitivity of the Na⁺/H⁺ antiporter by parathyroid hormone in a cultured renal cell line. *J Biol Chem*. 1987 Jul;262(19):9115–20.
45. Sarker R, Gronborg M, Cha B, Mohan S, Chen Y, Pandey A, et al. Casein kinase 2 binds to the C terminus of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) and stimulates NHE3 basal activity by phosphorylating a separate site in NHE3. *Mol Biol Cell*. 2008 Sep;19(9):3859–70.
46. He P, Zhang H, Yun C. IRBIT, inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-binding protein released with IP3, binds Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and activates NHE3 activity in response to calcium. *J Biol Chem*. 2008 Nov;283(48):33544–53.
47. du CD, Chalumeau C, Defontaine N, Klein C, Kellermann O, Paillard M, et al. Angiotensin II stimulates NHE3 activity by exocytic insertion of the transporter: role of PI 3-kinase. *Kidney Int*. 2003 Sep;64(3):939–49.
48. Riquier-Brison A, Leong P, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough A. Angiotensin II stimulates trafficking of NHE3, NaPi2, and associated proteins into the proximal tubule microvilli. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2010 Jan;298(1):F177–F186.
49. Bacic D, Kaissling B, McLeroy P, Zou L, Baum M, Moe O. Dopamine acutely decreases apical membrane Na/H exchanger NHE3 protein in mouse renal proximal tubule. *Kidney Int*. 2003 Dec;64(6):2133–41.
50. He P, Lee S, Lin S, Seidler U, Lang F, Fejes-Toth G, et al. Serum- and glucocorticoid-induced kinase 3 in recycling endosomes mediates acute activation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by glucocorticoids. *Mol Biol Cell*. 2011 Oct;22(20):3812–25.
51. Duan Y, Weinstein A, Weinbaum S, Wang T. Shear stress-induced changes of membrane transporter localization and expression in mouse proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Dec;107(50):21860–5.
52. Ambuhl P, Amemiya M, Danczkay M, Lotscher M, Kaissling B, Moe O, et al. Chronic metabolic acidosis increases NHE3 protein abundance in rat kidney. *Am J Physiol*. 1996 Oct;271(4 Pt 2):F917–F925.
53. Amemiya M, Yamaji Y, Cano A, Moe OW, Alpern RJ. Acid incubation increases NHE-3 mRNA abundance in OKP cells. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1995 Jul 1;269(1):C126–C133.
54. Girardi A, Fukuda L, Rossoni L, Malnic G, Reboucas N. Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na⁺ - H⁺ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2008 Feb;294(2):F414–F422.

55. Nagami G. Role of angiotensin II in the enhancement of ammonia production and secretion by the proximal tubule in metabolic acidosis. *AmJ Physiol Ren Physiol*. 2008 Apr;294(4):F874–F880.
56. Oweis S, Wu L, Kiela P, Zhao H, Malhotra D, Ghishan F, et al. Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK1 cells. *AmJ Physiol Ren Physiol*. 2006 May;290(5):F997–1008.
57. Malakooti J, Sandoval R, Amin M, Clark J, Dudeja P, Ramaswamy K. Transcriptional stimulation of the human NHE3 promoter activity by PMA: PKC independence and involvement of the transcription factor EGR-1. *Biochem J*. 2006 Jun;396(2):327–36.
58. Horie S, Moe O, Tejedor A, Alpern R. Preincubation in acid medium increases Na/H antiporter activity in cultured renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Jun;87(12):4742–5.
59. Igarashi P, Freed M, Ganz M, Reilly R. Effects of chronic metabolic acidosis on Na(+)-H⁺ exchangers in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol*. 1992 Jul;263(1 Pt 2):F83–F88.
60. Moe O, Miller R, Horie S, Cano A, Preisig P, Alpern R. Differential regulation of Na/H antiporter by acid in renal epithelial cells and fibroblasts. *J Clin Invest*. 1991 Nov;88(5):1703–8.
61. Cohn D, Klahr S, Hammerman M. Metabolic acidosis and parathyroidectomy increase Na⁺-H⁺ exchange in brush border vesicles. *Am J Physiol*. 1983 Aug;245(2):F217–F222.
62. Kinsella J, Cujdik T, Sacktor B. Na⁺-H⁺ exchange in isolated renal brush-border membrane vesicles in response to metabolic acidosis. Kinetic effects. *J Biol Chem*. 1984 Nov;259(21):13224–7.
63. Tsai C, Ives H, Alpern R, Yee V, Warnock D, Rector F. Increased V_{max} for Na⁺/H⁺ antiporter activity in proximal tubule brush border vesicles from rabbits with metabolic acidosis. *Am J Physiol*. 1984 Aug;247(2 Pt 2):F339–F343.
64. Wu M, Biemesderfer D, Giebisch G, Aronson P. Role of NHE3 in mediating renal brush border Na⁺-H⁺ exchange. Adaptation to metabolic acidosis. *J Biol Chem*. 1996 Dec;271(51):32749–52.
65. Yang X, Amemiya M, Peng Y, Moe O, Preisig P, Alpern R. Acid incubation causes exocytic insertion of NHE3 in OKP cells. *AmJ Physiol Cell Physiol*. 2000 Aug;279(2):C410–C419.
66. Krapf R, Pearce D, Lynch C, Xi X, Reudelhuber T, Pouyssegur J, et al. Expression of rat renal Na/H antiporter mRNA levels in response to respiratory and metabolic acidosis. *J Clin Invest*. 1991 Feb;87(2):747–51.
67. Cano A. Characterization of the rat NHE3 promoter. *Am J Physiol*. 1996 Sep;271(3 Pt 2):F629–F636.

68. Laterza O, Curthoys N. Specificity and functional analysis of the pH-responsive element within renal glutaminase mRNA. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2000 Jun;278(6):F970–F977.
69. Adroque H, Madias N. Secondary responses to altered acid-base status: the rules of engagement. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Jun;21(6):920–3.
70. de Seigneux S, Malte H, Dimke H, Frokiaer J, Nielsen S, Frische S. Renal compensation to chronic hypoxic hypercapnia: downregulation of pendrin and adaptation of the proximal tubule. *AmJ Physiol Ren Physiol*. 2007 Apr;292(4):F1256–F1266.
71. Zeidel M, Seifter J. Regulation of Na/H exchange in renal microvillus vesicles in chronic hypercapnia. *Kidney Int*. 1988 Jul;34(1):60–6.
72. Talor Z, Yang W, Shuffield J, Sack E, Arruda J. Chronic hypercapnia enhances V_{max} of Na-H antiporter of renal brush-border membranes. *Am J Physiol*. 1987 Sep;253(3 Pt 2):F394–F400.
73. Pahlavan P, Wang L, Sack E, Arruda J. Role of protein kinase C in the adaptive increase in Na-H antiporter in respiratory acidosis. *J Am Soc Nephrol*. 1993 Oct;4(4):1079–86.
74. Northrup T, Garella S, Perticucci E, COHEN J. Acidemia alone does not stimulate rat renal Na⁺-H⁺ antiporter activity. *Am J Physiol*. 1988 Aug;255(2 Pt 2):F237–F243.
75. Santella R, Maddox D, Gennari F. Delivery dependence of early proximal bicarbonate reabsorption in the rat in respiratory acidosis and alkalosis. *J Clin Invest*. 1991 Feb;87(2):631–8.
76. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
77. Nowik M, Lecca M, Velic A, Rehrauer H, Brandli A, Wagner C. Genome-wide gene expression profiling reveals renal genes regulated during metabolic acidosis. *Physiol Genomics*. 2008 Feb;32(3):322–34.
78. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2011; Available from: <http://www.R-project.org/>
79. Biemesderfer D, Nagy T, DeGray B, Aronson P. Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. *J Biol Chem*. 1999 Jun;274(25):17518–24.
80. Neri E, Bezerra C, Reboucas N. Essential regulatory elements for NHE3 gene transcription in renal proximal tubule cells. *BrazJ Med Biol Res*. 2011 Jun;44(6):514–23.
81. Zhao J, Hogan E, Bevensee M, Boron W. Out-of-equilibrium CO₂/. *Nature*. 1995 Apr;374(6523):636–9.
82. Tresguerres M, Buck J, Levin L. Physiological carbon dioxide, bicarbonate, and pH sensing. *Pflugers Arch*. 2010 Nov;460(6):953–64.

83. Brown D, Wagner C. Molecular Mechanisms of Acid-Base Sensing by the Kidney. *J AmSocNephrol* [Internet]. 2012 Feb; Available from: PM:22362904
84. Skelton L, Boron W, Zhou Y. Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J Nephrol*. 2010 Nov;23 Suppl 16:S4–18.
85. Choi J, Lee S, Choi Y. Identification of a putative G protein-coupled receptor induced during activation-induced apoptosis of T cells. *Cell Immunol*. 1996 Feb;168(1):78–84.
86. Li H, Wang D, Singh LS, Berk M, Tan H, Zhao Z, et al. Abnormalities in osteoclastogenesis and decreased tumorigenesis in mice deficient for ovarian cancer G protein-coupled receptor 1. *PLoS ONE* [Internet]. 2009 May 28 [cited 2014 Jan 27];4(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684630/>
87. Xu Y, Casey G. Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14. *Genomics*. 1996 Jul;35(2):397–402.
88. Mohebbi N, Benabbas C, Vidal S, Daryadel A, Bourgeois S, Velic A, et al. The Proton-activated G Protein Coupled Receptor OGR1 Acutely Regulates the Activity of Epithelial Proton Transport Proteins. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29(3-4):313–24.
89. Sun X, Yang L, Tiegs B, Arend L, McGraw D, Penn R, et al. Deletion of the pH sensor GPR4 decreases renal acid excretion. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Oct;21(10):1745–55.
90. Pollock A, Warnock D, Strewler G. Parathyroid hormone inhibition of Na⁺-H⁺ antiporter activity in a cultured renal cell line. *Am J Physiol*. 1986 Feb;250(2 Pt 2):F217–F225.
91. Li S, Sato S, Yang X, Preisig P, Alpern R. Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(12):1782–9.
92. Espiritu D, Bernardo A, Robey R, Arruda J. A central role for Pyk2-Src interaction in coupling diverse stimuli to increased epithelial NBC activity. *AmJ Physiol Ren Physiol*. 2002 Oct;283(4):F663–F670.
93. Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, et al. Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science*. 2000 Jul 28;289(5479):625–8.
94. Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem*. 2003 May 2;278(18):15922–6.
95. Charney A, Egnor R, Cassai N, Sidhu G. Carbon dioxide affects rat colonic Na⁺ absorption by modulating vesicular traffic. *Gastroenterology*. 2002 Feb;122(2):318–30.
96. Krapf R. Mechanisms of adaptation to chronic respiratory acidosis in the rabbit proximal tubule. *J Clin Invest*. 1989 Mar;83(3):890–6.
97. Ruiz O, Arruda J, Talor Z. Na-HCO₃ cotransport and Na-H antiporter in chronic respiratory acidosis and alkalosis. *Am J Physiol*. 1989 Mar;256(3 Pt 2):F414–F420.

98. Crajoinas R, Oricchio F, Pessoa T, Pacheco B, Lessa L, Malnic G, et al. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *AmJ Physiol Ren Physiol*. 2011 Aug;301(2):F355–F363.
99. Carraro-Lacroix L, Malnic G, Girardi A. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2009 Dec;297(6):F1647–F1655.
100. Mello AM, Malnic G. Peritubular pH and PCO₂ in renal tubular acidification. *Am J Physiol*. 1975 Jun;228(6):1766–74.
101. Preisig P. The acid-activated signaling pathway: starting with Pyk2 and ending with increased NHE3 activity. *Kidney Int*. 2007 Dec;72(11):1324–9.
102. Adam W, Koretsky A, Weiner M. ³¹P-NMR in vivo measurement of renal intracellular pH: effects of acidosis and K⁺ depletion in rats. *Am J Physiol*. 1986 Nov;251(5 Pt 2):F904–F910.
103. Chiu H, Lin H, Tang M. Ethyl isopropylamiloride downregulates Na,K-ATPase gene expression which confers cytotoxicity in primary proximal tubule cell cultures. *Chin J Physiol*. 1998 Dec;41(4):195–202.
104. Struyvenberg A, Morrison R, Relman A. Acid-base behavior of separated canine renal tubule cells. *Am J Physiol*. 1968 May;214(5):1155–62.
105. Zhou Y, Zhao J, Bouyer P, Boron W. Evidence from renal proximal tubules that HCO₃⁻ and solute reabsorption are acutely regulated not by pH but by basolateral HCO₃⁻ and CO₂. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Mar;102(10):3875–80.
106. Bruegger D, Jacob M, Scheingraber S, Conzen P, Becker BF, Finsterer U, et al. Changes in acid-base balance following bolus infusion of 20% albumin solution in humans. *Intensive Care Med*. 2005 Aug 1;31(8):1123–7.
107. Story DA, Kellum JA. New aspects of acid-base balance in intensive care. *Curr Opin Anaesthesiol* April 2004. 2004;17(2):119–23.
108. Matousek S, Handy J, Rees SE. Acid–base chemistry of plasma: consolidation of the traditional and modern approaches from a mathematical and clinical perspective. *J Clin Monit Comput*. 2011 Feb 1;25(1):57–70.
109. Dubin A, Meneses MM, Masevicius FD, Moseinco MC, Kutscherauer DO, Ventrice E, et al. Comparison of three different methods of evaluation of metabolic acid-base disorders *. *Crit Care Med* May 2007. 2007;35(5):1264–70.
110. Doberer D, Funk G-C, Kirchner K, Schneeweiss B. A critique of Stewart’s approach: the chemical mechanism of dilutional acidosis. *Intensive Care Med*. 2009 Jun 17;35(12):2173–80.

111. Kurtz I, Kraut J, Ornekian V, Nguyen MK. Acid-base analysis: a critique of the Stewart and bicarbonate-centered approaches. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2008 May 1;294(5):F1009–F1031.
112. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403–10.
113. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 2000 Jun 1;16(6):276–7.
114. Malakooti J, Memark V, Dudeja P, Ramaswamy K. Molecular cloning and functional analysis of the human Na(+)/H(+) exchanger NHE3 promoter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Mar;282(3):G491–G500.
115. Goode D, Elgar G. The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective. *Dev Dyn*. 2009 Dec;238(12):2951–74.
116. Urbanek P, Wang Z, Fetka I, Wagner E, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*. 1994 Dec;79(5):901–12.
117. Morgenstern D, Hasan F, Gibson S, Winyard P, Sebire N, Anderson J. PAX5 expression in nonhematopoietic tissues. Reappraisal of previous studies. *Am J Clin Pathol*. 2010 Mar;133(3):407–15.
118. Xu H, Zhang B, Li J, Chen H, Wang C, Ghishan FK. Transcriptional inhibition of intestinal NHE8 expression by glucocorticoids involves Pax5. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Oct 1;299(4):G921–G927.
119. Alam J, Killeen E, Gong P, Naquin R, Hu B, Stewart D, et al. Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2003 Apr;284(4):F743–F752.
120. Gailani D, Sun M, Sun Y. A comparison of murine and human factor XI. *Blood*. 1997 Aug;90(3):1055–64.
121. Horie S, Moe O, Yamaji Y, Cano A, Miller R, Alpern R. Role of protein kinase C and transcription factor AP-1 in the acid-induced increase in Na/H antiporter activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Jun;89(12):5236–40.
122. Luna L, Skammelsrud N, Johnsen Ø, Abel KJ, Weber BL, Prydz H, et al. Structural Organization and Mapping of the Human TCF11 Gene. *Genomics*. 1995 May 20;27(2):237–44.
123. Sekimata M, Takahashi A, Murakami-Sekimata A, Homma Y. Involvement of a novel zinc finger protein, MIZF, in transcriptional repression by interacting with a methyl-CpG-binding protein, MBD2. *J Biol Chem*. 2001 Nov;276(46):42632–8.
124. Swedenborg E, Pongratz I. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology*. 2010 Feb;268(3):132–8.

125. Gu Y, Hogenesch J, Bradfield C. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:519–61.
126. Tomovic A, Oakeley EJ. Position dependencies in transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2007 Apr 15;23(8):933–41.
127. Das MK, Dai H-K. A survey of DNA motif finding algorithms. *BMC Bioinformatics*. 2007 Nov 1;8(Suppl 7):S21.
128. Yamaji Y, Moe O, Miller R, Alpern R. Acid activation of immediate early genes in renal epithelial cells. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1297–303.
129. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*. 1987 Dec 24;51(6):1079–90.
130. Baumann M, Pontiller J, Ernst W. Structure and basal transcription complex of rna polymerase ii core promoters in the mammalian genome: an overview. *Mol Biotechnol*. 2010 Jul 1;45(3):241–7.
131. Torigoe T, Izumi H, Yoshida Y, Ishiguchi H, Okamoto T, Itoh H, et al. Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Res*. 2003 Aug 1;31(15):4523–30.
132. Vergeer WP, Sogo JM, Pretorius PJ, de Vries WN. Interaction of Ap1, Ap2, and Sp1 with the regulatory regions of the human pro- α 1(i) collagen gene. *Arch Biochem Biophys*. 2000 May 1;377(1):69–79.
133. Wang F, Wang W, Safe S. Regulation of Constitutive Gene Expression through Interactions of Sp1 Protein with the Nuclear Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. *Biochemistry (Mosc)*. 1999 Aug 1;38(35):11490–500.
134. Srivastava S, Weitzmann MN, Kimble RB, Rizzo M, Zahner M, Milbrandt J, et al. Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest*. 1998 Nov 15;102(10):1850–9.
135. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Kr μ pel-like transcription factors. *Genome Biol*. 2003;4(2):206.
136. Yokoyama KD, Pollock DD. SP transcription factor paralogs and dna-binding sites coevolve and adaptively converge in mammals and birds. *Genome Biol Evol*. 2012;4(11):1102–17.

APÊNDICE A - Cálculo da taxa de degradação do RNAm do *Nhe3*

Os valores de threshold cycle (ct) para cálculo dos níveis de RNAm do *Nhe3* foram obtidos por transcrição reversa/PCR em tempo real a partir do RNA total extraído de células OKP, conforme descrito nos métodos. Abaixo, estão detalhados como a partir dos threshold cycle foram obtidos os valores de RNAm e como foi feita a estatística para comparação das taxas de degradação.

A partir dos dados de ct (Tabelas A.1 e A.2) e utilizando a equação de $2^{\Delta\Delta ct} - 1$ foram obtidos os níveis de RNAm. Todos os cálculos foram realizados em linguagem de programação R ². As linhas de comando estão nas caixas cinzas (Figuras A.1, A.2, A.4 e A.5). A obtenção dos valores de RNAm do *Nhe3*, os gráficos de curva de decaimento e os demais parâmetros utilizados para a estatística são sutis adaptações da função “rna.decay” disponível no sítio (*website*):

http://ecologia.ib.usp.br/bie5782/doku.phpid=bie5782:01_curso_atual:alunos:trabalho_final:p_h:start.^{3 *}

Tabela A.1 - Valores de ct para 0, 180, 360, 540, 720 e 1440 min (t0 a t5) após tratamento com actinomicina D para grupo controle e de acidose metabólica

tempo	Controle	Acidose metabólica
t0	21,062	20,725
t0	21,092	20,535
t0	21,073	20,804
t0	21,064	20,490
t1	22,353	21,459
t1	21,798	21,518
t1	22,018	22,125
t1	21,723	21,628
t2	22,337	22,549
t2	22,382	22,701
t2	22,267	22,203
t2	22,366	22,553
t3	22,229	22,617
t3	22,530	22,990
t3	23,233	22,817
t3	22,363	22,199
t4	22,733	23,297

* No endereço eletrônico disponível há uma página de ajuda com as informações necessárias para uso da função.

t4	22,665	23,439
t4	22,710	22,541
t4	23,026	22,924
t5	24,031	24,248
t5	24,261	24,165
t5	23,807	24,071
t5	24,033	24,161

Tabela A.2 - Valores de ct para 0, 180, 360, 540, 720 e 1440 min (t0 a t5) após tratamento com actinomicina D para grupo controle e de acidose respiratória

tempo	Controle	Acidose respiratória
t0	21,395	21,69
t0	21,520	22,05
t0	21,820	21,815
t0	21,300	21,895
t1	22,430	22,565
t1	22,425	22,985
t1	22,835	22,505
t1	22,370	22,551
t2	23,075	23,110
t2	22,810	23,565
t2	23,015	23,175
t2	23,100	23,320
t3	23,400	23,115
t3	23,790	23,920
t3	22,980	23,835
t3	22,985	23,495
t4	24,215	24,035
t4	23,210	23,990
t4	23,095	24,330
t4	23,520	23,835
t5	25,075	26,350
t5	24,830	26,105
t5	24,795	26,170
t5	24,530	26,500

Na figura A.1 do apêndice está a lista de comandos para obter os valores de RNAm do *Nhe3* a partir dos ct de cada amostra.

Figura A.1 – script para cálculo de níveis de RNAm do *Nhe3* em linguagem R a partir dos ct obtidos no PCR em tempo real

```
media.g1.t0 <- mean(delta.geral.g1[ct$tempo=="t0"], na.rm=TRUE)
delta.delta.g1 <- delta.geral.g1 - media.g1.t0
dois.a.delta.g1 <- 2^(-delta.delta.g1)
tempo.each <- rep(c(0,180,360,540,720,1440),
c(length(ct$g1[ct$tempo=="t0"]),length(ct$g1[ct$tempo=="t1"]),
  length(ct$g1[ct$tempo=="t2"]),length(ct$g1[ct$tempo=="t3"]),
  length(ct$g1[ct$tempo=="t4"]),length(ct$g1[ct$tempo=="t5"])))
```

Os dados de níveis de RNAm do *Nhe3* normalizados pelo tempo zero (em relação ao tratamento das células com Actinomicina D, mas com 24 horas nas condições controle, acidose metabólica ou respiratória) foram ajustados a uma regressão não linear do tipo exponencial negativo. Além disso, foram feitas regressões não lineares para os dados em conjunto dos grupos controle com seu respectivo grupo acidótico (modelo de curva única). A partir da função de regressão não linear “nls” foram obtidas as regressões exponenciais negativas das taxas de decaimento de RNAm (Figura A.2). Para que a função “nls” fosse uma exponencial negativa foi utilizado no argumento “formula”:

`nls(dois.a.delta.g1~a*exp(b*tempo.each)`

Sendo dois.a.delta.g1 e tempo.each os objetos criados na figura A.1. O argumento “formula” respeita a função de decaimento exponencial descrita na equação 1:

$$N_{(t)} = N_{(0)} e^{-\lambda t} \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo $N_{(t)}$ a quantidade de RNAm no tempo t , $N_{(0)}$ a quantidade de RNAm no tempo zero ($t=0$) e λ (lambda) a constante de decaimento.

Figura A.2 – Script com as linhas de comando para obtenção das regressões de decaimento exponencial

```
lambda.g1<- -log(dois.a.delta.g1)/ tempo.each
lambda.g1a <-lambda.g1
lambda.g1a[which(lambda.g1==-Inf|lambda.g1==Inf)] = NA
#lambda.start.g1 <- mean(lambda.g1a, na.rm=T) # o calculo dessa parte
#existe apenas para fornecer o valor necessário de "start" para a
#função "nls" abaixo
fit.exp.g1<- nls(dois.a.delta.g1~a*exp(b*tempo.each), start=c("a"=1,
"b"=lambda.start.g1))
coef.fit.g1 <- coefficients(fit.exp.g1)
```

Os dados de níveis de RNAm do *Nhe3* e suas respectivas curvas representativas das funções não lineares estão presentes na figura A.3, de modo que na figura A.3a estão apresentados os dados de acidose metabólica e na figura A.3b os dados de acidose respiratória. Nas figuras A.3a e A.3b estão representadas as funções do grupo controle e acidose separadamente, compondo os modelos de curvas separadas, bem como a função dos dados conjuntos de acidose e controle compondo o modelo de curva única.

Figura A.3 – decaimento exponencial do RNAm do *Nhe3* normalizado pelos níveis de RNAm no tempo t_0 de cada grupo

Círculos e curvas azuis representam os valores do grupo controle e triângulos e curvas vermelhas representam os valores das condições de acidose. A curva preta representa o modelo de curva única. A. acidose metabólica. B. acidose respiratória

As equações obtidas pela função “nls” estão presentes na tabela A.3.

Tabela A.3 - Equações mostradas na figura A.3 e utilizadas para o teste *deviance*. $N(t)$ significa a quantidade de RNAm no tempo (t) em minutos.

	Condição ácido-base	Equação
1	Controle da acidose metabólica normalizada pelo nível de RNAm no tempo zero ($t = 0$) do controle	$N(t) = 0.92302e^{(-0.00187 t)}$
2	Acidose metabólica normalizada pelo $t = 0$ da acidose metabólica	$N(t) = 0.9642e^{(-0.00296t)}$
3	Controle da acidose respiratória normalizada pelo $t = 0$ do controle	$N(t) = 0.94337e^{(-0.00237t)}$
4	Acidose respiratória normalizada pelo $t = 0$ da acidose respiratória	$N(t) = 0.97237e^{(-0.00237t)}$
5	Dados em conjunto da acidose metabólica e seu respectivo controle normalizados pelo próprio $t = 0$	$N(t) = 0.95580e^{(-0.00244t)}$
6	Dados em conjunto da acidose respiratória e seu respectivo controle normalizados pelo próprio $t = 0$	$N(t) = 0.96330e^{(-0.00237t)}$

A comparação entre os modelos de curva única (os dois grupos têm decaimento semelhantes) ou de duas curvas específicas para cada grupo (os dois grupos têm decaimentos diferentes) foi feita por razão de verossimilhança ou teste *deviance*, definida para testes com hipótese nula como:

$$D = 2\ln(L \text{ do modelo nulo}) - 2\ln(L \text{ do modelo alternativo}) \quad \text{Equação (2)}$$

No qual, L é o valor de verossimilhança. O modelo nulo é o modelo de curva única e o alternativo o modelo de curvas diferentes. Portanto, para calcular o *deviance* foi necessário primeiro calcular os valores de log de verossimilhança ($\ln(L)$ ou LL , equação 3) para cada modelo (figura 4).

$$\ln L = \sum_{i=1}^n \ln f(x_i | \theta) \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo L o valor de máxima verossimilhança, o seu log é definido como a soma dos logaritmos das probabilidades das observações x_i dado o parâmetro θ . Assim, foram utilizados os níveis de RNAm como amostras observadas e $N_{(0)}$ e λ como parâmetros θ . Portanto, o cálculo realizado foi a soma dos logaritmos da probabilidade de se ter observado

os dados de RNAm, assumindo uma distribuição normal da amostragem, dado os parâmetros de um modelo de decaimento exponencial de curvas separadas ou de curva única.

Figura A.4 – Script para cálculo dos valores log de verossimilhança (LL) dos modelos de curvas separadas e curva única

```
LL <-
sum(c(dnorm(controle1$controle,mean=mean(nzero1*exp(lambda1*controle1$t)),sd=sd(controle1$controle),log=T),
dnorm(controle2$controle,mean=mean(nzero1*exp(lambda1*controle2$t)),sd=sd(controle2$controle),log=T),
dnorm(controle3$controle,mean=mean(nzero1*exp(lambda1*controle3$t)),sd=sd(controle3$controle),log=T),
dnorm(controle4$controle,mean=mean(nzero1*exp(lambda1*controle4$t)),sd=sd(controle4$controle),log=T),
dnorm(trat1$trat,mean=mean(nzero2*exp(lambda2*trat1$t),sd=sd(trat1$trat)),log=T),
dnorm(trat2$trat,mean=mean(nzero2*exp(lambda2*trat2$t),sd=sd(trat2$trat)),log=T),
dnorm(trat3$trat,mean=mean(nzero2*exp(lambda2*trat3$t),sd=sd(trat3$trat),log=T),
dnorm(trat4$trat,mean=mean(nzero2*exp(lambda2*trat4$t),sd=sd(trat4$trat)),log=T)))
```

O coeficiente *nzero1* significa o valor de nível de RNAm do *Nhe3* no tempo zero para um dos grupos a ser comparado (por exemplo, o controle) e *nzero2* o mesmo para o outro grupo (por exemplo, acidose metabólica). O coeficiente *lambda1* e *2* significam os coeficientes de decaimento de cada grupo. Para o modelo de curva única, *nzero1* e *2* possuem o mesmo valor, assim como *lambda1* e *2*.

A partir dos dados obtidos dos valores de log de verossimilhança foi feito o cálculo de deviance para cada modelo (Figura A.5 e Tabela A.4). Como a probabilidade de distribuição do teste de *deviance* se aproxima a uma distribuição de χ^2 com graus de liberdade da hipótese alternativa subtraídos da hipótese nula, foi utilizada uma distribuição de χ^2 com 2 graus de liberdade (4 do modelo de curvas diferentes e 2 do modelo de curva única).

Figura A.5 – Script para cálculo dos valores de deviance dos modelos de curvas diferentes e curva única para a acidose metabólica e respiratória, para em seguida calcular o p-valor da comparação dos modelos.

```
deviance <- -2*LL.unica + 2*LL.diferentes
pvalor <- pchisq(deviance,2)
```

LL = log de verossimilhança.

Tabela A.4 – valores de deviance e os p-valores calculados a partir de uma distribuição de χ^2 com 2 graus de liberdade

Condição ácido base	deviance	p-valor
Acidose metabólica	3.392607	0.1833601
Acidose respiratória	-0.1988207	1,000

REFERÊNCIAS

- 1 Livak, KJ, Schmittgen, TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- 2 R DEVELOPMENT CORE TEAM R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2011.
- 3 Silva, PHI. Função rna.decay. Disponível em: http://ecologia.ib.usp.br/bie5782/doku.php?id=bie5782:05_curso_antigo:alunos2012:alunos:trabalho_final:ph:start. Acesso em: 12 de fevereiro de 2013.

APÊNDICE B - Quantificação da proteína-ARNT

Figura A.6 – Immunoblotting para a proteína-ARNT em células OKP expostas a 1h ou 6h de acidose metabólica

Quantidades equivalentes de proteínas obtidas de células OKP expostas à acidose metabólica foram utilizadas para eletroforese e imunoblotting. A. Células OKP expostas a situação controle (C) e acidose metabólica (M) por 1h. B) Células OKP expostas a situação controle (C) e acidose metabólica (M) por 6h. Tamanho esperado para ARNT é de 95 kDa, mas apareceram outras bandas nos imunoblotting. Valores a direita da figura indicam o tamanho da proteína em kDa.

APÊNDICE C – Atividades promotoras de Mut1, Mut2 e Mut3 normalizadas pelo fragmento não mutado

Figura A.7 - Valores das atividades promotoras dos fragmentos -471/+55, Mut1, Mut2 e Mut3 normalizados pela atividade promotora de -471/+55 (não mutado) na condição controle.

Os pontos indicam as médias de atividade promotora, e as barras verticais o desvio padrão. Círculos representam os dados de condições controle e quadrados representam os dados de acidose metabólica.

APÊNDICE D - Levantamento do número de sequências consenso para sítios para fatores de transcrição em *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* e *Monodelphis domestica*

Posto que o presente trabalho utilizou para os experimentos de transfecção sequências do promotor do gene do *Nhe3* de rato em células de gambá (*Didelphis virginiana*) seria necessário pelo menos identificar se os possíveis sítios para fatores de transcrição presentes nos promotores de uma espécie ocorrem na outra. Além disso, esta tese tem uma perspectiva biomédica o que prevê a utilização destes dados na biologia humana. Assim, utilizando o MatInspector, foi feito um levantamento do número de sítios para fatores de transcrição nas regiões promotoras de humano, rato e gambá, dentro dos 2100 pares de bases anteriores a sítio de início de transcrição do *Nhe3*. Infelizmente, como *Didelphis virginiana* não teve seu genoma sequenciado, foi necessário utilizar como referência a sequência de *Monodelphis domestica*, um outro gambá.

As sequências dos RNAm das três espécies foram obtidas nos bancos de dados do NCBI. A partir destas sequências, utilizou-se o Genomic Sequence Near Gene da UCSC Genome Bioinformatics para que fossem obtidos 2100 pb das sequências promotoras destes genes. As sequências podem conter pequenos desvios do sítio de início de transcrição real

Para as cada uma das três espécies foram identificados mais de 500 possíveis sítios para fatores de transcrição diferentes e a representação de nove tipos de fatores selecionados em cada espécie está apresentada na tabela A.5. Estes fatores foram escolhidos devido a relação já testada dessas proteínas com a regulação do NHE3 na acidose ou por terem sido identificados como super-representados na análise mostrada anteriormente.

Tabela A.5 - número de vezes que os fatores de transcrição SP1, AHR-arnt heterodimers and AHR heterodimer, EGR1, PAX5, MIZF, AML1 (SEF1), CF11:MAFG heterodimer, NRF1 e AP1R estão representados no gene do *Nhe3* de *Rattus norvegicus* (rato), *Monodelphis domestica* (gambá) e *Homo sapiens* (humano) na região correspondente a -2100 pb do promotor a +1 (assumindo-se como +1 a primeira base do sítio de início de transcrição)

Fator de transcrição	Espécie	Abundância
GC-Box factors SP1/GC	Rato	7
GC-Box factors SP1/GC	Gambá	NI
GC-Box factors SP1/GC	Humano	25

AHR-arnt heterodimers and AHR heterodimer	Rato	3
AHR-arnt heterodimers and AHR heterodimer	Gambá	NI
AHR-arnt heterodimers and AHR heterodimer	Humano	8
EGR1	Rato	8
EGR1	Gambá	NI
EGR1	Humano	27
PAX5	Rato	3
PAX5	Gambá	NI
PAX5	Humano	11
MIZF	Rato	NI
MIZF	Gambá	NI
MIZF	Humano	NI
AML1 (SEF1)	Rato	2
AML1(SEF1)	Gambá	1
AML1(SEF1)	Humano	1
CF11:MAFG heterodimer	Rato	1
CF11:MAFG heterodimer	Gambá	1
CF11:MAFG heterodimer	Humano	0
NRF1	Rato	6
NRF1	Gambá	NI
NRF1	Humano	15
AP1R	Rato	4
AP1R	Gambá	10
AP1R	Humano	6
Total	Rato	539
Total	Gambá	626
Total	Humano	579
Diversidade	Rato	153
Diversidade	Gambá	132
Diversidade	Humano	127

Total significa o número de sítios para fatores de transcrição encontrado e Diversidade significa o número de tipos diferentes de sítios encontrados. NI significa que o sítio para fator de transcrição não foi identificado na sequência do promotor.

APÊNDICE E - Alinhamentos entre as sequências do promotor do gene do *Nhe3* de humano e de rato

Figura A.8 – Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do promotor do gene do *Nhe3* de *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* na região correspondente a 500 pb da região flangeadora 5' e o sítio de início de transcrição do gene *Nhe3*

```

#
# Length: 609
# Identity: 307/609 (50.4%)
# Similarity: 307/609 (50.4%)
# Gaps: 218/609 (35.8%)
# Score: 728.0
#
#=====
Rato      1 -----tagatgccatggtgttctacccgc---ggattccagggt      36
          .||..||| |||      ||..|| |||..|..|||
Humano    1 cgagttctgtaagtggcc--ggt-----ccgctgtggaatgcagggt      42

Rato      37 c-----tcaatggagagggccttgctgagtgtatata-acgggggt      76
          |      .||||..|..|||      |||..|||..|..| ||
Humano    43 cctgctgaagacaatagcgagg--gctgtgtgaagacacac-----      82

Rato      77 gggggtcggggcggtgcagtgtaccct-----gtaact      110
          |..|||| ..|..|||..|||      || ||
Humano    83 -----ctggggc--ccctgtgcaccctgggccgcccgtggggt--ct      122

Rato      111 agcgaaaccaaccgg---ctgc-----tgaag-----tggccaaggcgg      146
          |||..|..| ||..|      |||      ||| |||
Humano    123 -gcgcagcc--ccaggccctgcgttatgaaggagggttg--ggcga      165

Rato      147 gagaagcaggtcccacttaacgggtagagtcgacagcc---gcatgcctg      193
          |..|      |||      ||      |..|| |||..|..|
Humano    166 gcgca-----cccac-----ag-----ctgcccgggcatcccg      194

Rato      194 -gccgc-cgggaagaaaaaactgccagtgggctaggtgccactcgacc      240
          ||..|| |||      |||..|||..| |..|..|||..|..|
Humano    195 gagctgcgcgg-----aaccgcctgt---cccgctgccccgcg--c      230

Rato      241 ttggggaggagcgaccagaggacctgaatccacaggtcttagctggtg      290
          |      |..||..|||      ||      ||..||| |..|..|
Humano    231 t-----gtgctcccca-----cg---ccccag-----gaaggcg      256

Rato      291 gctgaggagccc-----gcagcatccagagagccaggacttc      327
          ||..|..|..|..|      ||..|| |||..|..|..|..|..|
Humano    257 gccgcgcagtcgggctcgctcttgccgc-----gacctccggacctc      301

Rato      328 taggctg-gggccc-----aaccaagta-----ggtgggc      356
          .||||..| |||..|      .||||..| |||
Humano    302 caggccgcgggctcgggggaggggtggccaccaggagcgcggggtgggc      351

Rato      357 gtgagcagcacaggcg-----cgagaccttctaacgcagcagactgtt      399
          |||..||..|..|..| |||..|| |||..| |||
Humano    352 gtgcgcgggcgggcgggcggtgcccggagct-----gcggcg--tgtc      393

Rato      400 tgcatcac--gtgcgcagcgggcggggaaggcccgccctggcgcggg      447
          |||..||..| |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Humano    394 tgcgtcgcgagtcgcggcgggggcgggcaggctccgccccggggcggg      443

Rato      448 agggggcagcgggattaaaggccacccgggcaggcctggggacctgactg      497
          |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Humano    444 agggggcgcgggattaaaggccacccggcgggc--ggggatcggaactg      491

Rato      498 ctg-----      500
          ..|
Humano    492 tagccggtta      500

```

Tabela A.6 – Valores de identidade e de lacunas (*gap*) de alinhamentos entre as sequências de nucleotídeos de diferentes regiões dos promotores do gene do *Nhe3* de rato e humano

Região do promotor	Identidade	<i>Gap</i>
-100 a 1	74,5%	11,3%
-200 a -101	46,0%	38,7%
-500 a -201	39,6%	51,5%
-500 a - 1	50,4%	35,8%

Os alinhamentos foram realizados com o algoritmo EMBOSS Needle⁴, utilizando sequências dos promotores de *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*. *Gap* ou lacuna determina a porcentagem de espaços vazios consecutivos no alinhamento.

REFERÊNCIAS

1 Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends Genet. 2000 Jun 1;16(6):276–7